

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
Departamento de Estomatología



**“VALORACIÓN DE LA RESPUESTA TISULAR DE UN SISTEMA DE RESINA EN BASE
A SILORANE EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN”**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

ESTHER RUIZ DE CASTAÑEDA REGOJO

*Bajo la dirección de las doctoras
Encarnación González Rodríguez, M^a Angustias Peñalver Sánchez y Patricia Gatón Hernández.
Granada, 2011*

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Esther Ruiz de Castañeda Regojo
D.L.: GR 598-2013
ISBN: 978-84-9028-405-6

D^a ENCARNACIÓN GONZÁLEZ RODRÍGUEZ, CON DNI Nº24138755, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA

QUE D^a ESTHER RUIZ DE CASTAÑEDA REGOJO, CON DNI Nº25662127-S, HA REALIZADO BAJO SU SUPERVISIÓN DIRECTA EL TRABAJO TITULADO "VALORACIÓN DE LA RESPUESTA TISULAR DE UN SISTEMA DE RESINA EN BASE A SILORANE EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN", Y QUE OTORGA SU CONSENTIMIENTO Y AUTORIZACIÓN EXPRESA PARA LA DEFENSA DEL MISMO COMO TESIS DOCTORAL.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma la presente, en Granada a 20 de julio de 2011.

Fdo. D^a Encarnación González Rodríguez

D^a M^aANGUSTIAS PEÑALVER SÁNCHEZ, CON DNI N^o 24166491-T, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA

QUE D^a ESTHER RUIZ DE CASTAÑEDA REGOJO, CON DNI N^o25662127-S, HA REALIZADO BAJO SU SUPERVISIÓN DIRECTA EL TRABAJO TITULADO "VALORACIÓN DE LA RESPUESTA TISULAR DE UN SISTEMA DE RESINA EN BASE A SILORANE EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN", Y QUE OTORGA SU CONSENTIMIENTO Y AUTORIZACIÓN EXPRESA PARA LA DEFENSA DEL MISMO COMO TESIS DOCTORAL.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma la presente, en Granada a 20 de julio de 2011.

Fdo. D^a M^a Angustias Peñalver Sánchez

*D^a PATRICIA GATÓN HERNÁNDEZ, CON DNI N°47652920W PROFESORA ASOCIADA DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSITAT DE BARCELONA*

CERTIFICA

*QUE D^o ESTHER RUIZ DE CASTAÑEDA REGOJO, CON N°25662127-S , HA REALIZADO BAJO SU SUPERVISIÓN DIRECTA EL TRABAJO
TITULADO “VALORACIÓN DE LA RESPUESTA TISULAR DE UN SISTEMA DE RESINA EN BASE A SILORANE EN ANIMALES DE
EXPERIMENTACIÓN”, Y QUE OTORGA SU CONSENTIMIENTO Y AUTORIZACIÓN EXPRESA PARA LA DEFENSA DEL MISMO COMO TESIS
DOCTORAL.*

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma la presente, en Granada a 20 de julio de 2011.

Fdo. D^a Patricia Gatón Hernández

DOCTORADA:

Dº ESTHER RUIZ DE CASTAÑEDA REGOJO, CON Nº25662127-S

FIRMA

DIRECTORAS:

Dª ENCARNACIÓN GONZÁLEZ RODRÍGUEZ, CON DNI Nº24138755

FIRMA

Dª MªANGUSTIAS PEÑALVER SÁNCHEZ, CON DNI Nº 24166491-T

FIRMA

Dª PATRICIA GATÓN HERNÁNDEZ, CON DNI Nº47652920W

FIRMA

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN.....	03
2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	09
3 MATERIAL Y MÉTODO	11
I - Tolerancia tisular. Estudio en Camundongos Isogénicos: Respuesta en Tejido Conjuntivo Subcutáneo.	
II - RESPUESTA TISULAR POSTERIOR A LA PROTECCIÓN PULPAR EN DIENTES DE PERRO.	
4 RESULTADOS.....	15
5 DISCUSIÓN.....	35
6 CONCLUSIÓN.....	44
BIBLIOGRAFÍA.....	46

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

La historia de las actuales resinas compuestas en Odontología Restauradora tuvo su inicio con Bowen (1962)¹ cuando éste desarrolló un nuevo tipo de resina, siendo ésta un material complejo formado por polímeros orgánicos (resina) reforzados con sustancias minerales (relleno inorgánico)^{2,3,4}. La principal innovación fue la matriz de resina de Bisfenol-A-Glicidil Metacrilato (Bis-GMA). Desde entonces ha habido grandes avances y modificaciones, que intentan resolver sus principales deficiencias, la contracción de polimerización y el estrés asociado⁵.

De acuerdo con Anusavice (2004)⁶, los componentes estructurales básicos de las resinas compuestas son:

1. Matriz: Material de resina plástica que forma una fase continua.
2. Relleno: Partículas / fibras de refuerzo que forman una fase dispersa.
3. Agente de conexión o acoplamiento: favorece la unión del relleno con la matriz (Silano).
4. Sistema activador: iniciador de la polimerización
5. Pigmentos: permiten obtener el color semejante de los dientes.
6. Inhibidores de la polimerización: alargan la vida de almacenamiento y aumentan el tiempo de trabajo.

La resina que forma la matriz orgánica de estos materiales, en la mayoría de los casos, es una resina según la fórmula de Bowen¹ (dimetacrilato complejo o Bis-GMA), aunque en las últimas décadas se han desarrollado otros monómeros como metacrilato trietilo glicol (TEGDMA) o dimetacrilato de uretano (UDMA)^{4,6}. El Bis-GMA (Bisfenol-A- Glicidil Metacrilato) tiene un alto peso molecular, lo que hace que por un lado, su contracción de polimerización sea más baja que la de otros monómeros, pero por otro, aumenta su viscosidad, empeorando su manipulación; además su grado de conversión es bajo⁷. Para mejorar estas características en la resina se añaden monómeros de baja

viscosidad, metacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA) o dimetacrilato de uretano (UDMA). La principal aportación del UDMA es su menor viscosidad y mayor elasticidad, lo que mejora la resistencia de la resina.⁵

Por otro lado, el relleno inorgánico lo constituyen partículas de sustancias minerales, como cuarzo, silicato de aluminio, vidrio de borosilicato, vidrio de bario, cerámica, fibras de vidrio, sílice fundida, etc.² Estas partículas son las que proporcionan estabilidad dimensional a la matriz resinosa y mejoran sus propiedades. La adición de estas partículas a la matriz reduce la contracción de polimerización, la absorción acuosa y el coeficiente de expansión térmica, proporcionando una mejora de la resistencia a la tracción, a la compresión y a la abrasión, y aumentando el módulo de elasticidad⁵. Estas partículas pueden presentar distintos tamaños y formas, lo que afecta de manera directa a sus propiedades físico-mecánicas. La cantidad de relleno inorgánico que contiene la matriz orgánica puede llegar a representar un 70- 85% del peso de la resina compuesta, lo que también influye en sus propiedades.

Otro componente esencial son los agentes de unión conexión. Las propiedades del material dependen de la formación de una unión fuerte entre el relleno inorgánico y la matriz orgánica². La unión de estas dos fases se logra recubriendo las partículas de relleno con un agente de acoplamiento que tiene características tanto de relleno como de matriz. El agente responsable de esta unión es una molécula bi-funcional que tiene grupos silanos (Si-OH) en un extremo y grupos metacrilatos (C=C) en el otro. Debido a que la mayoría de las resinas compuestas disponibles comercialmente tienen relleno basado en sílice, el agente de acoplamiento más utilizado es el silano ^{8,9}.

Las resinas compuestas se presentan en estado plástico con el fin de facilitar su aplicación, pero para su endurecimiento necesitan de un sistema activador que desencadene la reacción de polimerización. Según este sistema distinguimos entre:

- Resinas compuestas autopolimerizables o quimiopolimerizables: aquellas que se presentan en dos componentes (iniciador y activador) que al mezclarse polimerizan. Los activadores se suministran de manera separada, una pasta

catalizadora que contiene peróxido (peróxido de benzoilo) y una pasta base que contiene amina.

- Resinas compuestas fotopolimerizables: contienen un compuesto químico (canforquinona, Lucerina TPO) que por la acción de la luz inicia el fenómeno de polimerización.

Los primeros composites fotopolimerizables fueron introducidos al final de los años 70. Estos productos combinan en un único material, el monómero, el relleno, así como también los iniciadores, los estabilizadores y los ingredientes adicionales¹⁰.

Las resinas compuestas, mayoritariamente, presentan polimerización química en base a dimetacrilato iniciada por la luz azul ^{1,11}.

La polimerización de la matriz de resina va a conseguir que las moléculas de monómero que la forman se unan en moléculas mayores o polímeros. Los monómeros durante la polimerización se redistribuyen en el espacio, reduciendo la distancia entre ellos, al unirse mediante enlaces covalentes. Esta disminución de la distancia, se traduce en una pérdida de volumen en la resina¹². Hay trabajos que han cuantificado esta disminución de volumen, que está entre un 1.35 % y un 7.1 % ¹³. Esta gran variabilidad está en función del tipo de resina (peso molecular de los monómeros), la cantidad de resina y de relleno inorgánico, y el grado de conversión y entrecruzamiento del polímero¹⁴.

En 1991, Phillips¹⁵ definió las características ideales de un material dental. Este debería ser inocuo para la pulpa y los tejidos blandos, no debería contener ninguna sustancia tóxica difusible que pueda ser absorbida en el sistema circulatorio y causar una respuesta sistémica, debería estar libre de agentes potencialmente alergénicos que pudieran conducir a una respuesta alérgica, y no deberían tener ningún potencial carcinogénico.

Las tres vías de actuación de las sustancias químicas liberadas por los materiales resinosos pueden ser: primero, por medio de la ingestión de componentes liberados en el tracto gastro-intestinal, segundo por medio de la difusión a la pulpa por medio de los túbulos dentinarios^{16,17}) y tercero por medio de los componentes volátiles en los pulmones^{18,19}). La última vía es

particularmente importante para los dentistas y el personal auxiliar, en cuanto a que las dos primeras presentan relevancia para los pacientes²⁰.

En 2011, Van Landuyt et al.²⁰ después de la realización de un metanálisis, relataron que los materiales a base de resina no son inertes en el medio bucal, una vez que liberan componentes debido a su incompleta polimerización y más tardíamente, debido a su degradación.

Biológicamente, los materiales con base metacrilato presentan liberación de monómeros no polimerizados en el interior de los tejidos^{21,12}, siendo altamente citotóxicos. La liberación de compuestos no polimerizados, del cuerpo de las resinas compuestas, ha sido relacionada con hipersensibilidad y citotoxicidad^{22a,23b}, genotoxicidad²⁴, estrogenicidad²⁵ y con alteraciones del sistema inmune.

Es importante conseguir una polimerización lo más completa posible, en toda la restauración, para minimizar la respuesta pulpar^{26,27}. El grado de repuesta pulpar es mayor en cavidades profundas, cuando la polimerización incompleta de la resina, permite mayor concentración de monómeros residuales cerca de la pulpa²⁸.

Se ha discutido repetidamente que las sustancias liberadas de los materiales restauradores pueden alcanzar el tejido pulpar mediante la difusión a través del tejido dentinario, especialmente en cavidades profundas.

Debido a la profunda interrelación de la pulpa y la dentina a lo largo de la vida del diente, se tratan como un sistema y se denomina complejo pulpo-dentinario.

Histológicamente, el complejo pulpo-dentinario esta formado por células diferenciadas e indiferenciadas incluyendo poblaciones de odontoblastos, pseudo-odontoblastos y las células madres de origen pulpar²⁹. Los odontoblastos se disponen en una monocapa en la periferia de la pulpa dentaria.

Podemos considerar la dentina como un tejido conectivo mineralizado. Como a todos los tejidos conectivos, los constituyentes de la matriz extracelular le dan sus características funcionales. En la dentina, esta matriz

extracelular contiene una base mineral, lo que le permite desempeñar sus requerimientos funcionales. El contenido mineral constituye alrededor del 70% en peso (algo mayor que en el tejido óseo), mientras la parte orgánica supone aproximadamente un 20%. En base a volumen, donde quizás se aprecia mejor, el componente mineral implica un 50%, mientras que el orgánico un 30%, siendo agua el volumen restante. Los componentes no están distribuidos uniformemente en el tejido. La predentina es una capa que se localiza en la parte pulpar de la dentina, entre el tejido mineralizado y tejido conectivo laxo de la pulpa. Es una matriz orgánica no mineralizada compuesta principalmente por colágeno. Su espesor varía entre 10 y 30 micrómetros.³⁰

La dentina es una estructura compleja, compuesta de tejido calcificado de distintos tipos. La dentina primaria se sintetiza, de manera rápida, durante el desarrollo del diente y constituye la mayor parte del volumen de la dentina. La primera capa de dentina primaria, que se deposita periféricamente justo por debajo del esmalte al comienzo de la formación dentinaria, se denomina dentina del manto, esta dentina no tiene ninguna estructura tubular y la matriz orgánica es algo irregular en su estructura. El espesor de la dentina del manto varía, entre 5-30 micras. El resto de la dentina primaria se denomina dentina circumpulpar, y tiene una composición ligeramente diferente, algo más mineralizada. Esta se divide en dentina intertubular y peritubular. La dentina intertubular es la principal secreción de los odontoblastos durante la dentinogénesis, y constituye el mayor volumen de la dentina primaria. La dentina peritubular es una lámina de tejido, bien demarcado, de apariencia más compacta, y altamente mineralizado, alrededor de los túbulos dentinarios. Es mucho menos voluminosa, con un espesor de 0.5-1 micrómetro. Su formación es un proceso continuo y solo se produce cuando hay procesos odontoblásticos viables.

La dentina es un tejido altamente permeable, tanto a fluidos como a moléculas, como a invasión bacteriana, debido al gran número de túbulos dentinarios. Estos túbulos salen de la pulpa, desde la capa odontoblástica y atraviesan toda la dentina. Estos túbulos, contienen el proceso odontoblástico que

permanece después de la formación de la matriz, como una extensión del propio odontoblasto. También contiene fluido dentinario, este actúa como medio de transporte de los componentes involucrados en el crecimiento de la dentina peritubular. Este proceso se considera controlado por los odontoblastos, y como tal un proceso fisiológico, aunque puede estar acelerado por estímulos externos. Un considerable volumen de la dentina está ocupada por la luz de esos túbulos. Su diámetro varía de 1 a 3 micras. Estos túbulos tienen ramificaciones laterales en el cuerpo de la dentina y ramificaciones terminales en la periferia. Se calcula que en la dentina más periférica hay una densidad de 25.000 túbulos por milímetro cuadrado, en la zona central aproximadamente 25.000/mm² y alrededor de 55.000/mm² cerca de la pulpa. La calcificación, y posible obliteración, de estos túbulos, reduce la permeabilidad, lo que puede tener una repercusión positiva en la vitalidad pulpar³¹.

Continuando la dentinogénesis, los odontoblastos siguen depositando, alrededor de la pulpa, a un ritmo mucho menor, una dentina fisiológica denominada dentina secundaria. Esta dentina secundaria reduce el tamaño de la pulpa y es segregada durante toda la vida del diente. Su estructura es distinta de la dentina primaria, principalmente por la mayor curvatura de los túbulos dentinarios.

Como respuesta a estímulos externos tales como irritantes químicos, caries, atrición, procedimientos restauradores o cualquier otro trauma, conducen a la dentinogénesis de reparación o regeneración, formándose la dentina terciaria³². Dependiendo la gravedad de agresión y del tipo de célula que sintetice esta dentina, la estructura de la misma variará, desde una dentina muy similar a la primaria, con patrón tubular, hasta una dentina atubular, con una permeabilidad muy reducida que evita la difusión de agentes nocivos.³² De esta forma los odontoblastos aumentan la secreción de matriz extracelular y su mineralización, generando dentina terciaria en el lugar de la lesión tisular, de la agresión. Si la lesión es importante, la formación de dentina de reparación necesitará de los

pseudo-odontoblastos, son éstos los que van a reemplazar a los odontoblastos originales debido daño celular que se ha producido en ese punto.

Como ya hemos comentado, ha sido bien documentado en la literatura específica, que componentes reactivos liberados de las resinas compuestas convencionales, como monómeros sin polimerizar¹² y productos de oxidación, pueden inducir respuestas tisulares inflamatorias o toxicidad. La extensión de las reacciones tisulares depende de la cantidad de agente irritante, que está relacionada con la cantidad remanente de uniones de doble enlace de carbonos (C=C)^{33,34,35}, y con la cantidad de dentina remanente²².

Estudios en cultivo de células han demostrado que los monómeros metacrilato y dimetacrilato, comúnmente usados en la tecnología polimérica, pueden afectar al aumento de leucocitos en los sitios de inflamación, por la disminución de la expresión de moléculas intercelulares de adhesión³⁶ y por inducción de la actividad y de la expresión de factores de crecimiento y de citoquinas³⁷. Además de esto, los monómeros resinosos alteran la respuesta inflamatoria de macrófagos y suprimen la actividad de las mitocondrias de los mismos^{38,24}.

Además de los componentes reactivos liberados de las resinas compuestas convencionales, como monómeros sin reaccionar¹² y productos de la oxidación, que como ya hemos dicho, pueden inducir toxicidad o reacciones inflamatorias tisulares⁴⁷, los componentes de los sistemas adhesivos pueden, también, desencadenar una reacción tisular desfavorable, impidiendo el proceso de reparación³⁹.

En 1996, Vallikathan et al.⁴⁰ evaluaron la reacción tisular frente a la implantación de resina compuesta a base de metacrilato, en el tejido conjuntivo subcutáneo de ratas Wistar, por medio de estudio histopatológico e inmunocitoquímico. Después de los períodos de implantación (de 2 días a 8 semanas), observaron que la implantación de la resina estaba asociada con la llegada de monocitos, aumento del número de macrófagos y expresión aumentada del antígeno de clase II (antígeno Ia) de histocompatibilidad.

Silva et al. (2009)⁴⁰ realizaron un estudio histopatológico para evaluar la respuesta pulpar y periapical en dientes de perros, después de hacer protección pulpar directa con adhesivo autograbante. Concluyeron que el uso de materiales resinosos, en contacto con tejido pulpar, no permite el proceso de reparación, conduciendo al fracaso en el 100% de los casos.

En los últimos años, han aparecido resinas a base de metacrilato con modificaciones en su composición y estructura, como Filtek™ Supreme XT. Esta resina es un composite de nanopartículas lanzado recientemente por 3M ESPE (St. Paul, MN, USA) que contiene solamente partículas nanométricas y *nanoclusters* de partículas inorgánicas. Las partículas nanométricas están compuestas de partículas de sílice monodispersas, no agregadas y no aglomeradas, mientras que los *nanoclusters* son aglomerados esferoidales de nanopartículas de sílice y zirconia. Las partículas nanométricas y *nanoclusters* son tratados con agentes de unión (silanos) que permiten la adhesión química con la matriz orgánica. Por otra parte, estas resinas presentan propiedades físicas adecuadas, como por ejemplo, mejor pulido⁴¹, pero también presentan efectos tóxicos en cultivo de células¹².

Por otro lado, los problemas que conllevan la contracción de polimerización y la liberación de productos químicos de los sistemas en base a metacrilatos ha conducido al desarrollo de materiales resinosos con mejoría en la tecnología de polimerización, en la composición, en el desgaste, la estética y en las propiedades de adhesión. Recientemente, se han realizado estudios modificando la naturaleza de las resinas, a fin de reducir la contracción de polimerización. De esta forma, la empresa 3M ha desarrollado la resina Filtek™ Silorane (3M ESPE). El nombre "Silorane" deriva de sus componentes químicos (siloxanos y oxiranes) que cuando se combinan generan siloranes⁴⁴. Esta nueva resina presenta una polimerización catiónica por apertura de anillos. La red de los siloranos se crea debido a la polimerización inducida por un catión que genera un proceso de polimerización por apertura de anillos de los oxiranos. Esto ocurre con una contracción muy baja, mostrando valores menores al 1%⁴².

La resina Silorane presenta una naturaleza altamente hidrofóbica, tendiendo a absorber menos colorantes de la dieta y siendo menos sensible a pigmentos exógenos. Según Eick et al. (2006) e Wei et al. (2011)⁴⁴ los siloranes presentan estabilidad en los fluidos biológicos.

La tecnología de Silorane da lugar a un material restaurador con menor contracción de polimerización^{43,44,45,46,47}, estrés volumétrico mas balanceado, mayor estabilidad en ambientes con luz⁴⁴, altamente hidrofóbico, e insolubilidad en los fluidos biológicos⁴².

Usha et al. (2011)⁴⁸ compararan diferentes técnicas de restauración sobre a microinfiltración de resina con base de Silorane, empleando microscopía confocal, y concluyeron que la técnica incremental minimiza aún más la microfiltración

Las resinas con baja contracción de polimerización que utilizan la tecnología siloxano-oxirano, como es el caso de Filtek™ Silorane (3M ESPE), han necesitado desarrollar un adhesivo específico (Silorane System Adhesive, 3M ESPE), en particular debido a la elevada hidrofobicidad de la resina Silorane⁴⁹.

Burke et al. (2011)⁵⁰ evaluaron el desempeño clínico, a dos años, de restauraciones efectuadas en dientes posteriores con Filtek Silorane. Fueron evaluadas 100 restauraciones (30 de clase I y 70 de clase II), efectuadas en 64 pacientes. Todas las restauraciones se encontraron intactas y sin lesiones secundarias de caries. En total, el 97% de las restauraciones fueron clasificadas como óptimas con respecto a la forma anatómica, el 84% con respecto a la integridad marginal, el 77% sin decoloración marginal y el 93% presentaron color adecuado. Además ningún paciente presentó sensibilidad postoperatoria, evidenciando un buen comportamiento clínico después de dos años.

Además de eso, las resinas a base de silorane presentan menor adherencia microbiana⁵¹, reducida microfiltración⁵², ausencia de liberación de sustancias en agua⁵³, adecuada adaptación marginal⁵⁴, mayor resistencia a la flexión y mayor resistencia a la fractura y ausencia de BIS-GMA (bisfenol A)³²

Hay pocos estudios valorando los efectos biológicos de los nuevos sistemas restauradores basados en resinas de tipo Silorane^{27,55,56,12}, y los que hay están realizados básicamente *in vitro*, en cultivo de células.

Kostoryz et al., en 1999⁵⁷, realizaron un estudio *in vitro*, en cultivo de células L929. En él no observaron efectos citotóxicos en los componentes polimerizados en base a resina epoxi. Sin embargo, los resultados de algunos trabajos con relación a la biocompatibilidad de la molécula oxirane son contradictorios^{58,59}. En 2004, Schweikl et al. evaluaron el potencial mutagénico de diferentes moléculas de siloranes y oxiranes, en cultivo de fibroblastos de hámster V79B, observando diferentes grados de actividad mutagénica cuando analizaban oxiranes, sin embargo, cuando analizaban diferentes moléculas de siloranes, no observaban inducción de mutaciones genéticas.

Actualmente, varios de los nuevos composites de baja contracción pretenden reducir la cantidad de monómeros sin polimerizar para minimizar la respuesta biológica. En 2007, Brackett et al.¹² evaluaron la citotoxicidad de diferentes resinas compuestas en contacto directo con fibroblastos de ratas BALB-c, empleando el test MTT. Concluyeron que los materiales con nuevas formas de polimerización son prometedores, ya que reducen la liberación de componentes no polimerizados y la citotoxicidad.

Krifka et al. (2011)⁶⁰ recientemente publicaron un estudio sobre el estrés oxidativo y la citotoxicidad generada por los composites dentales en cultivo de células de pulpa humana. Los composites dentales son una fuente de monómeros residuales. En este trabajo la hipótesis es que la generación de ROS(reactive oxygen species) producida por los extractos de composites dentales pueden sobrepasar la capacidad de las células de mantener su homeostasis y llevarlas a la muerte. Midieron por lo tanto, la generación de ROS y la citotoxicidad. Para ello expusieron cultivos de células de pulpa humana a extractos de resinas dentales con base metacrilato y a una resina con base silorane. Hicieron dos grupos de cada material, polimerizando las muestras sin cubrir o cubiertas con una película de poliéster(evitando la formación de capa inhibida).

De forma generalizada, los materiales con base metacrilato produjeron mayor citotoxicidad, que se vio reducida en los grupos en los que las muestras se cubrieron con la película de poliéster durante la polimerización. Por el contrario la resina con base silorane no produjo efectos citotóxicos. La generación de ROS en los materiales con base metacrilato, siguió el mismo patrón que los efectos citotóxicos. La generación de ROS en los cultivos celulares expuestos a la resina con base silorane fue muy baja.

Varios estudios recientes han evaluado las propiedades físico-químicas y mecánicas de las resinas a base de Silorane^{61,32,37,62,35,34}, sin embargo, los estudios relativos a sus efectos biológicos, en su mayoría en cultivo de células *in vitro*, son escasos.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Teniendo en cuenta, la importancia clínica, de los materiales restauradores, y que hasta el momento en que se realiza este trabajo, no se han encontrado estudios independientes publicados, evaluando respuesta tisular en tejido conjuntivo subcutáneo, ni la compatibilidad tisular, *in vivo*, de estos nuevos sistemas restauradores, nos planteamos la necesidad de validar la biocompatibilidad de estos nuevos materiales. Por tanto los objetivos del presente estudio son:

1. Evaluar la compatibilidad tisular de un sistema de resina en base a silorane (Filtek™ Silorane) y una resina de nanopartículas en base a metacrilato (Filtek™ Supreme XT), después de la implantación en tejido subcutáneo de ratones Camundongos Isogénicos BALB/c.

2. Hacer un estudio comprobatorio para evaluar, *in vivo*, la compatibilidad tisular de un sistema de resina en base a silorane (Filtek™ Silorane) y una resina de nanopartículas en base a metacrilato (Filtek™ Supreme XT), en cavidades profundas de dientes de perros.

MATERIAL Y MÉTODO

III. MATERIAL Y MÉTODO

III.1 - Tolerancia tisular. Estudio en Camundongos Isogénicos: Respuesta en Tejido Conjuntivo Subcutáneo

Previamente el proyecto de investigación fue aprobado por la Comisión de Ética para el Uso de Animales – *Campus de Ribeirão Preto* – Universidad de São Paulo. Los criterios utilizados para llevar a cabo el experimento y evaluar la reacción tisular se basan en aquellos recomendados por la norma (ISO 10993-6, 1994).

III.1.1. Descripción y distribución de la muestra

Se utilizaron 135 ratones Camundongos Isogénicos de linaje BALB/c, machos, de 6 a 8 semanas de edad, 15 a 20 gr. de peso, provenientes del Biotério Central de la Facultad de Medicina de Ribeirão Preto – USP, los cuales fueron divididos en 15 grupos con tres períodos experimentales. Cada animal recibió un implante en la región dorsal conteniendo uno de los materiales testados (grupos experimentales) o un tubo vacío (grupos control).

La división de los grupos, los materiales empleados, el número de animales y los períodos experimentales se encuentran en la tabla 1.

Tabla 1 – Distribución de los grupos, materiales, número de animales y períodos experimentales, en el estudio de Camundongos Isogénicos

GRUPOS	DESCRIPCIÓN	NÚMERO DE ANIMALES	PERÍODOS
I	Filtek™ Silorane	10	7 días
II	Filtek™ Silorane	10	21 días
III	Filtek™ Silorane	10	63 días
IV	Bonding de Filtek™ Silorane	10	7 días
V	Bonding de Filtek™ Silorane	10	21 días
VI	Bonding de Filtek™ Silorane	10	63 días
VII	Primer de Filtek™ Silorane	10	7 días
VIII	Primer de Filtek™ Silorane	10	21 días
IX	Primer de Filtek™ Silorane	10	63 días
X	Filtek™ Supreme XT	10	7 días
XI	Filtek™ Supreme XT	10	21 días
XII	Filtek™ Supreme XT	10	63 días
XIII	Tubo vacío	5	7 días
XIV	Tubo vacío	5	21 días
XV	Tubo vacío	5	63 días

III.1.2. Preparación de los Tubos de Polietileno

Fueron utilizados tubos de polietileno de 1mm de diámetro interno, los cuales tienen una extremidad sellada con el auxilio de una pinza clínica calentada y son cortados con 1cm de longitud (figura 1). Después de que fueran esterilizados con óxido de etileno, los tubos se rellenaron con los materiales que iban a ser testados. La manipulación de los materiales se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante (figura 2), bajo condiciones de asepsia e inmediatamente antes del relleno de los tubos y su implantación.



Figura 1 - Tubos de Polietileno esterilizados, con algodón en el interior.

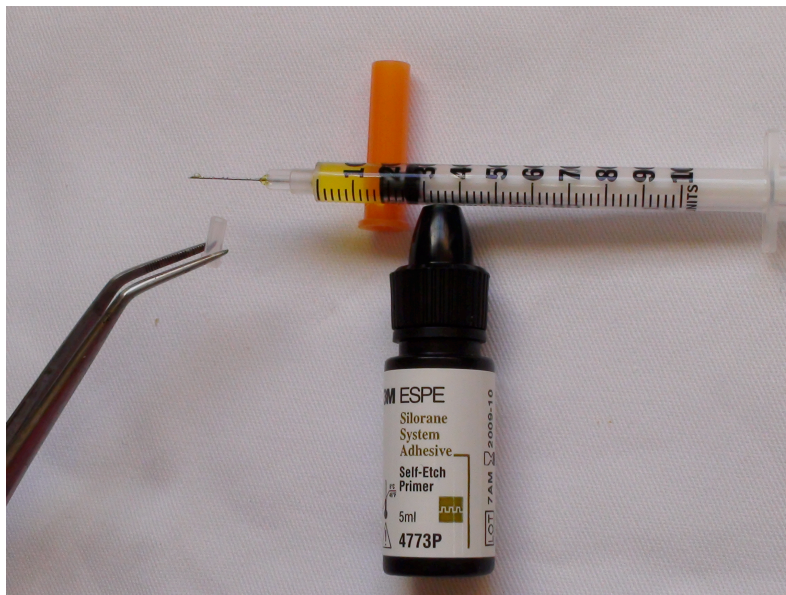


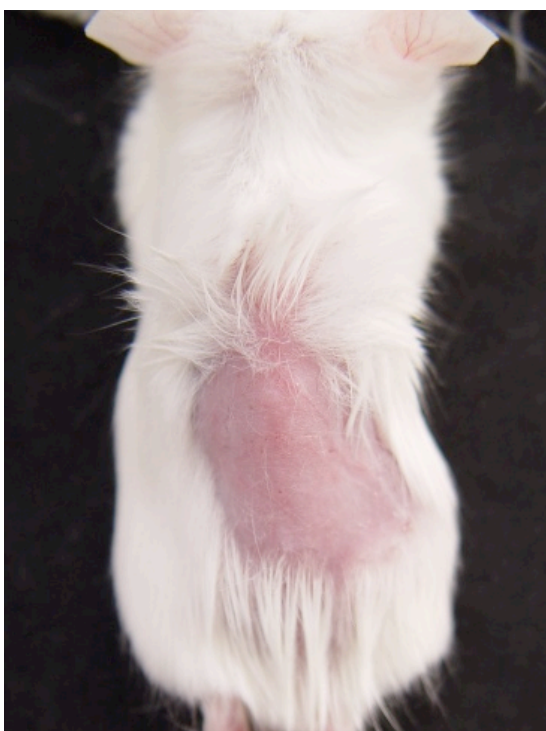
Figura 2 - Preparación de la muestra en los tubos de polietileno. En el caso del adhesivo de Silorane se inyectaba en el tubo se polimerizaba e inmediatamente se colocaba en dorso del ratón.

III.1.3. Procedimiento operatorio

Para la cirugía, los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral al 10% (1ml/100g peso corporal del animal) inyectado por vía intraperitoneal. (figura 3).



Figura 3 Hidrato de cloral al 10% utilizado para anestesiarse los animales de experimentación.



Luego se realizó la tricotomía de la piel del dorso y la antisepsia de la región con gluconato de clorhexidina 1%. (figura 4)

Figura 4 Tricotomía de piel de Camundongos Isógenicos.

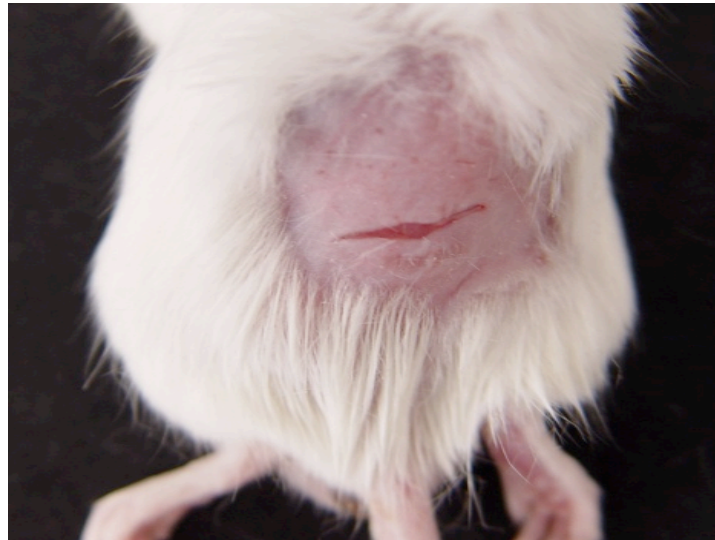


Figura 5 Incisión de 1 cm.

El procedimiento quirúrgico consistió en una incisión de 1 cm, hecha con unas tijeras quirúrgicas en la región lumbar de la espalda del animal, seguido por disección con tijeras romas.(figura 5). Después de colocar el tubo en el interior del tejido, con la ayuda de una pinza clínica, la piel fue suturada (4-0 Vicryl – Ethicon -Johnson & Johnson).



Figura 6a. Instrumento para colocar el tubo. **Figura 6b** Colocando el tubo en el Camundongo.



Figura 7 Sutura

Los animales se mantuvieron en el Bioterio de la Facultad de Odontología de Ribeirão Preto – USP durante los períodos experimentales, con comida y agua ad libitum durante el período experimental. Fueron observados periódicamente para comprobar que no hubiera anomalías locales, sistémicas, ni de comportamiento.

Al final de cada período experimental (7, 21 y 63 días), 10 animales de cada grupo experimental y 5 animales de cada grupo control (7, 21 y

63 días) fueron anestesiados de nuevo, para extraer cuidadosamente el implante y la porción de tejido subcutáneo y la piel adyacentes. Seguidamente los animales fueron sacrificados por sobredosis de anestésico. El tejido extraído fue fijado en formol al 10% y sometido al procesamiento histotécnico de rutina. (figura 8 a,b,c,d,e,f,g,h)



Figura 8a. Anestesia previa a la extracción de la muestra.



Figura 8b. Tricotomía para realizar la extracción de fragmento.

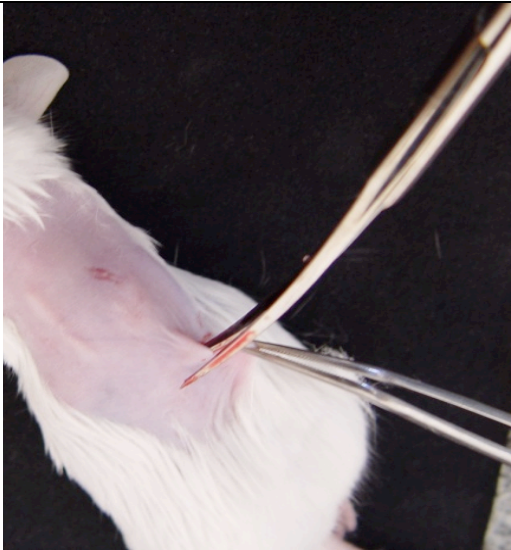


Figura 8c. Incisión para separar la piel.

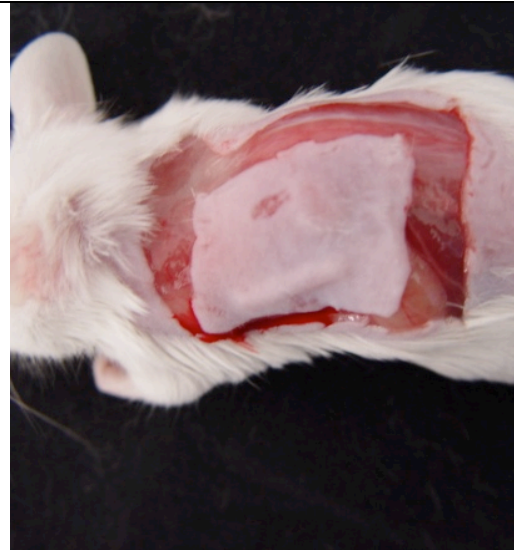


Figura 8d. Separación de la muestra de asegurándonos que incluye tejido suficiente alrededor de la misma.

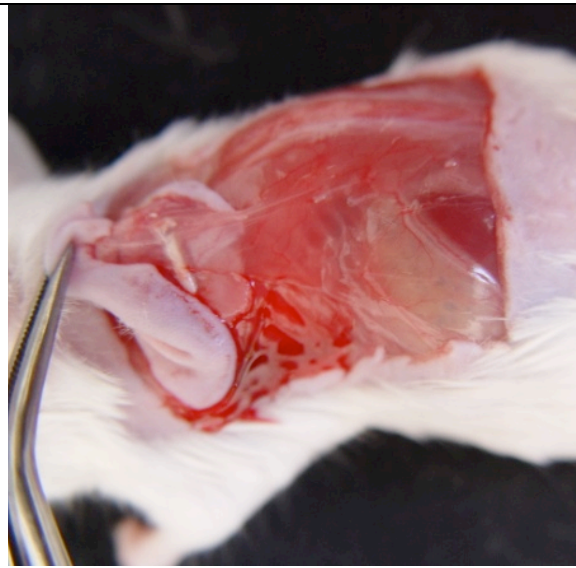


Figura 8e. Extracción cuidadosa del tejido subcutáneo y la piel adyacente.

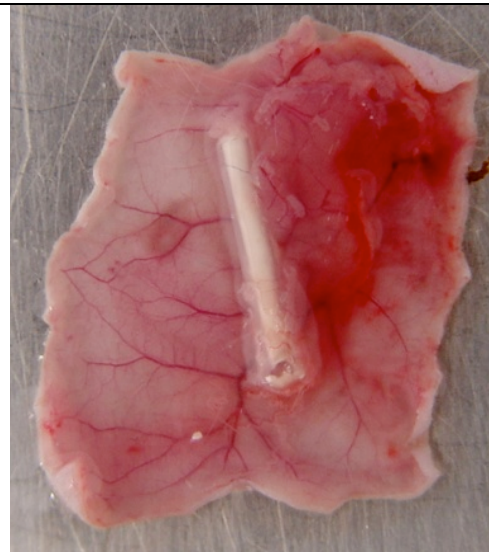


Figura 8f. Muestra de tejido subcutáneo y el tubo de polietileno.

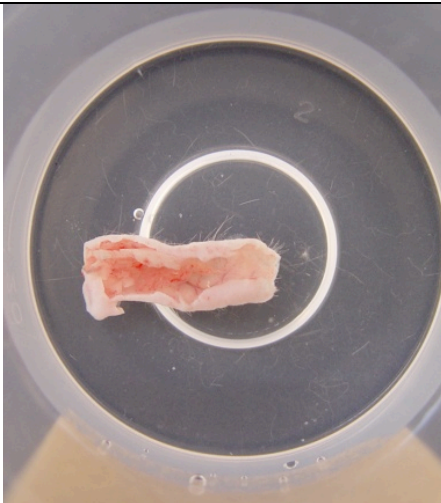


Figura 8g



Figura 8h. Fijación en formol al 10%

III.1.4. Procesamiento histotécnico

Las muestras fueron sometidas a tratamiento histotécnico de rutina, incluidas en parafina, y cortadas de forma seriada con un espesor de 5 micrómetros, orientados paralelamente al eje longitudinal del tubo. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina.

III.1.5. Análisis microscópico descriptivo

En cada espécimen fueron analizados los fenómenos morfológicos tisulares y celulares por medio de microscopia óptica. Se consideraron los macrófagos y las células gigantes inflamatorias multinucleadas, así como fibroblastos y fibras colágenas. Otro aspecto morfológico analizado fue la cantidad de capas de células en el eje mayor del tejido reaccional, para correlacionarlo posteriormente con las medidas morfológicas realizadas. Se describió la reacción tisular observada a los materiales testados y a los grupos control en diferentes períodos, sin especificar cada uno de los especímenes, pero caracterizando al grupo considerado en su conjunto.(figura 9)

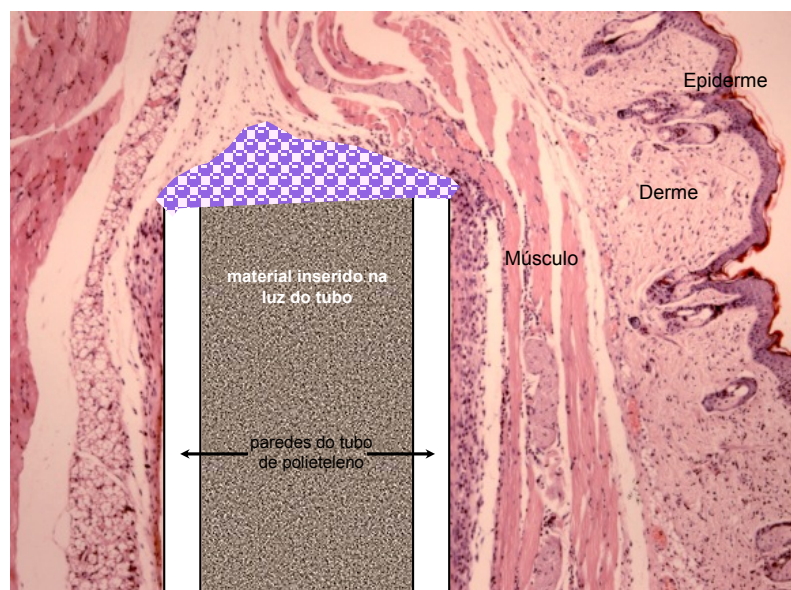


Figura 9. Esquema ilustrativo de los componentes de la valoración de la reacción tisular frente a la implantación de los tubos de polietileno de los diferentes grupos.

III.2. RESPUESTA TISULAR POSTERIOR A LA PROTECCIÓN PULPAR EN DIENTES DE PERROS

Todo el estudio fue realizado de acuerdo con las directrices institucionales sobre el empleo y cuidado de animales. El diseño del estudio y los parámetros histológicos de la reacción del tejido pulpar y periapical, de acuerdo con las normas de la Organización Internacional de normalización y evaluación biológica de materiales dentales. (International Organization for Standardization (ISO) 7405:2008.)⁶³

III.2.1. Descripción y distribución de la muestra

Para la realización de este experimento fueron seleccionados los segundos y terceros premolares superiores y segundos, terceros y cuartos premolares inferiores de 5 perros de 12 a 18 meses de edad, de ambos géneros, sin raza definida, pesando en promedio 15 kilos, provenientes del Biotério Central del Campus de la Universidad de São Paulo en Ribeirão Preto. Después de la selección de los animales, estos permanecieron en cuarentena, para la administración de antiparasitarios y vitaminas, de la vacuna antirrábica y quintuple, de manera que adquirieran las condiciones físicas ideales para la realización de los experimentos. Los perros fueron mantenidos con acceso libre para beber agua y con dieta estándar, de laboratorio, durante todo el período de experimentación.

Los 50 dientes fueron divididos en 6 grupos:

- **Grupos I y IV (experimental)** (n=10 dientes; 20 raíces/grupo), en el cual fue utilizado el sistema Filtek™ Silorane (3M Espe, St. Paul, USA), en los períodos de 10 y 90 días.

- **Grupos II y V (experimental):** (n=10 dientes; 20 raíces/grupo), en el cual fue utilizado el sistema Filtek™ Supreme XT (3M Espe, St. Paul, USA), en los períodos de 10 y 90 días.

- **Grupo III y VI (control):** (n=5 dientes; 10 raíces/grupo), en el cual fue utilizado un cemento a base de óxido de zinc y Eugenol (IRM), en los períodos de 10 y 90 días.

III.2.2 Procedimiento operatorio

Inicialmente los animales fueron pre-anestesiados, por medio de una inyección intravenosa de 1mg/kg de peso de Neozine (Aventis), 15 minutos antes del acto operatorio. A continuación, fue inducida la anestesia con Zoletil® 50 (Virbac de Brasil) en dosis de 0.1ml/kg de peso, por vía intravenosa, para facilitar el pasaje de la sonda endotraqueal, necesaria para la realización de la anestesia por inhalación. (figura 10 a,b,c,d). Después de la intubación con sonda endotraqueal, el mantenimiento de la anestesia fue realizado con Isuflurano (Abott Laborat. Do Brasil Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil), utilizando un aparato para anestesia por inhalación Takaoka KT-20 (São Paulo, SP, Brasil). (figura 11) a,b,c,d)



Figura 10a,b,c,d. Inducción de anestesia por vía intravenosa, antes de la intubación.



Figura 11 aparato para anestesia por inhalación Takaoka KT-20 (São Paulo, SP, Brasil)

Durante todo el acto operatorio, los animales se mantuvieron con perfusión de solución isotónica de cloruro de sodio al 0,9% (Glicolabor Industria Farmacéutica Ltda., Ribeirão Preto, Brasil).

A continuación fue realizado el examen radiográfico periapical de los dientes a tratar, utilizando un dispositivo para estandarizar la toma de cada radiografía en perros, descrito por Cordeiro et al. (1995)⁶⁴. Fueron utilizadas películas radiográficas periapicales tamaño 2 □

(Eastman Kodak Comp., Rochester, NY, EUA) y aparato de rayos X odontológico Heliodont[□] (Siemens, EUA), con 60 kVp y 10 mA con un tiempo de exposición de 1 segundo. Las radiografías fueron reveladas por medio de un procesador automático y archivadas en carpetas plásticas.

Fue realizada la profilaxis dental con copas y piedra pómez (SS White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, Brasil), seguida por anestesia infiltrativa (Scandicaina, Septodont Distribuidora DFL Ind. Com. Ltda., Rio de Janeiro). Todo el instrumental utilizado en los procedimientos operatorios fue esterilizado en autoclave a 121°C, durante 20 minutos. Fue realizado el aislamiento absoluto del campo operatorio con dique de goma y la antisepsia con peróxido de hidrogeno al 3%, seguido de la aplicación de gluconato de clorhexidina al 1.0%.

Para hacer las protecciones pulpares indirectas se prepararon, cavidades clase V en la cara vestibular de cada diente, con auxilio de una fresa de bola de diamante n° 1015 (KG Sorensen, São Paulo) esterilizada y con la ayuda de una pieza de mano de alta rotación bajo irrigación abundante, la profundidad

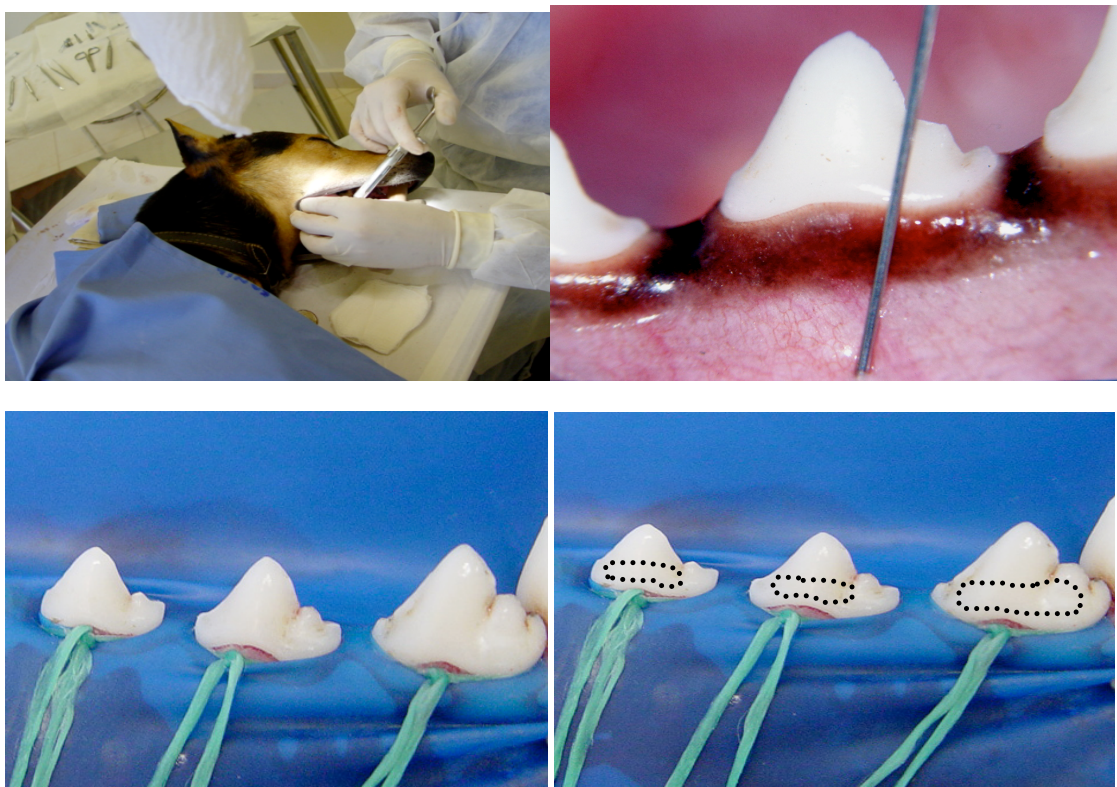


Figura 12^a,b,c,d. Anestesia infiltrativa de refuerzo, aislamiento y diseño de cavidades.

de las cavidades fue realizada de manera uniforme hasta que restase una espesura de 0.5 a 1mm de dentina remanente. Cada 4 preparaciones cavitarias se empleó una fresa de diamante nueva para asegurar la eficacia de corte y evitar el sobrecalentamiento. Para evitar el calor excesivo, durante todo el proceso de preparación cavitaria, se realizaron movimientos intermitentes de las fresas. Las cavidades fueron irrigadas abundantemente con suero fisiológico estéril (Cloruro de sodio a 0,9%, Glicolabor Ind. Farm. Ltda., São Paulo, Brasil), para eliminar restos de esmalte y dentina. A pesar del cuidadoso protocolo seguido en las preparaciones cavitarias, en tres especímenes del grupo IV y en cuatro especímenes del grupo V hubo exposición pulpar.

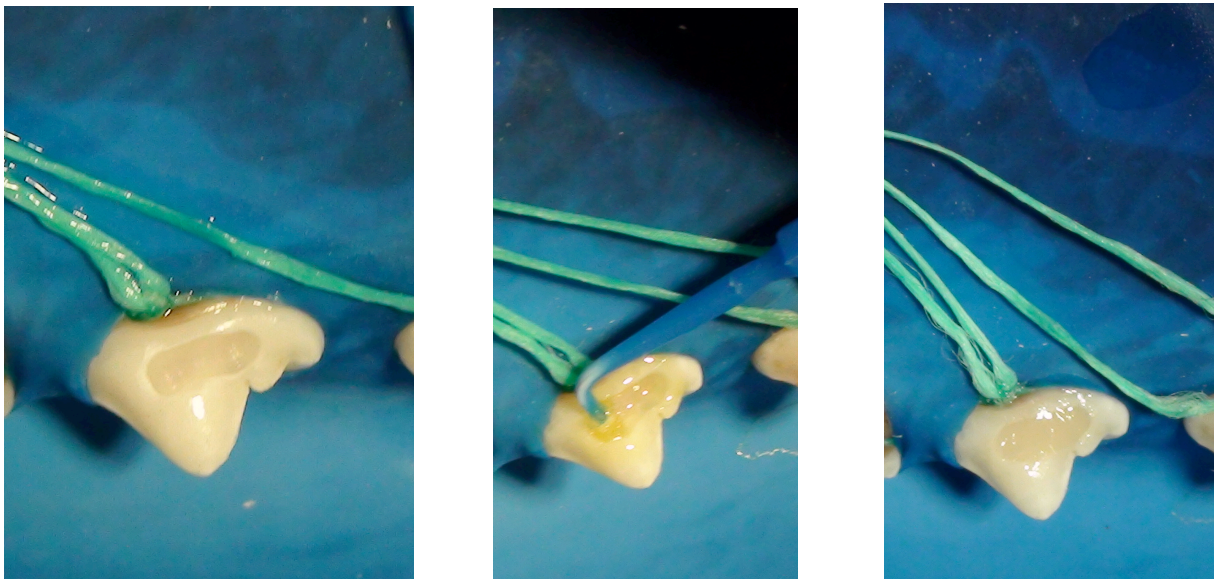


Figura 13 a, b, c, Cavity de clase V. Colocación del adhesivo, Obturación con Filtek™ Silorane.

Las cavidades fueron restauradas con los materiales correspondientes a cada uno de los grupos (I a VI), empleados de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para evaluar todas las variables del estudio en el mismo animal y en diferentes cuadrantes, cada hemiarcada fue distribuida aleatoriamente para los diferentes protocolos experimentales.

Cada hemiarcada fue radiografiada y los animales fueron mantenidos en observación durante todo el período experimental.

Transcurridos los períodos experimentales recomendados, de 10 y 90 días de los procedimientos operatorios, los dientes de cada grupo fueron sometidos a un examen radiográfico estandarizado y los animales fueron sometidos a eutanasia por sobredosis anestésica.

III.2.3 Procesamiento histotécnico

Los maxilares y mandíbulas fueron disecados con auxilio de un bisturí, reducidos en su volumen y las piezas fueron lavadas en agua corriente. Cada diente tratado fue removido junto con el hueso y el tejido blando adyacente, en un único bloque, utilizando un disco de diamante, bajo constante refrigeración con agua, y posteriormente fueron fijados en una solución a base de formol al 10% por 48 horas. Transcurrido este período, fue realizada la desmineralización utilizando una solución a base de EDTA. El proceso de desmineralización fue activado con la ayuda de un horno de microondas (Sharp Carousel) a temperatura de 30°C, en potencia media/máxima, para evitar alteraciones tisulares. Las piezas fueron irradiadas dentro de un recipiente de vidrio conteniendo agua y hielo, cada 10 minutos, por un período de 4 horas/día, con intervalos de 5 minutos entre las irradiaciones. A cada 6 irradiaciones las piezas fueron lavadas con una solución a base de cacodilato de sodio 98% tamponado en pH 7,4. La completa desmineralización de las muestras fue evidenciada por medio de radiografías de cada pieza y obtenida en aproximadamente 40 días. Concluida la desmineralización, las piezas fueron lavadas en agua corriente por 24 horas, deshidratadas en concentraciones crecientes de alcohol, diafanizadas en xilol e incluidas en parafina de acuerdo con la rutina histológica.

Por medio del micrótopo, los bloques que contenían los dientes individualizados fueron reducidos a cortes seriados longitudinales con 5 micrómetros de grosor. Para el análisis histopatológico, la tinción de las láminas

fue obtenida por medio de Hematoxilina y Eosina (HE), tricómico de Mallory y por el método de Brown & Brenn.

III.2.4. Análisis microscópico

El análisis microscópico fue realizado subjetivamente, por medio de microscopia óptica (Microscopio AXIO IMAGER.M1, acoplado a una cámara AXIOCAM MRc5 - Zeiss, Gottingen, Germany), sin conocimiento previo de cual espécimen correspondía al grupo experimental o al grupo control. Fueron utilizados, para la evaluación de las láminas, los criterios establecidos por la ISO 7405:2008, así como otros parámetros utilizados por nuestro grupo de investigación^{65,66}. Para cada serie fue registrada la descripción completa de todas las características de dentina, pulpa y tejidos periapicales de acuerdo con los siguientes aspectos:

- Capa odontoblástica: 1. presente; 2. ausente.
- Respuesta pulpar inflamatoria: 1. ausente; 2 leve; 3. moderada; 4. severa.
- Respuesta periapical inflamatoria: 1. ausente; 2 leve; 3. moderada; 4. severa.
- Reabsorción de los tejidos mineralizados: 1. ausente; 2. leve; 3. moderado; 4. severa.
- Bacterias: 1. ausentes; 2. presentes.

III.3. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados por medio del programa estadístico Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad Software In., San Diego, California, EUA). Utilizando la prueba de Kruskal-Wallis y el post-test de Dunn. El nivel de significancia adoptado fue de 5%.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

A continuación exponemos los resultados de ambas partes del estudio, tras el análisis microscópico:

IV.1. Tolerancia tisular. Estudio en Camundongos Isogénicos: Respuesta en Tejido Conjuntivo Subcutáneo

Grupo 1- Filtek™ Silorane -7días

El tejido reaccional estaba constituido predominantemente por células fibroblásticas jóvenes, ovoides y fusiformes, con fibras de colágeno delicadas y discretamente organizadas. Entre los fibroblastos se encontraron macrófagos, aún de morfología monocitaria, neutrófilos y algunos eosinófilos. Se encontró gran cantidad de vasos sanguíneos neoformados. Fueron detectadas células gigantes multinucleadas inflamatorias de tipo cuerpo extraño, especialmente en el tejido en contacto con el material. El espesor del tejido reaccional fue de 10 a 20 capas celulares en estas muestras.

Grupo 2 - Filtek™ Silorane -21días

El tejido reaccional se presentó ligeramente más fibrosado que en el grupo de siete días, con fibras colágenas mejor definidas y organizadas en forma capsular. También se observaron muchos fibroblastos jóvenes y macrófagos. El componente vascular todavía estaba presente. Se encontraron distribuidos de forma difusa leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y eosinófilos. El espesor del tejido reaccional fue de 10 a 20 capas celulares en estas muestras.

Grupo 3- Filtek™ Silorane -63 días

El tejido reaccional se presentó delgado y bien organizado con una cápsula fibrosa bien definida por fibras colágenas. El componente vascular disminuyó, persistiendo algunos vasos como parte de la estructura tisular. Se encontró muy poco infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos y eosinófilos. Fueron detectadas pocas células gigantes multinucleadas inflamatorias de tipo cuerpo extraño, con pocos núcleos, en el tejido reaccional en contacto con el material. El espesor del tejido fue de 5 a 10 capas celulares en estas muestras.

Grupo 4- Adhesivo Filtek™ Silorane -7 días

El tejido reaccional estaba constituido predominantemente por gran número de fibroblastos jóvenes y macrófagos, todavía con morfología monocitaria. Se observaron neutrófilos y eosinófilos distribuidos de manera difusa. Las fibras colágenas eran finas aunque organizadas de forma rudimentaria en una capsula fibrosa. Fueron encontradas pocas células gigantes multinucleadas inflamatorias de tipo cuerpo extraño, pequeñas, presentando de 4 a 5 núcleos cada una. El espesor del tejido reaccional era de 15 a 20 capas.

Grupo 5 Adhesivo Filtek™ Silorane -21 días

El tejido reaccional estaba constituido por macrófagos en la superficie del material y a continuación por una franja fina de macrófagos y fibra colágenas bien organizadas como una cápsula fibrosa. Se observaron algunos leucocitos polimorfonucleares, neutrófilos y eosinófilos, difusamente distribuidos. El grosor del tejido reaccional fue de 10 a 15 capas celulares en esta muestra. En dos especímenes se encontró un granuloma de tipo cuerpo extraño alrededor de un fragmento extravasado en el tejido circundante.

Grupo 6 - Adhesivo Filtek™ Silorane -63 días

El tejido reaccional no presentó leucocitos polimorfonucleares, neutrófilos y eosinófilos. En contacto con el material se observan macrófagos en una única capa y a continuación fibroblastos maduros y una organización capsular

con densos haces de fibras colágenas. El grosor del tejido reaccional fue de 5 a 10 capas celulares en esta muestra.

Grupo 7- Primer Filtek™ Silorane 7 días

El tejido reaccional más próximo al material se encontraba infiltrado difusamente por muchos neutrófilos y algunos eosinófilos; entre ellos muchos macrófagos aún con morfología monocitaria. También se observaron células gigantes multinucleadas inflamatorias de tipo cuerpo extraño, pequeñas, con solo 4 o 5 núcleos, casi siempre en la interfase con el material. Más en la periferia, los fibroblastos jóvenes mostraban organización capsular bien definida con fibras colágenas finas. El grosor del tejido reaccional fue de 20 a 30 capas.

Grupo 8 - Primer Filtek™ Silorane 21 días

El tejido reaccional más próximo al material presentaba fibroblastos jóvenes y macrófagos principalmente en contacto con el material. Las fibras colágenas estaban bien organizadas y definidas en forma capsular. Las células gigantes multinucleadas inflamatorias de tipo cuerpo extraño, presentaron de media, solo 4 o 5 núcleos. Infiltrados difusamente se observaron algunos neutrófilos y eosinófilos. El grosor del tejido reaccional fue de 10 a 15 capas.

Grupo 9 - Primer Filtek™ Silorane 63 días

El tejido reaccional presentaba haces de fibras colágenas, estaban bien organizadas y definidas en forma capsular y entre las fibras se encontraban gran número de fibroblastos jóvenes y maduros. Los macrófagos se disponían principalmente en contacto con el material. Los leucocitos polimorfonucleares tipo neutrófilos eran raros y dispuestos de forma aleatoria. Las células gigantes multinucleadas inflamatorias de tipo cuerpo extraño, eran pequeñas y residuales. El grosor del tejido reaccional fue de 5 a 10 capas.

Grupo 10 - Filtek™ Supreme XT 7 días

El tejido reaccional más próximo al material presentaba predominantemente macrófagos, con algunas células gigantes multinucleadas inflamatorias de tipo cuerpo extraño, también se observaba infiltrado difuso de algunos neutrófilos y eosinófilos. La organización en forma capsular estaba presente con fibras colágenas cortas e irregulares. El grosor del tejido reaccional fue de 15 a 20 capas.

Grupo 11 - Filtek™ Supreme XT 21 días

El tejido reaccional más próximo al material presentaba fibroblastos jóvenes y macrófagos, las fibras colágenas estaban desorganizadas aunque con esquema capsular. Algunas células gigantes multinucleadas inflamatorias de tipo cuerpo extraño, estaban presentes en contacto con el material. Distribuidos aleatoriamente se observaron algunos leucocitos polimorfonucleares. El grosor del tejido reaccional fue de 10 a 20 capas.

Grupo 12 - Filtek™ Supreme XT- 63 días

El tejido reaccional presentaba una o dos capas de macrófagos que se disponían en contacto con el material, intercaladas con células gigantes multinucleadas inflamatorias de tipo cuerpo extraño, pequeñas, con solo 4 o 5 núcleos. Los leucocitos polimorfonucleares tipo neutrófilos y eosinófilos eran raros. Alrededor, se encontraban macrófagos y fibroblastos jóvenes y maduros entre haces de fibras colágenas organizadas y definidas en forma capsular. El grosor del tejido reaccional fue de 10 a 15 capas.

Grupo 13 - Tubo vacío - 7 días

El tejido reaccional estaba constituido por células fibroblásticas jóvenes ovoides o fusiformes, con fibras colágenas finas y discretamente organizadas. Entre las fibras se observaron macrófagos aún con morfología monocitaria, neutrófilos y algunos eosinófilos. Había gran número de vasos sanguíneos neoformados. Las células gigantes multinucleadas inflamatorias de

tipo cuerpo extraño, se presentaban especialmente en contacto con la luz del tubo. El grosor del tejido reaccional fue de 15 a 25 capas.

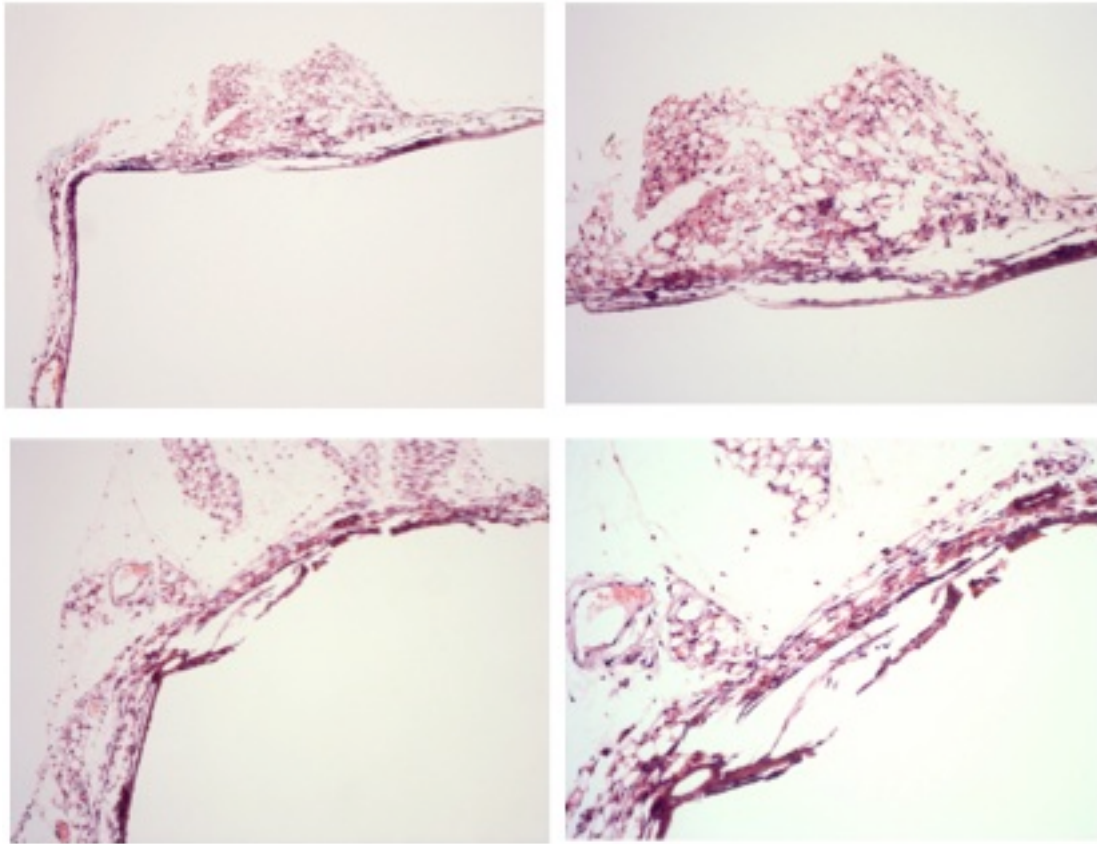
Grupo 14 - Tubo vacío - 21 días

El tejido reaccional se presentó ligeramente más fibrosado que el del grupo 7 días, con haces de fibras colágenas mejor definidas y organizadas de forma capsular con fibroblastos jóvenes y macrófagos. El componente vascular aún estaba presente. Los leucocitos polimorfonucleares tipo neutrófilos y eosinófilos se observaban distribuidos de forma difusa. El grosor del tejido reaccional fue de 10 a 20 capas.

Grupo 15 - Tubo vacío - 63 días

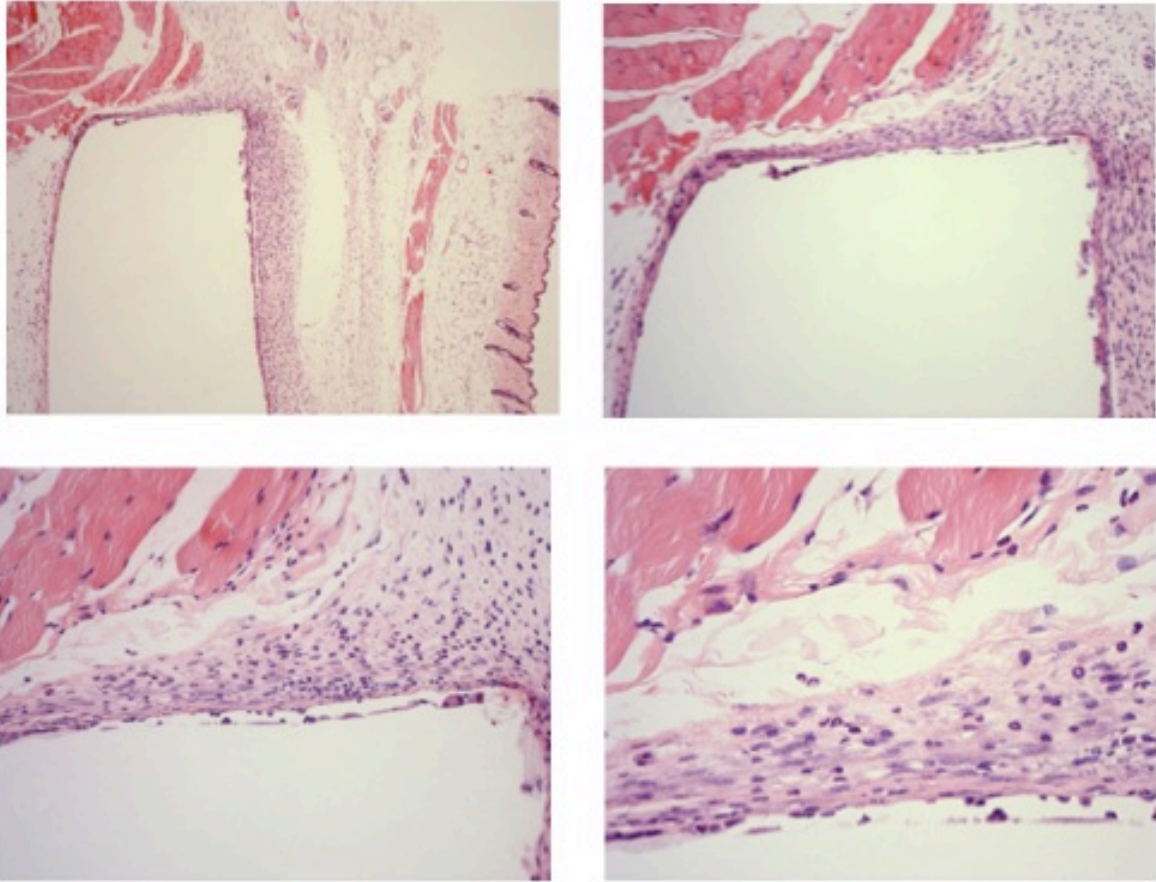
El tejido reaccional se observaba bien organizado y definido en forma capsular formada por finos haces de fibras colágenas, el componente vascular aún estaba presente con algunos vasos. El infiltrado de polimorfonucleares tipo neutrófilos y eosinófilos era muy escaso. Muy pocas células gigantes multinucleadas inflamatorias de tipo cuerpo extraño, pequeñas y con pocos núcleos, se observaron en la interface con el material. El grosor del tejido reaccional fue de 10 a 15 capas.

Figura 14: Grupo 1 Filtek Silorane -7 días



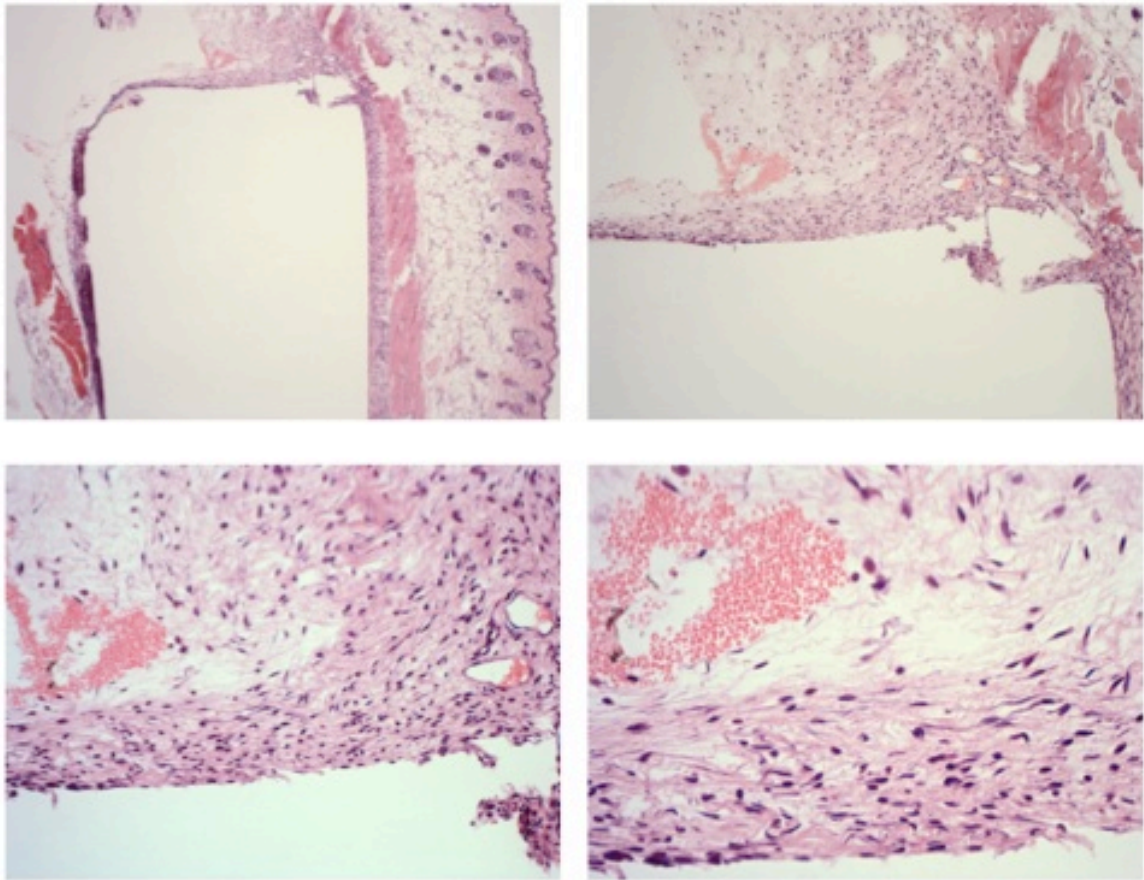
En los dos especímenes, a los 7 días, observamos que la reacción tisular a la luz del tubo vacío de polietileno se caracterizaba por una estrecha franja de tejido con fibras de colágeno bien definidas, entre las cuales encontramos fibroblastos y macrófagos, rico componente vascular e infiltración leve de leucocitos polimorfonucleares. (A y C = 10X, C y D = 20X).

Figura 15: Grupo 2 Filtek Silorane -21 días



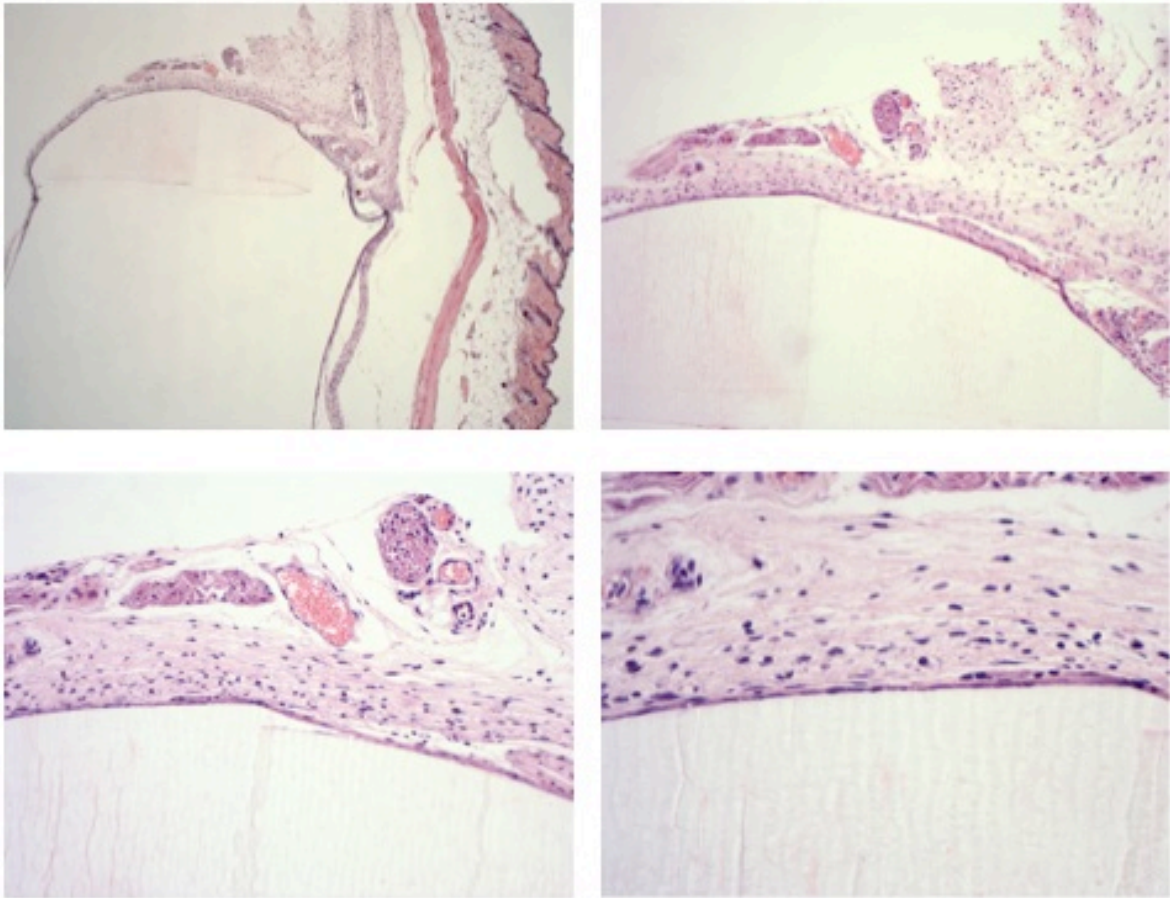
Grupo 2- La reacción tisular, a los 21 días, mostraban fibras colágenas bien organizadas formando un tejido capsular con gran cantidad de macrófagos. El infiltrado era difuso y escasos de leucocitos polimorfonucleares (A=4X;B=10X; C=20X; D=40)

Figura 16: Grupo 3- Filtek Silorane 63 días-



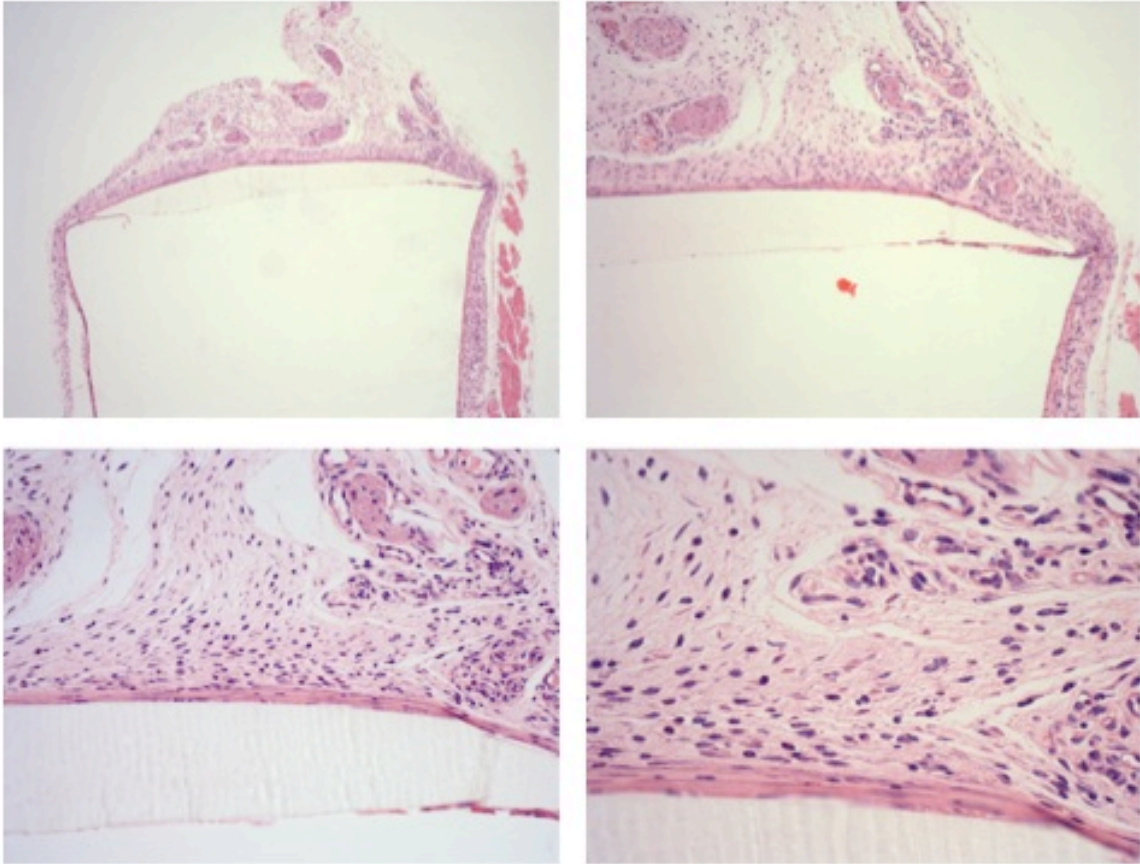
Grupo 3- La reacción tisular en este periodo experimental revelaba fibras colágenas bien definidas, fibroblastos y macrófagos entre ellas, además de una discreta presencia de leucocitos polimorfonucleares de tipo neutrófilos y eventuales eosinófilos. (A = 4X; B = 10X; C = 20X; D = 40X)

Figura 17:.. Grupo 4 – Bonding de Filtek Silorane 7 días-



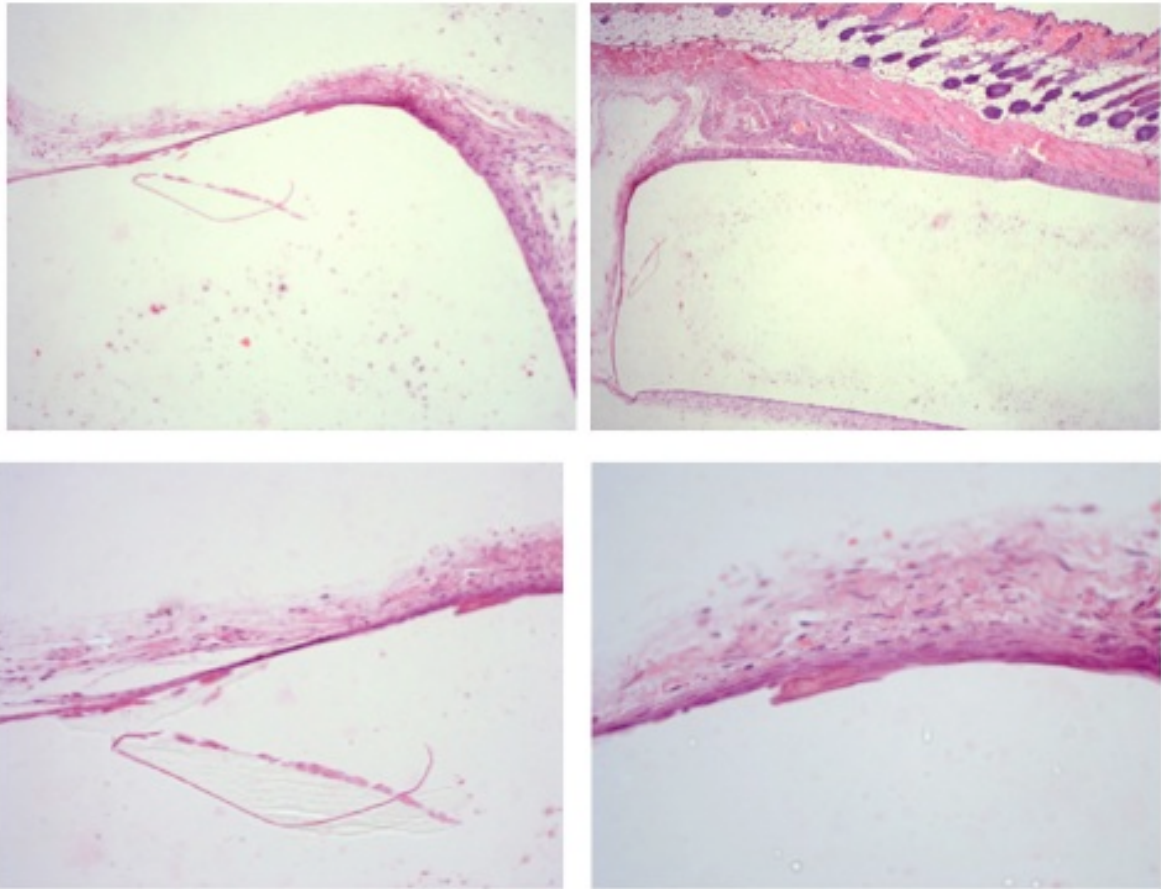
Grupo 4 – En la superficie del material a la luz del tubo fueron observados macrófagos formando una capa bien definida. Adyacente, fibroblastos jóvenes en la periferia formaban paquetes de fibras colágenas delicadas y organizadas en una capsula fibrosa. En la periferia se observan vasos sanguíneos y nervios(A = 4X; B = 10X; C = 20X; D = 40X)

Figura 18: Grupo 5 – Bonding de Filtek Silorane 21 días-



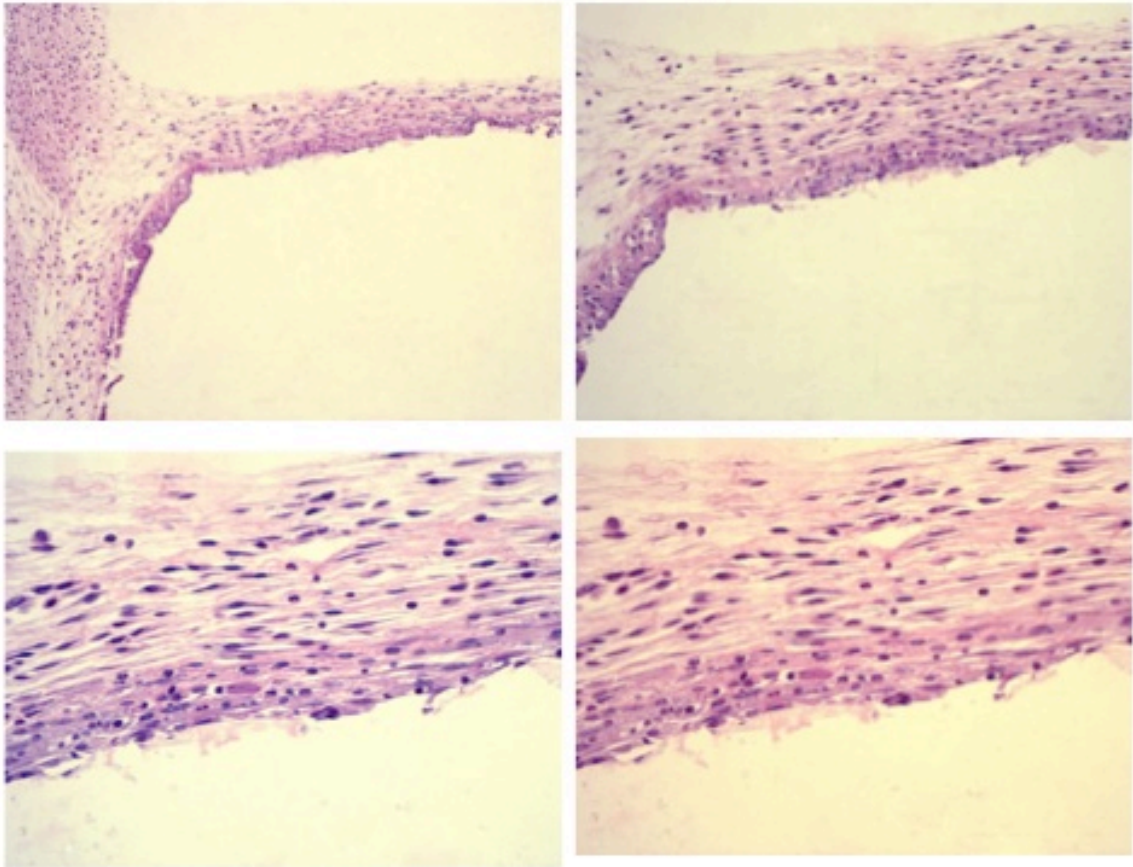
Grupo 5 – En este período experimental, en contacto con el material se encuentran macrófagos y fibroblastos jóvenes. Había residuales leucocitos polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos, y eosinófilos. A = 4X; B = 10X; C = 20X; D = 40X) –

Figura 19: Grupo 6 – Bonding de Filtek Silorane 63 días



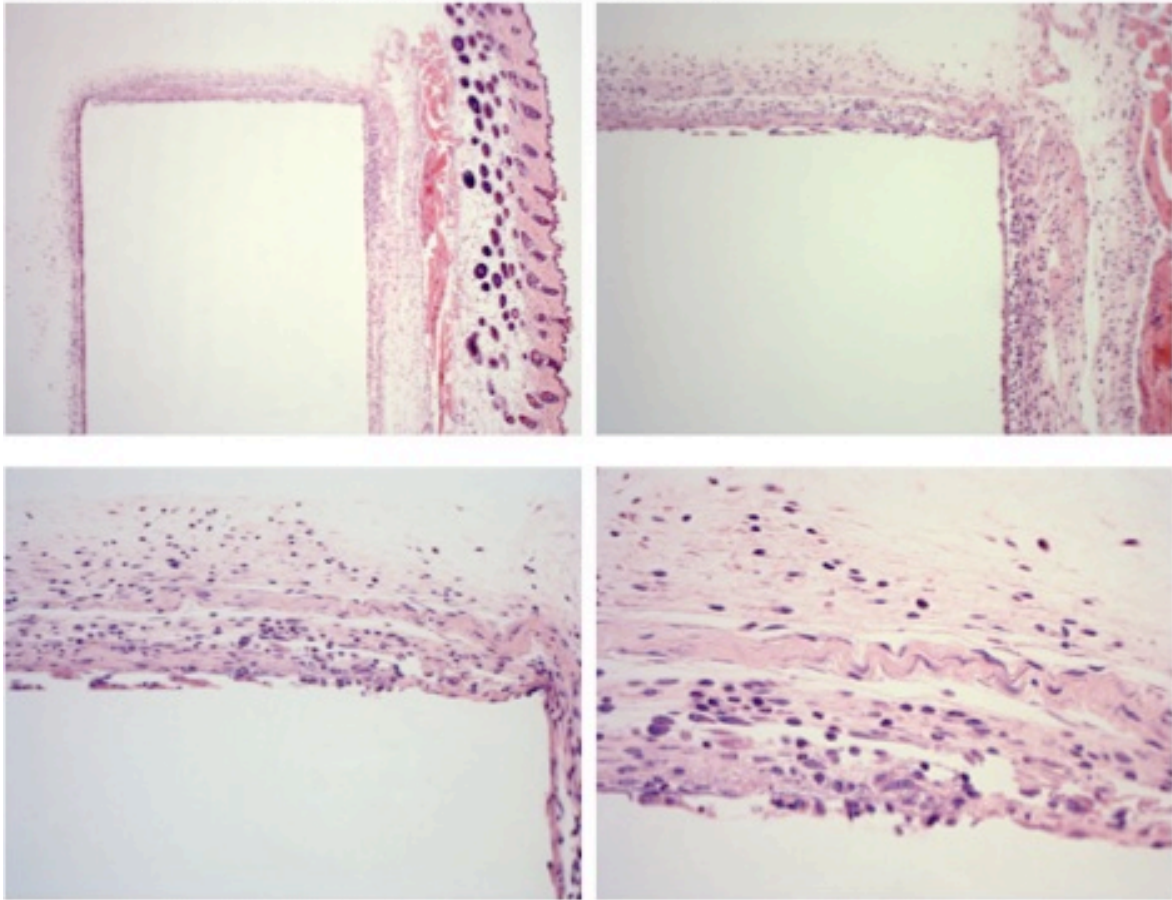
Grupo 6 – La reacción tisular a los 63 días estaba predominantemente constituida por fibroblastos y fibras colágenas con algunos macrófagos y sin presencia de leucocitos polimorfonucleares. (A = 4X; B = 10X; C = 20X; D = 40X)

Figura 20: Grupo 7 – Primer de Filtek Silorane 7 días



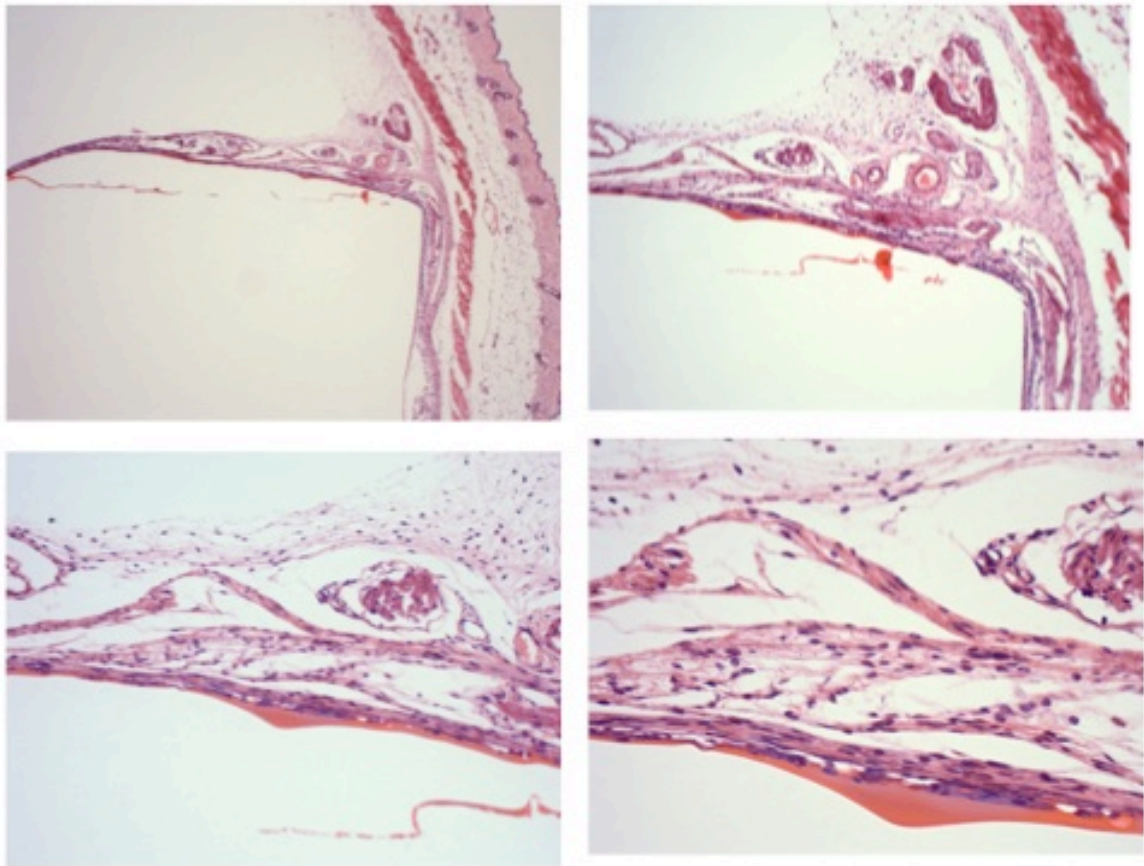
Grupo 7 -En el tejido en contacto con el material se observaron algunos macrófagos, y pocas células gigantes multinucleadas inflamatorias de tipo cuerpo extraño. Los neutrofilos y algunos eosinofilos están presentes en gran numero especialmente en capas de tejido reaccional en contacto con el material testado. (A = 4X; B = 10X; C = 20X; D = 40X)

Figura 21: Grupo 8 – Primer de Filtek Silorane 21 días



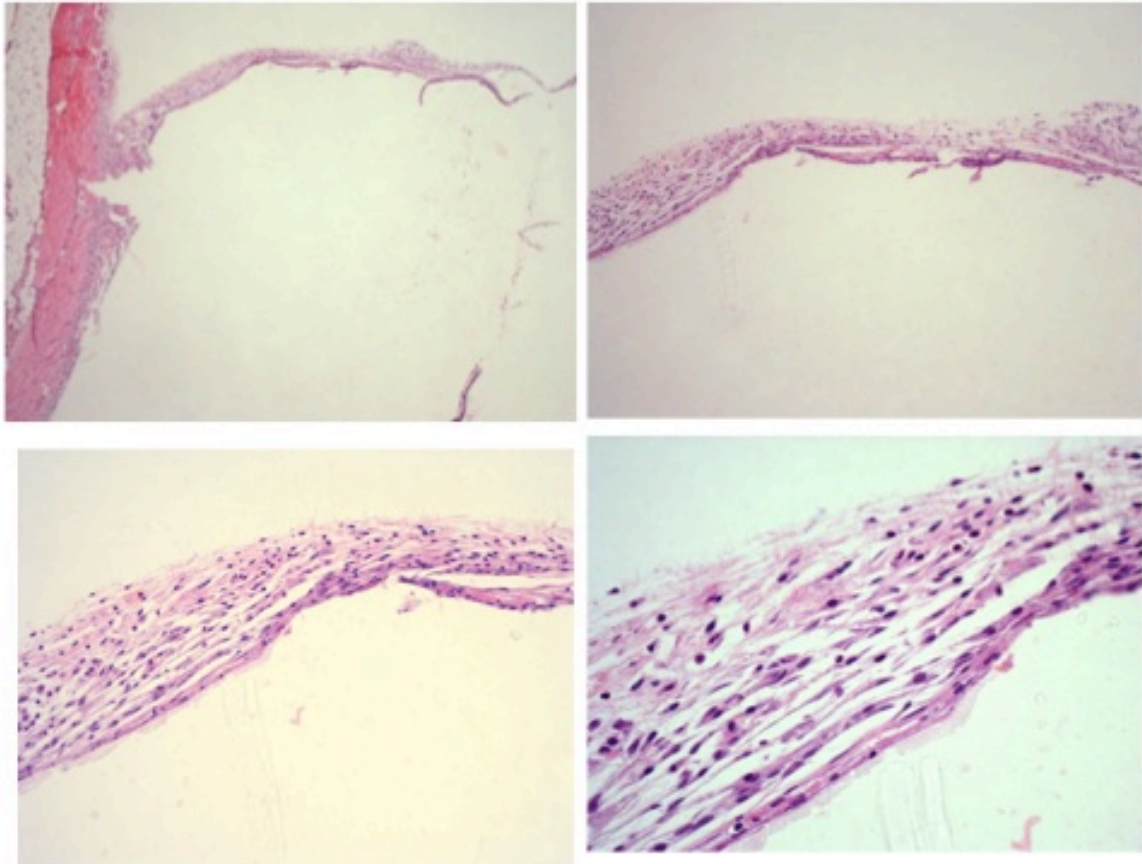
Grupo 8 – La reacción tisular reveló fibras colágenas organizadas con formación capsular . Entre las fibras aparecen fibroblastos y macrófagos, el espesor del tejido a los 21 días era más fina y estaba infiltrada por algunos leucocitos polimorfonucleares. Algunas células gigantes multinucleadas inflamatorias de tipo cuerpo extraño fueron observadas en la superficie del tejido. (A = 4X; B = 10X; C = 20X; D = 40X)

Figura 22: Grupo 9 – Primer de Filtek Silorane 63 días



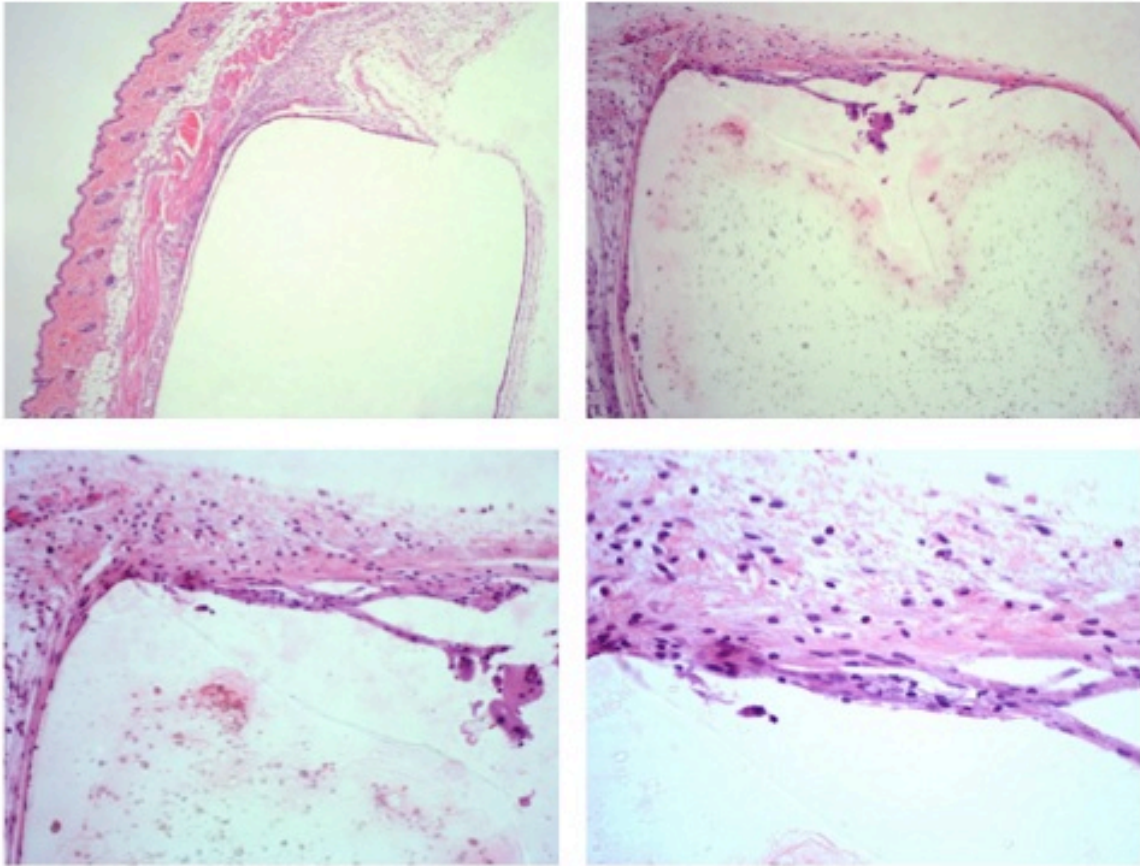
Grupo 9- A los 63 días la reacción tisular se mostró fina con fibras de colágeno bien definidas. Los fibroblastos jóvenes y macrófagos se encontraban entre las fibras y el material.

Figura 23: Grupo 10 – Primer de Filtek Supreme XT 7 días



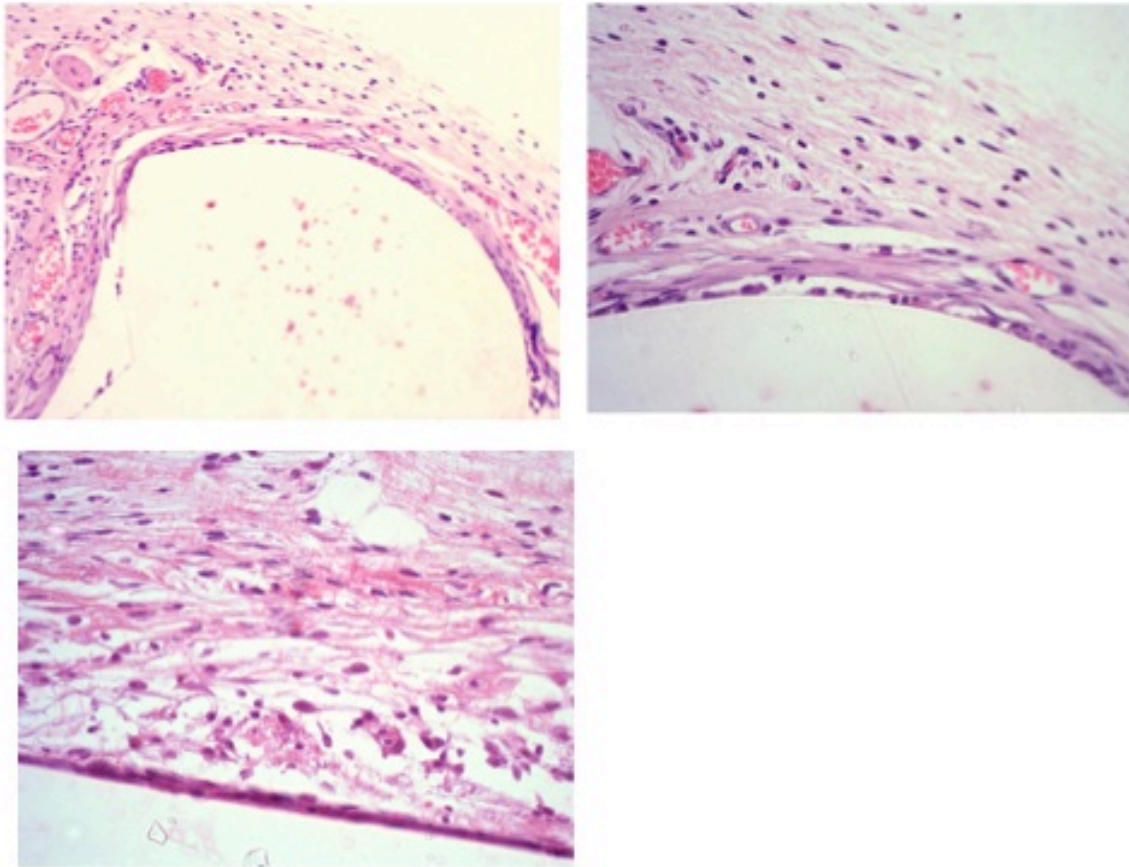
Grupo 10 – A los 7 días el tejido reaccional mostraba una organización capsular, fibras colágenas irregularmente posicionados, fibroblastos macrófagos, muchos leucocitos polimorfonucleares tipo neutrófilos y algunos eosinófilos.(A = 4X; B = 10X; C = 20X; D = 40X)

Figura 24: Grupo 11 – Primer de Filtek Supreme XT 21 días



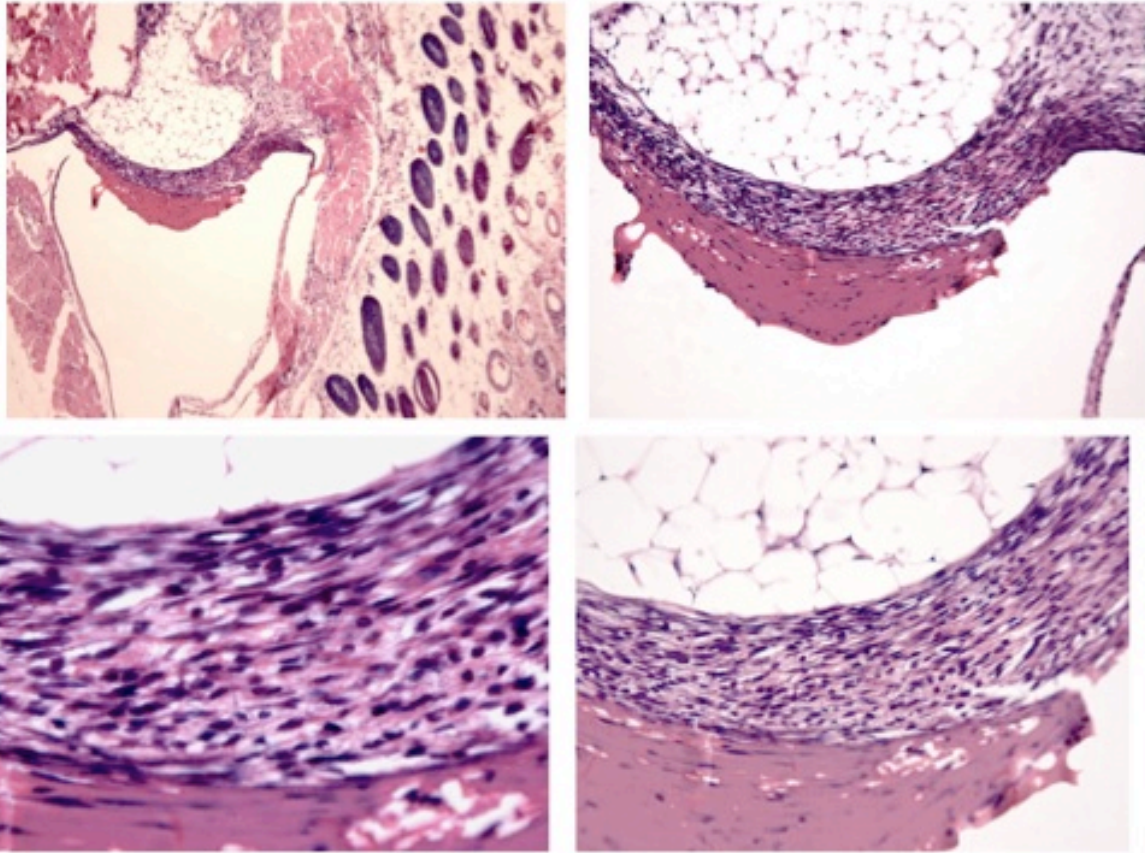
Grupo 11 – El tejido en contacto con el material, presentaba abundante fibras colágenas, con organización capsular bien definida y fina. Con macrófagos y fibroblastos.

Figura 25 Grupo 12 – Primer de Filtek Supreme XT 63 días



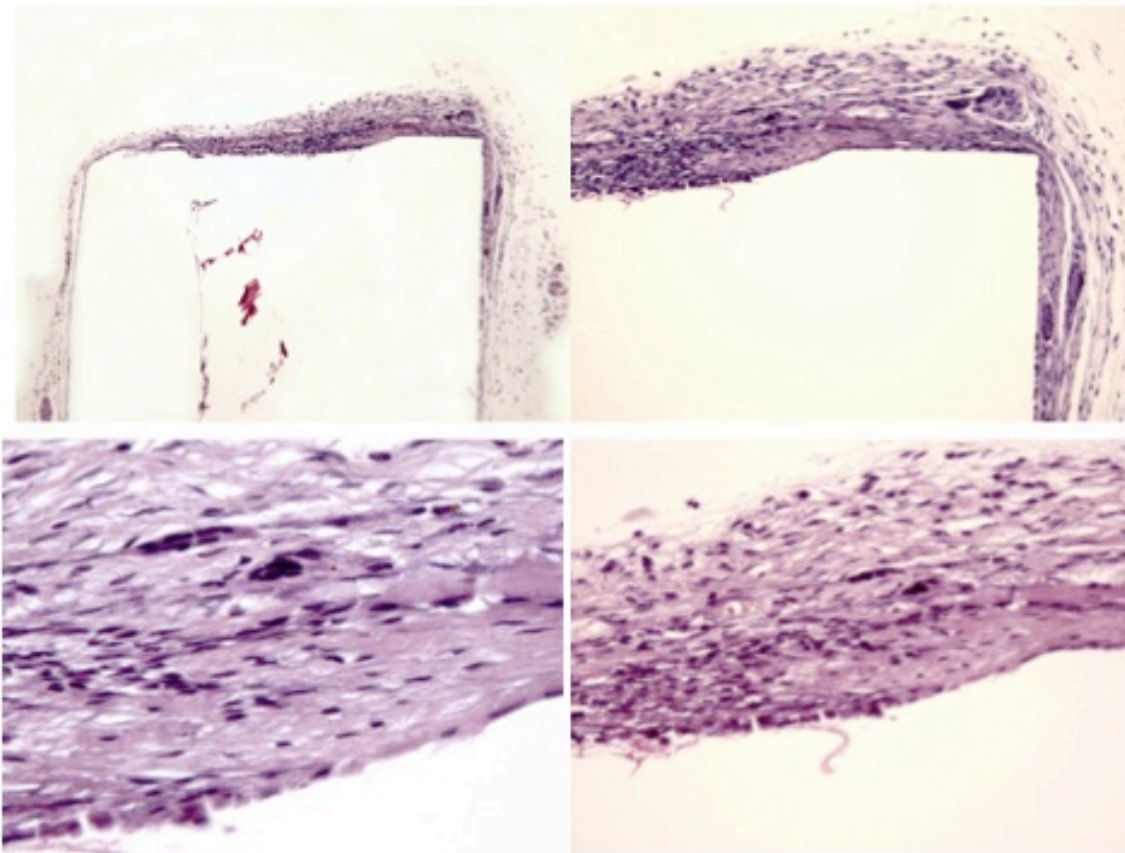
Grupo 12 – Los macrófagos están organizados formando una única capa de célula en la interface del tejido con el material a los 63 días. Adyacente encontramos fibroblastos y macrófagos. (A e B = 10X; C e D = 20X)

Figura 26 Grupo 13 – Tubo vacío



Grupo 13 – A los 7 días El tejido que envuelve el tubo de polietileno vacío presentó una franja de tejidos con fibras colágenas bien definidas de fibroblastos y macrófagos, rico componente vascular y discreta infiltración de leucocitos polimorfonucleares (A = 4X; B = 10X; C = 20X; D = 40X)

Figura 27: Grupo 14 – Tubo vacío



Grupo 14 La reacción tisular a los 21 días mostró fibras colagenas organizadas formando un tejido capsular con gran cantidad de macrófagos en infiltrado difuso y algunos leucocitos polimorfonucleares.

(A = 4X; B = 10X; C = 20X; D = 40X)

IV.2. Respuesta Tisular posterior a la Protección Pulpar en Dientes de perros

Grupos I y II - Filtek™ Silorane y Filtek™ Supreme XT (10 días)

Los grupos I y II presentaron resultados semejantes y por eso fueron descritos conjuntamente.

En las 40 raíces de los grupos I y II, el tejido pulpar estaba normal, habiendo sobre el tejido dentario una capa odontoblástica con áreas de vacuolización.

En la región superficial de la pulpa, el tejido conjuntivo estaba íntegro, con una suave congestión vascular y con fibroblastos estrellados.

La región apical era normal, estando el cemento regular, con presencia de cementoblastos en toda su superficie.

El ligamento periodontal presentó espesor normal, con una intensa presencia de fibras y con ausencia de células inflamatorias.

Sin presencia de microorganismos.

Grupo III – Cemento de Óxido de Zinc y Eugenol (10 días)

En las 10 raíces de este grupo se pudo observar un cuadro histopatológico semejante al descrito en los grupos I y II, excepto por la ligera presencia de células inflamatorias mononucleadas, en el interior de la pulpa, próxima a la dentina remanente.

La región apical y periapical se mostraron normales, semejantes a los grupos anteriores.

Sin presencia de microorganismos.

Grupo IV y V – Filtek™ Silorane y Filtek™ Supreme XT (90 días)

Los grupos IV y V presentaron resultados semejantes y por eso fueron descritos conjuntamente. Fueron evaluados en este período 17 raíces en el grupo IV y 16 raíces en el grupo V, en función de la presencia accidental de pequeñas exposiciones pulpares, durante la preparación cavitaria.

En todos los especímenes de estos 2 grupos el tejido pulpar estaba íntegro y mostraba una capa de odontoblastos normal sobre la dentina remanente y a lo largo de las paredes del canal radicular.

El tejido conjuntivo en toda la extensión de la pulpa se mantenía íntegro y denso, con un sistema vascular normal.

La región apical y periapical fueron normales en estructura y espesor.

No hubo presencia de células inflamatorias.

Sin presencia de microorganismos.

Grupo VI – Óxido de Zinc y Eugenol (90 días)

A los 90 días, el resultado histopatológico después de la protección pulpar indirecta con óxido de zinc y Eugenol en las 10 raíces fue semejante al observado en el período de 10 días, excepto por la presencia residual de células inflamatorias en el tejido pulpar adyacente a la dentina remanente.

Análisis estadístico

La comparación de los resultados mostró una diferencia significativa solo con relación a la respuesta inflamatoria pulpar y periapical en el período de evaluación de 10 días, donde las resinas Filtek™ Silorane y Filtek™ Supreme XT se comportaron de forma estadísticamente similar, pero diferentes al Óxido de Zinc y Eugenol ($p < 0,05$).

En la tabla 1, se encuentran resumidos la distribución de los especímenes, de acuerdo con los valores atribuidos a los parámetros histopatológicos, de los diferentes grupos, así como los resultados del análisis estadístico.

Tabla 1- Distribución de los especímenes de acuerdo con los valores atribuidos con relación a la capa odontoblástica, respuesta inflamatoria pulpar y periapical, reabsorción de los tejidos mineralizados y presencia de bacterias, en los especímenes de los grupos I (Filtek™ Silorane; 10 días), II (Filtek™ SupremeXT; 10 días), III (Óxido Zinc y Eugenol; 10 días), IV (Filtek™ Silorane; 90 días), V (Filtek™ Supreme XT; 90 días) y VI (Óxido Zinc y Eugenol; 90 días)

Parámetro		Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
Capa	Íntegra (valor 1)	12	12	6	10	10	6
Odontoblástica	Ausente (valor 2)	0	0	0	0	0	0
	Análisis estadística	a	a	A	A	a	A
Respuesta inflamatoria pulpar y periapical	Ausente (valor 1)	12	12	0	10	10	6
	Leve (valor 2)	0	0	0	0	0	0
	Moderada (valor 3)	0	0	0	0	0	0
	Severa (valor 4)	0	0	0	0	0	0
	Análisis estadística	a	a	b	A	a	A
Reabsorción de los tejidos mineralizados	Ausente (valor 1)	12	12	6	10	10	6
	Leve (valor 2)	0	0	0	0	0	0
	Moderada (valor 3)	0	0	0	0	0	0
	Severa (valor 4)	0	0	0	0	0	0
	Análisis estadística	a	a	a	a	a	A
Bacterias	Ausente (valor 1)	12	12	6	10	10	6
	Presente (valor 2)	0	0	0	0	0	0
	Análisis estadística	a	a	a	a	a	A

*Letras iguales representan resultados estadísticos semejantes.

Exposición pulpar

A los 90 días, en 3 especímenes del grupo IV y en 4 especímenes del grupo V donde el tejido pulpar fue expuesto accidentalmente, la capa odontoblástica estaba ausente y la pulpa, cuando presente, se encontraba necrosada a lo largo del canal radicular.

En el ápice radicular, la superficie del cemento estaba acentuadamente irregular debido a reabsorción cementaria, con ausencia de cementoblastos en su superficie.

El ligamento periodontal estaba aumentado, observándose una intensa disociación de fibras, edema y presencia acentuada de células inflamatorias mononucleadas y polimorfonucleadas.

No hubo microorganismos en ningún espécimen.

No hubo alteraciones en la integridad de la lámina dura, ni presencia de áreas de rarefacción ósea periapical, ni presencia de reabsorción radicular interna o externa en ninguno de los especímenes en los dos períodos experimentales.

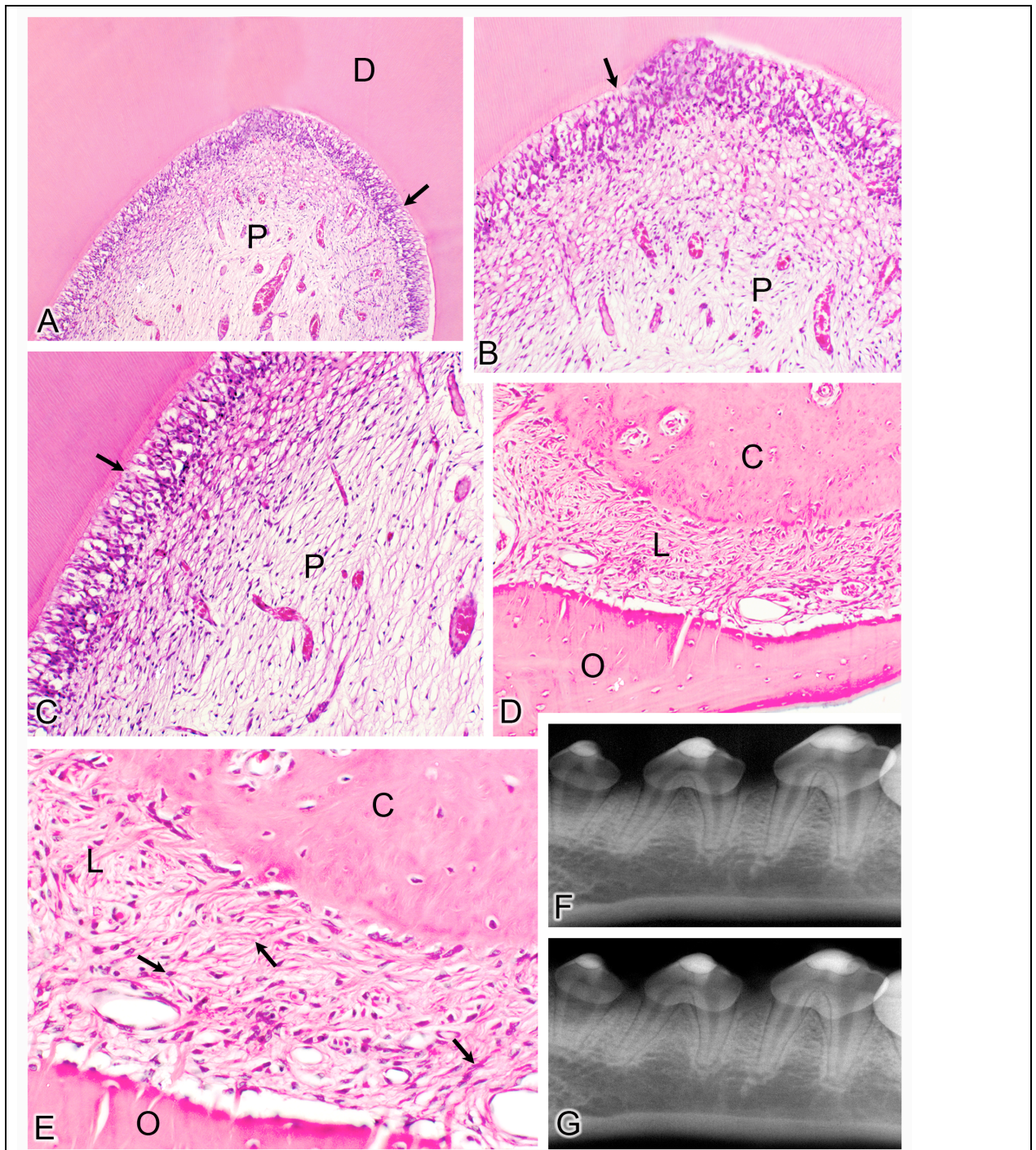


Figura 28. Imágenes representativas del grupo 1 y II Filtek™ Silorane del sistema (10 días) y Filtek™ XT Supremo (10 días). A, B y C: Tejido normal de la pulpa (P) y la capa de odontoblastos (flecha) Con áreas de vacuolización. HE-Zeiss. El aumento en 10 x 20 x A y el aumento en B y C. D y E: región apical normal, cemento Con regular (C), Con espesura normales del ligamento periodontal (L), las fibras de colágeno (flechas) y el hueso alveolar (O) normal. HE-Zeiss. El aumento en 10 x D x 20 y un aumento en E. F: imagen radiográfica inmediatamente después de procedimientos quirúrgicos. G: Apariencia radiográfica 90 días después de procedimientos quirúrgicos, sin ningún cambio.

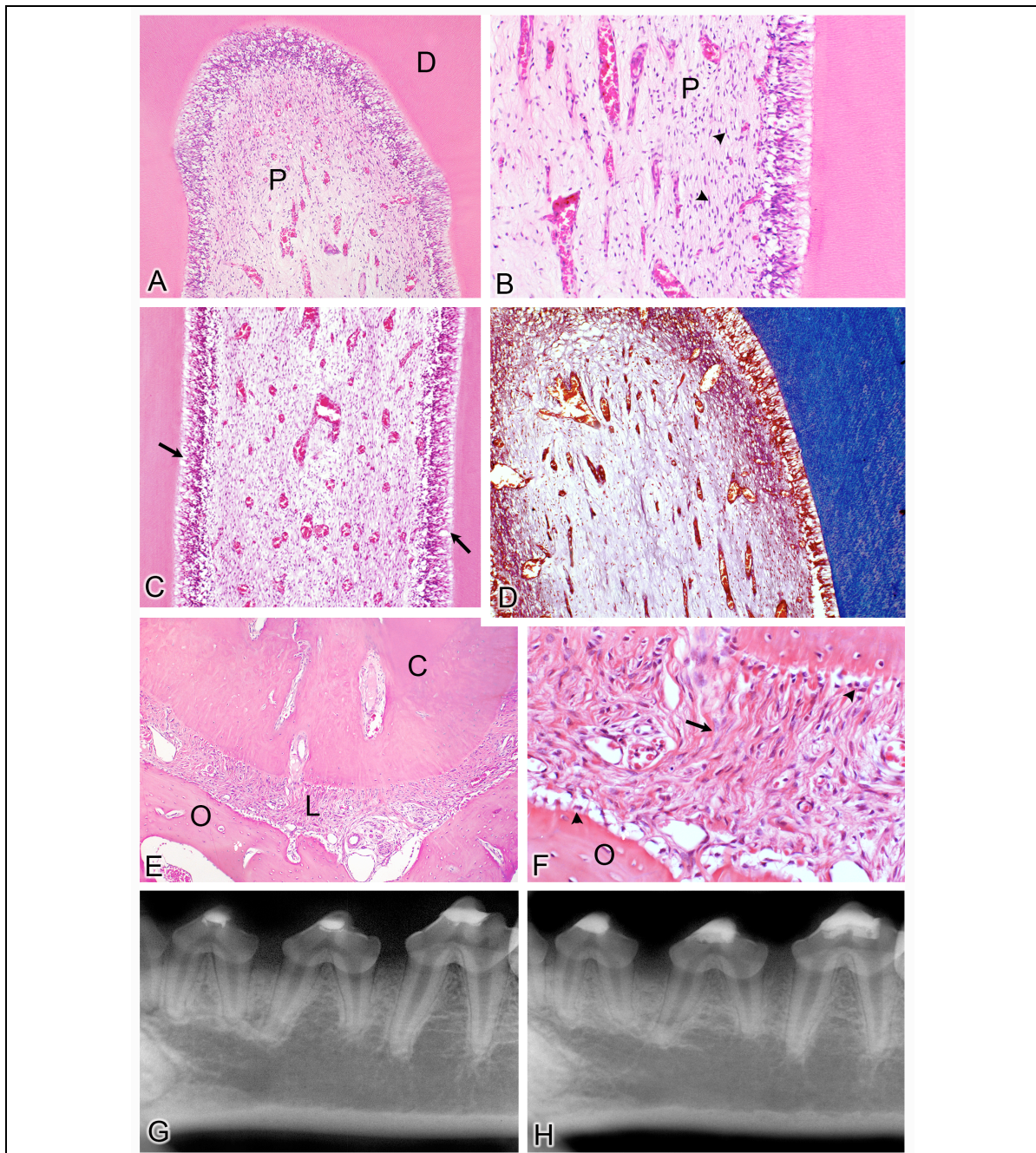


Figura 29. Grupo IV Filtek™ Silorane sistema (90 días). A, B, C y D: la dentina (D) y la pulpa (P) normal. HE-Zeiss. El aumento de 10 ×. B: tejido de la pulpa (P) con una población marcada de los fibroblastos, vasos sanguíneos y la capa de odontoblastos (flechas). E: región apical y periapical. Ligamento periodontal normal (L), cemento (C) y el hueso alveolar (O). F: Un mayor aumento de la figura E, mostrando una fuerte presencia de fibras (flecha), las células y los vasos sanguíneos. Superficie de cemento y el hueso (O) con varios cementoblastos y osteoblastos, respectivamente (cabeza de flecha). G: Apariencia radiográfica inmediatamente después de procedimientos quirúrgicos. H: apariencia radiográfica 90 días después de procedimientos quirúrgicos, sin cambios.

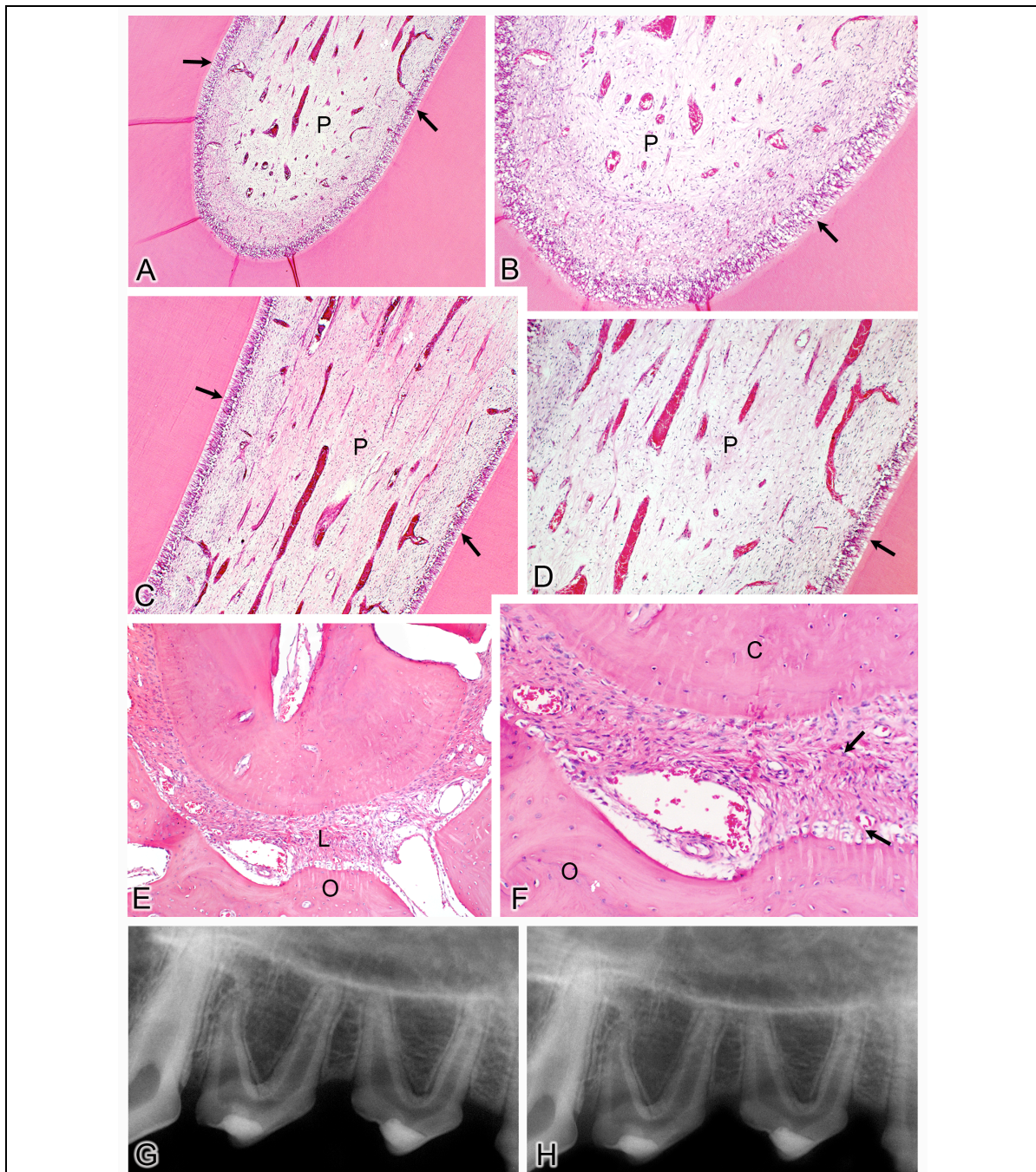


Figura 30. Grupo V Filtek TM Supreme XT (90 días). A, B y C: dentina, pulpa (P) y la capa de odontoblastos (flechas) normal. HE-Zeiss. El aumento de 10 × . D: mayor aumento de la figura C, que muestra la pulpa normal (P) y sin alteraciones en la capa de odontoblastos (flecha) HE-Zeiss. El aumento de 20 × . E: región apical y periapical. Ligamento periodontal (L), el cemento y el hueso alveolar (O) normal. F: Un mayor aumento de la figura E que muestra las fibras de colágeno entrelazados (flechas) en el ligamento periodontal normal y el cemento (C) y el hueso alveolar (O). HE-Zeiss. El aumento de 20 × . G: Apariencia radiográfica inmediatamente después de procedimientos quirúrgicos. H: apariencia radiográfica 90 días después de procedimientos quirúrgicos, sin ningún cambio.

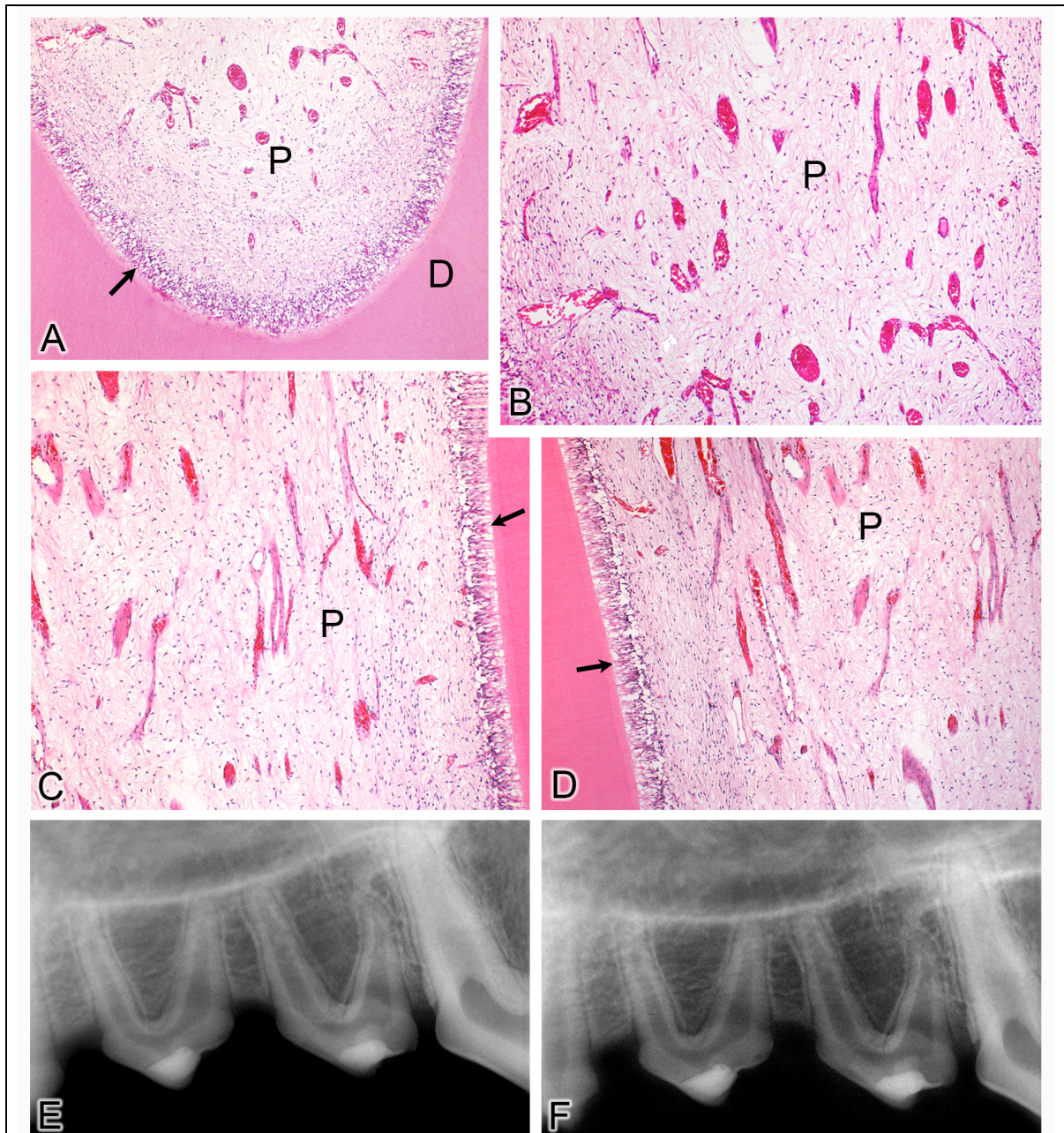


Figura 31. Grupo VI Óxido de zinc y eugenol (90 días). A, B, C y D: la dentina (D), pulpa (P) y la capa de odontoblastos (flecha) normal. HE-Zeiss. El aumento de 10 ×. E: imagen radiográfica inmediatamente después de procedimientos quirúrgicos. F: imagen radiográfica 90 días después de procedimientos quirúrgicos, sin ningún cambio.

DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

La forma ideal de evaluación de la biocompatibilidad de diferentes materiales de uso odontológico sería el análisis de las respuestas de los tejidos apicales y periapicales por medio de estudios histopatológicos realizados en humanos⁶⁷. Considerando que esa práctica es totalmente implantable, se convierte en necesaria la utilización de modelos animales que permitan el análisis microscópico de la respuesta tisular, con los diferentes materiales estudiados⁶⁸.

Teniendo conocimiento de los estudios realizados con la nueva resinas en base a silorane (Filtek™ Silorane) en cultivo de células humanas, se planteo hacer un test secundario (ensayo de implantación en tejido subcutáneo de ratones) y un test comprobatorio (protección pulpar en dientes de perro) , para valorar la respuesta tisular a este composite.

V.1. DEL ESTUDIO DE LA COMPATIBILIDAD TISULAR *IN VIVO* EN CAMUNDONGOS ISOGÉNICOS

V.1.1. DEL MODELO EXPERIMENTAL

Los métodos de ensayo de implantación en tejido subcutáneo, son usados para evaluar la respuesta biológica del tejido subcutáneo al material implantado, y pueden evaluar los efectos de toxicidad sub-crónica (de corta duración, hasta 12 semanas) o los efectos crónicos (a largo plazo, más de 12 semanas). El mayor período de experimentación de este trabajo fue 63 días, es decir, un período de inferior a 12 semanas, por lo que éste fue un experimento que evaluó los efectos de toxicidad sub-crónica. Esta prueba podría ser utilizada en animales con menor esperanza de vida como son ratones, ratas, conejos o conejillo de indias (ISO 10993-6, 1994). Hemos optado por el uso de ratones,

porque, además de que el tamaño del implante es compatible con el animal, es el animal que más se utiliza en la investigación científica en el mundo, por ser mamífero, por reproducirse rápidamente, por tener los mismos sistemas y órganos de seres humanos, por ser pequeños, de bajo coste, fáciles de alimentar, almacenar y procesar.⁶⁹

Los ratones utilizados en este estudio fueron de tipo isogénico, que al ser generados en laboratorio son genéticamente similares, y tienen patrones de respuesta homogénea frente al mismo estímulo, lo que permite a cada animal recibir solamente un implante, eliminando el inconveniente de probar todos los materiales en el mismo animal⁷⁰ y la posibilidad de que al implantar varios materiales diferentes en el mismo animal, la respuesta sistémica a un material pueda interferir con los resultados de otro. Esto es interesante porque reduce el tiempo quirúrgico, disminuyendo el riesgo quirúrgico. Siendo pequeños, los animales del mismo grupo pueden mantenerse en la misma caja. Según (ISO 10993-6, 1994)⁷¹ la región dorsal se ha elegido porque el riesgo de que el animal arranque el implante es menor y este área no está sujeta a fricción o esfuerzo.

V.1.2. De la opción de implantes en tejido subcutáneo

Los implantes en tejido subcutáneo se utilizan para evaluar la respuesta biológica del tejido frente al material implantado, a nivel macro y microscópica (ISO 10993-6, 1994) y puede ser utilizado como fuente de información preliminar sobre la compatibilidad de los materiales con la actividad biológica de los tejidos alrededor de ellos^{72,73,74,75,76,77,78}.

Se pueden realizar varias pruebas para verificar la compatibilidad biológica de un material. Los test iniciales o primarios son los que dan una idea general de la toxicidad de los materiales e incluyen las pruebas de toxicidad sistémica aguda, las pruebas de inhalación, las pruebas de mutagenicidad, la prueba letal dominante y pruebas de citotoxicidad in vitro. Los test secundarios, son las pruebas que evalúan la toxicidad local, e incluyen las pruebas en las que el material permanece más tiempo en contacto con los tejidos, in vivo, tales como

pruebas de sensibilidad y de irritación de las membranas y los implantes en tejido conectivo subcutáneo y hueso. Los test comprobatorios, son los que evalúan la respuesta del tejido pulpar, de los tejidos apicales y los tejidos periapicales frente al material ²⁶.

Olsson et al. (1981)⁷⁹ y Ozbas et al. (2003)⁸⁰ afirmaron que el implante de materiales en el tejido conjuntivo subcutáneo es una prueba secundaria adecuada para evaluar la compatibilidad de materiales con la actividad biológica de los tejidos a su alrededor, siendo recomendados antes de los test comprobatorios. Según estos autores, las reacciones tóxicas e inflamatorias tienen las mismas características en todos los tejidos conjuntivos, no importando dónde estén ubicado.

La reacción tisular causada por materiales odontológicos por medio de test en los que se realizaron implantes en el tejido subcutáneo de ratones fue evaluada por Bilginer et al. (1997)⁸¹, Shimizu et al. (2004)¹² y Silva (2007).⁸²

V.1.3. De la opción de uso de tubos de polietileno

En el presente estudio, los materiales implantados en tejido conjuntivo se colocaron en tubos de polietileno, como ha sido preconizado por diferentes autores ⁸³.

De acuerdo con Torneck (1966)⁸⁴ y Ozbas et al. (2003)⁵⁵, el polietileno no causa irritación de los tejidos circundantes, por lo que la reacción en la apertura del tubo está relacionada con la toxicidad del material contenido en su luz. En el presente estudio la reacción tisular a los tubos de polietileno vacíos fue similar a la mostrada por Torneck (1966)¹⁸.

La introducción de los materiales experimentales en tubos está ampliamente reconocida como un método válido para el implante de materiales odontológicos, ya que simula las condiciones clínicas y mantiene el material estable asegurando la estandarización⁵⁵. Además permite la utilización de materiales recién manipulados⁸⁵ y el control de la cantidad de material que quedará en contacto con los tejidos⁸⁶. De acuerdo con Batista et al. (2007)⁸⁷, la intensidad de la respuesta inflamatoria, además de estar en relación con el tipo de

material y con el período de tiempo post-implante, está en dependencia con la cantidad de material, siendo de mayor intensidad donde hubiera más material.

V.1.4. De los materiales utilizados

Con relación a los materiales validados, fue seleccionado un material de restauración recientemente lanzado al comercio especializado (Filtek™ Silorane), aplicado de manera rutinaria en cavidades, pudiendo ser éstas profundas, y necesitando por tanto ser comprobada su biocompatibilidad. Como la literatura presenta trabajos validando las propiedades físico-químicas de esos materiales pero no comprobando su biocompatibilidad, se optó por realizar este estudio biológico de tolerancia tisular en subcutáneo de Camundongos Isogénicos.

V.1.5. De los parámetros de respuesta tisular evaluados

En la literatura, se observa que los parámetros evaluados por los diferentes autores^{47,48,49,50,51,52,53,55,62} son prácticamente los mismos e incluyen el tipo y la cantidad de células inflamatorias, la fibrosis, el área y el engrosamiento del tejido reaccional, la necrosis y fenómenos vasculares. Entretanto, no existe consenso en relación a la forma de realizar la evaluación de la respuesta biológica de los tejidos al material implantado.

Bilginer et al. (1997)⁵⁶ evalúan cualitativamente el grado de inflamación como leve, moderado o severo, según el tipo celular (leucocitos polimorfo-nucleares, linfocitos, macrófagos y células plasmáticas) y la cantidad de células inflamatorias; el tipo de inflamación como aguda (predominio de leucocitos polimorfonucleares y pocos linfocitos, macrófagos y células plasmáticas) o crónica, y la presencia de la cápsula fibrosa.

Los criterios de evaluación de la Federación Dental Internacional (1980), que son exclusivamente cualitativos, sin atribuir puntuaciones, fueron utilizados por Kim et al. (2004)⁸⁸ y Zafalon et al. (2007)⁵⁰ en sus experimentos. La

reacción tisular fue evaluada como ausente o leve, si el espesor del tejido reaccional es igual o ligeramente mayor al espesor del mismo a lo largo de la pared del tubo y con pocas o ninguna célula inflamatoria. Fue evaluada como moderada, si hay presencia de macrófagos y / o células plasmáticas, grave si se produjo un aumento en la zona de reacción con la presencia de macrófagos y células plasmáticas, focos ocasionales de neutrófilos y / o linfocitos. Evaluaron también la presencia de células gigantes de tipo cuerpo extraño, cápsula fibrosa, tejido óseo neoformado, tejido necrótico, la resorción ósea y el material disperso.

Ya Zmener (2004)⁴⁹, llevó a cabo una evaluación cualitativa, que clasifica en cuatro categorías de reacción inflamatoria. Ninguna reacción: presencia de cápsula fibrosa y ausencia de células inflamatorias. Reacción leve: presencia de cápsula fibrosa y pocos linfocitos y células plasmáticas. Reacción moderada: formación de cápsula fibrosa con presencia de macrófagos, leucocitos polimorfonucleares, linfocitos y células plasmáticas. Reacción severa: grandes acumulaciones de leucocitos polimorfonucleares, linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, células gigantes de tipo cuerpo extraño, y capilares congestionados.

En el trabajo de Batista et al. (2007)⁶², la reacción tisular y la intensidad de la inflamación fueron morfológicamente evaluadas por el tipo de célula presente en el infiltrado inflamatorio, por la proliferación de fibroblastos y angioblastos, por la presencia de cápsula fibrosa que rodea el implante y los fenómenos vasculares. La reacción inflamatoria fue clasificada como ausente, leve, moderada o grave y se asignaron puntuaciones de 0 a 3.

Los criterios utilizados tanto para la ejecución y como para la evaluación de la reacción tisular en este estudio, se basan en aquellos recomendados por la norma ISO 10993-6 (1994), según cual la extensión de la respuesta debe ser determinada por la medición de la distancia de la interfaz implante/tejido en las zonas no afectadas, es decir, zonas de tejido con características y vascularización normales. Los parámetros de la respuesta biológica evaluados deben ser: inflamación, grado de fibrosis, degeneración (cambios morfológicos en los tejidos), el tipo, el número y la distribución de las

células inflamatorias, presencia de necrosis, presencia de desechos y granulomas. Shimizu et al. (2004)⁵³ también basan el análisis de las respuestas biológicas de su estudio en los parámetros de evaluación recomendados por la norma ISO 10993-6 (1994).

El infiltrado inflamatorio se evalúa según la concentración de polimorfonucleares tipo neutrófilos, en el tejido reaccional alrededor del material. La presencia de un gran número de neutrófilos significa que el proceso inflamatorio está en una etapa inicial, o que el ataque se produce de forma repetida y constante, o que hubo contaminación por bacterias. También se observó la aparición de extravasamiento de material más allá de la apertura del tubo implantado, absceso y calcificación distrófica en los tejidos que rodean el material testado. Se describió la reacción tisular en relación a los materiales testados y los grupos de control, en los diferentes períodos, sin especificar cada uno de los especímenes, pero que caracterizan el grupo considerado en su conjunto.

V.1.6. De los resultados

Filtek™ Supreme XT

Los materiales odontológicos utilizados en procedimientos restauradores pueden entrar en íntimo contacto con los tejidos blandos durante la realización de las restauraciones, pudiendo conducir a inflamación local (Nadarajah et al., 1996)⁸⁹. Teniendo en cuenta que en muchas ocasiones las restauraciones están en dentina profunda, estos materiales también pueden afectar al complejo dentino-pulpar, ya que los túbulos dentinarios suponen un 20-39% de la dentina y el fluido dentinario representa alrededor del 22% del volumen total de la dentina⁹⁰. Otro factor importante es el hecho de que la dentina cerca de la unión amelo-dentinaria presenta una permeabilidad del 1%, en la parte media un 7,6% mientras que cerca de la pulpa la permeabilidad es del 22%.⁹¹ Así, el paso de sustancias a través de la dentina puede llegar hasta la pulpa, pudiendo causarle cambios patológicos, dependiendo del tamaño de la

molécula, de los componentes del producto utilizado, de la superficie disponible para la difusión, la permeabilidad de los túbulos dentinarios, y el grosor de la dentina remanente. Gerzina e Hume (1996)⁹² observaron que la capa híbrida, obtenida después de la utilización de los adhesivos dentinarios en base a metacrilato, no puede ser considerada una barrera impermeable, ya que ésta no previene la difusión de monómeros hacia el tejido pulpar. Diversos estudios, en dientes de ratones, primates, perros y humanos^{34, 93, 94, 95, 96, 97}, mostraron los efectos adversos después de la utilización de los sistemas adhesivos en base a metacrilato cerca de pulpa.

Algunos estudios previos, también han evaluado la respuesta inflamatoria frente a la implantación subcutánea de resinas compuestas en base a metacrilato^{43,52}, evidenciando una respuesta inflamatoria granulomatosa persistente, infiltrado linfocitario, fibroblastos, presencia de monocitos, aumento del número de macrófagos y mayor expresión de antígeno de histocompatibilidad, sugiriendo respuesta inflamatoria persistente.

En los últimos años se han desarrollado resinas en base a metacrilato con modificaciones en su composición y estructura. Filtek™ Supreme XT es una de ellas. Siendo una resina de nanopartículas, presenta una combinación de dos tipos de nanorelleno (5-75nm): contiene partículas redondeadas con tamaños menores a 10nm (0.01µm), que se disponen de forma individual y también agrupadas en "nanoclusters" de aproximadamente 75nm. Estos aglomerados o "nanoclusters" actúan como una unidad, permitiendo mayor carga de relleno y mayor resistencia.⁵ Aunque estas resinas tienen mejores propiedades físicas, incluyendo mejor pulido⁹⁸, todavía presentan citotoxicidad en cultivo de células, conforme observado por Brackett et al. (2007)¹².

Aunque la caracterización de la respuesta tisular inflamatoria sea de fundamental importancia para dar respaldo al uso clínico de nuevos materiales⁴³, hasta el momento no hemos encontrado estudios publicados evaluando la respuesta tisular a la resina Filtek™ Supreme XT.

En nuestro estudio, la resina Filtek™ Supreme XT presentó una compatibilidad adecuada con el tejido conjuntivo subcutáneo de camundongos visto que, a los 63 días, la respuesta inflamatoria fue semejante a la hallada en el grupo control (tubo vacío), con un pequeño número de neutrófilos, presencia de macrófagos y de cápsula fibrosa. Posiblemente esto sea debido al hecho de que la resina Filtek™ Supreme XT está compuesta por nanopartículas y “nanoclusters” que reducen el espacio intersticial y, consecuentemente, la cantidad de matriz orgánica capaz de liberar metacrilatos, causando, por lo tanto, menor irritación tisular que las resinas en base a metacrilato convencionales^{34,43,99}.

Sistema Filtek™ Silorane

A pesar de las innovaciones de los últimos años, y la muy buena aceptación de las resinas en base a metacrilatos, clínicamente la contracción de polimerización es considerada, todavía, la principal desventaja de esos materiales¹⁰⁰. La causa más frecuente del fracaso de las restauraciones con resinas compuestas es la caries secundaria, lo que según algunos autores¹⁰¹ guarda relación directa con la contracción que sufre el composite (1.35 al 7%) durante el proceso de fotopolimerización. La tensión generada durante el proceso de polimerización afecta a la zona de interfase diente-material restaurador, siendo capaz de provocar microcraks o fallos de la unión (desadaptaciones). Por esa razón, nuevos materiales sin metacrilato, que presentan un reducido stress interno como resultado de la muy baja contracción de polimerización, suponen grandes perspectivas para el futuro.¹⁰²

Entre los nuevos materiales sin metacrilato se encuentra Filtek™ Silorane, sistema de resina recientemente introducido en el mercado, basado en un sistema monomérico innovador, obtenido a partir de la reacción de moléculas de oxirane y siloxane. Esa nueva resina combina características importantes: reducida contracción de polimerización, debido a los anillos oxirano, y elevada hidrofobicidad, debido a la presencia de los siloranos.¹⁰³

Los Siloranos son materiales estables e insolubles en diferentes fluidos biológicos³⁹, cuya polimerización no es sensible al oxígeno⁵⁹. Presentan poca absorción de agua y reducido coeficiente de difusión, cuando se comparan con las resinas en base a metacrilato convencional¹⁰⁴.

Según Ilie e Hickel (2009)¹⁰⁵, las propiedades mecánicas de las resinas en base a Silorano, medidas en macro, micro y nano escalas, son comparables a las resinas en base a metacrilato.

Sin embargo, hasta el momento, pocos trabajos han evaluado las propiedades biológicas de las resinas en base a Silorano.

En 2007, Brackett et al.¹² evaluaron, in vitro la citotoxicidad de la resina Hermes, precursora del Filtek™ Silorane, en cultivo de fibroblastos 3T3 de Camundongos BALB/c. Después de 8 semanas, la resina Hermes presentó la menor citotoxicidad, equivalente al Teflón (control), cuando se comparaba con las resinas en base a metacrilato.

Sin embargo no hay, hasta el momento, trabajos publicados en la literatura específica evaluando la respuesta tisular frente al uso de Silorane. En el presente estudio in vivo, observamos que esta resina, así como sus componentes (primer y adhesivo separadamente), inducían respuestas de pequeña intensidad en el tejido conjuntivo de Camundongos Isogénicos. Esas respuestas también fueron semejantes a las desencadenadas por el control (tubo vacío), en los diferentes períodos de evaluación, evidenciando su reducida capacidad de inducir reacciones tisulares desfavorables.

V.2. VALORACIÓN DE LA RESPUESTA TISULAR POSTERIOR A PROTECCIÓN PULPAR EN DIENTES DE PERROS.

V.2.1. Del modelo experimental

El modelo animal seleccionado para experimentación, debe cumplir ciertos requisitos para que los resultados obtenidos puedan ser, parcialmente extrapolados, para el hombre. Debe haber semejanza entre el animal y el hombre con relación al patrón masticatorio, resistencia a infección, tamaño y morfología dental. Además de eso, el patrón de crecimiento debe permitir la obtención de respuestas en pequeños intervalos de tiempo¹⁰⁶.

La elección de perros como modelo experimental, del presente estudio, se basó en varios estudios anteriores, que afirmaron que este animal es el que más se asemeja al hombre en cuanto a sus estructuras dentales, así como en los procesos de reparación apical y periapical^{107,108,109,110,111}. Estos animales son de fácil manutención y manejo, además de ser económicamente viables^{50,112,113}. Más allá de eso, el perro resiste la anestesia general durante largos períodos de tiempo y, por eso, ha sido el modelo animal más utilizado en los estudios de investigación biológica^{25,114,115,116,117,33,118}.

V.2.2. De la selección de los dientes

La selección de los segundos, terceros y cuartos premolares inferiores y de segundos y terceros premolares superiores, se basó en el hecho de que esos dientes presentan semejanza anatómica entre sí, presentan volumen pulpar semejante y facilidad en la toma de radiografías. En el arco superior, el cuarto pre-molar no fue utilizado por el hecho de que posee tres raíces y por tener volumen pulpar mayor que sus homónimos. No fueron utilizados los primeros

premolares por ser unirradiculares y también porque, al no ser substituidos, son considerados como pertenecientes a la dentición decidua.

V.2.3. De los materiales utilizados

Con relación a los materiales evaluados, fueron seleccionados dos materiales actuales, un material de restauración recientemente lanzado al comercio especializado (Filtek™ Silorane), con la idea de mejorar la contracción de polimerización con base de oxirane; y una resina con base de metacrilato (Filtek™ Supreme) pero también con la última tecnología empleada para disminuir los monómeros residuales, y como control un material clásico el óxido de zinc eugenol que se aplicó durante mucho tiempo de manera rutinaria en cavidades profundas. Las nuevas resinas compuestas tanto las de base de oxirane como la de base de metacrilato, están indicadas para restauraciones en pacientes, pudiendo ser éstas profundas, y necesitando por tanto ser comprobada su biocompatibilidad. Como la literatura presenta trabajos validando las propiedades físico-químicas de esos materiales pero no comprobando su biocompatibilidad, se optó por realizar un estudio biológico de tolerancia tisular en subcutáneo de Camundongos Isogénicos y uno comprobatorio de valoración de la respuesta tisular a la protección pulpar en dientes de perros.

V.2.4. Del procedimiento operatorio

En el procedimiento operatorio se siguió un protocolo estricto para conseguir realizar el tratamiento lo más estandarizadamente posible, se tomaron especial cuidado en la desinfección y el aislamiento del instrumental y el campo quirúrgico. Así la cavidad realizada con la fresa de bola de diamante nº 1015 (KG Sorensen, São Paulo) permitía controlar que el grosor de tejido remanente fuese de 0.5 a 1mm, se puso especial cuidado en la refrigeración para evitar iatrogenia por sobrecalentamiento y sin embargo accidentalmente siete diente de dos grupos hubo exposición pulpar, debe tomarse en cuenta que se realizaron

cavidades de clase V puesto que son las cavidades viables en este tipo de experimento con perros. La exposición pulpar no era visible durante la preparación cavitaria pero al colocar el adhesivo autograbante en caso del Filtek™ Silorane o el grabado con fosfórico al 37% en el caso de Filtek™ Supreme se hizo evidente la proximidad. Para la colocación del material se siguieron las instrucciones del fabricante.

V.2.5. De los resultados

La evaluación de la compatibilidad tisular frente a los diferentes materiales odontológicos es importante, teniendo en cuenta que la dentina y la pulpa son considerados como un órgano único (complejo dentino-pulpar), debido a la íntima relación entre el contenido celular de los túbulos dentinarios y el tejido pulpar¹¹⁹. Considerando, que en muchas ocasiones las restauraciones están en dentina profunda, estos materiales también pueden afectar al complejo dentino-pulpar, ya que los túbulos dentinarios suponen un 20-39% de la dentina y el fluido dentinario representa alrededor del 22% del volumen total de la dentina^{73,120}.

También hay que considerar que la dentina presenta un promedio de 10.000 a 25.000 túbulos en la periferia, de 30.000 a 35.000 en la porción media y de 65.000 a 75.000 túbulos por mm² en las proximidades de la pulpa. Cerca de la pulpa, además de ser mas numerosos, el diámetro de los túbulos es mayor, variando entre 2.5 y 3.0 micrómetros, mientras que en la periferia alcanzan un diámetro menor de 1.0 micrómetro^{121,73}). Otro factor importante es el hecho de que la dentina cerca de la unión amelo-dentinaria presenta una permeabilidad del 1%, en la parte media de un 7,6% mientras que cerca de la pulpa la permeabilidad es del 22%^{122,123}).

Así, el paso de sustancias a través de la dentina puede llegar hasta la pulpa, dependiendo del tamaño de la molécula, de los componentes del producto utilizado, de la superficie disponible para la difusión, de la permeabilidad de los túbulos dentinarios, y del grosor de la dentina remanente, pudiendo causar cambios patológicos en la misma. Por lo dicho anteriormente, el presente estudio

optó por preparar cavidades profundas, con la finalidad de evaluar la compatibilidad tisular de los sistemas de resinas Filtek™ Supreme XT y Filtek™ Silorane, en estas condiciones.

La reacción pulpar a la preparación cavitaria puede variar desde una respuesta inflamatoria discreta, asociada a una leve desorganización tisular, hasta una necrosis pulpar parcial o a un completo colapso pulpar. Varios factores como, el secado de la dentina expuesta, el calor generado por el corte continuo durante la preparación cavitaria o una refrigeración inadecuada, entre otros, han sido considerados como responsables de los daños pulpares^{124,125,126,127,128}. En el presente estudio, la preparación cavitaria fue realizada con pieza de mano de alta rotación bajo irrigación abundante y constante, con movimientos intermitentes. Cada 4 preparaciones cavitarias se empleó una fresa de diamante nueva, para asegurar la eficacia de corte y evitar el sobrecalentamiento. Para mejorar la refrigeración y para evitar el calor excesivo, durante todo el proceso de preparación cavitaria, se realizaron movimientos intermitentes de las fresas. Estos cuidados posiblemente minimizan las agresiones térmicas al tejido pulpar, pues no fueron observadas alteraciones patológicas significativas en la pulpa, en el período de 10 días, en ninguno de los grupos.

El espesor de la dentina remanente es un factor de fundamental relevancia, pues la difusión del material hacia el interior de la pulpa está favorecida en cavidades más profundas^{81,129}.

Según Stanley (1994)²², muchos de los materiales utilizados para restauración son irritantes para la pulpa, especialmente cuando el remanente de la dentina es inferior a 0.5mm. Según Murray et al. (2002)¹³⁰, para que ocurra el depósito de dentina terciaria la espesura de la dentina remanente debe estar entre 0.5 y 0.25mm. Ya para Pameijer et al. (1991)¹³¹, cuando la dentina remanente tiene un espesor igual o superior a 1 mm puede proteger el tejido pulpar de los efectos citotóxicos de los materiales. La importancia de la presencia de dentina remanente puede ser observada en el presente estudio, donde los materiales evaluados presentaron comportamientos diferentes, cuando fueron colocados

sobre la dentina y cuando fueron colocados, accidentalmente, sobre el tejido pulpar expuesto.

Los resultados del análisis histopatológico, en el presente estudio, evidenciaron que, a los 90 días, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos IV (Filtek™ Silorane), V (Filtek™ Supreme XT) y VI (Óxido de zinc y Eugenol) en los cuales, cuando el material fue colocado sobre el tejido dentinario, presentaron tejido pulpar normal y ausencia de alteraciones apicales y periapicales. Por otro lado, en los especímenes de los grupos IV (Filtek™ Silorane) y V (Filtek™ Supreme XT), en los cuales hubo exposición del tejido pulpar, la pulpa presentó alteración severa, con necrosis pulpar. Así, los resultados evidencian que estos materiales, cuando se encuentran en contacto directo con la pulpa, desencadenan reacciones desfavorables severas y, para que ocurran respuestas pulpares satisfactorias, debe haber un espesor de dentina remanente suficiente para proteger la pulpa de los posibles efectos irritantes de estos materiales. Estamos de acuerdo con Pereira et al.^{132a}, cuando afirman que los sistemas resinosos son biocompatibles solo cuando son colocados directamente sobre la dentina.

Ha sido demostrado que, incluso con ausencia de contaminación bacteriana, la protección pulpar directa con diferentes sistemas adhesivos resulta en reacción inflamatoria^{133b,134,135,136,137,138}, con predominio de infiltrado crónico, presencia de macrófagos y células gigantes alrededor de los glóbulos de resina en el interior del tejido pulpar¹³⁹, alteraciones celulares morfológicas y hialinización de las células pulpares⁸⁸, ausencia de la capa odontoblástica, presencia de necrosis pulpar¹⁴⁰ y ausencia de formación de la barrera de tejido dentinario^{141,142}. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que, en los especímenes donde el tejido pulpar fue expuesto accidentalmente y recubierto con las resinas Filtek™ Supreme XT y Filtek™ Silorane, mismo con ausencia de microorganismos, ocurrió necrosis pulpar, espesamiento del ligamento periodontal, edema y intenso infiltrado de células inflamatorias mononucleadas y poliformonucleadas y reabsorción cementaria y ósea. De acuerdo con estos resultados, se puede deducir

que estos materiales no pueden ser colocados en contacto directo con la pulpa expuesta.

Cemento de Óxido de Zinc y Eugenol

En el presente estudio, en los grupos en que fue utilizado el cemento de óxido de zinc y eugenol en contacto con el tejido dentinario no ocurrieron alteraciones pulpares, excepto con relación a la respuesta inflamatoria pulpar y periapical en el período de 10 días, donde las resinas Filtek™ Silorane y Filtek™ Supreme XT se comportaron de forma estadísticamente semejante entre sí, pero diferente de el óxido de zinc y eugenol ($p < 0,05$). Estos resultados están de acuerdo con Murray et al. (2001)⁸⁰ que relataron que el cemento de óxido de zinc y eugenol, en protecciones pulpares indirectas, no desencadenó reacciones pulpares intensas.

Filtek™ Supreme XT

Gerzina y Hume (1996)¹⁴³ observaron que la capa híbrida, obtenida después de la utilización de los adhesivos dentinarios a base de metacrilato, no puede ser considerada una barrera impermeable, ya que ésta no previene la difusión de monómeros hacia el tejido pulpar. Diversos estudios, en dientes de ratones, primates, perros y humanos^{98,49,51}, mostraron los efectos adversos después de la utilización de los sistemas adhesivos a base de metacrilato sobre de la pulpa.

En los últimos años se han desarrollado resinas en base a metacrilato con modificaciones en su composición y estructura. Filtek™ Supreme XT es una de ellas, siendo una resina de nanopartículas. Aunque estas resinas tienen mejores propiedades físicas, todavía presentan citotoxicidad en cultivo de células, conforme lo observado por Brackett et al. (2007)¹². La resina Filtek™ Supreme XT presenta también elevada liberación de monómeros^{144b} y elevada citotoxicidad en fibroblastos L929¹⁴⁵. Sin embargo aunque la caracterización de la respuesta tisular inflamatoria sea de fundamental importancia para dar respaldo al

uso clínico de nuevos materiales, hasta el momento no hemos encontrado estudios histopatológicos publicados evaluando la respuesta del tejido pulpar después de la utilización de la resina Filtek™ Supreme XT.

En nuestro estudio, la resina Filtek™ Supreme XT presentó una compatibilidad adecuada con el tejido pulpar, cuando fue empleada sobre tejido dentinario. Posiblemente esto sea debido al hecho de que la resina Filtek™ Supreme XT está compuesta por nanopartículas y “nanoclusters”¹⁴⁶, que reducen el espacio intersticial y, consecuentemente, la cantidad de matriz orgánica capaz de liberar metacrilatos, causando, por lo tanto, menor irritación tisular.

Sistema Filtek™ Silorane

La resina Filtek™ Silorane es un material libre de metacrilato, basado en un sistema monomérico innovador, obtenido a partir de la reacción de moléculas oxirane y siloxane. Esa nueva resina combina importantes características, como la baja contracción de polimerización y elevada hidrofobicidad, debido a la presencia de siloranos⁴⁴. Los siloranos son materiales estables, insolubles en diferentes fluidos biológicos⁴² y que presentan pequeña absorción de agua y bajo coeficiente de difusión, cuando son comparadas con las resinas a base de metacrilato convencional⁵⁹.

Según Ilie y Hickel (2009), las propiedades mecánicas de las resinas en base a Silorano, medidas en macro, micro y nano escalas, son comparables a las resinas en base a metacrilato.

Estudios empleando cultivos de células han evaluado las propiedades biológicas de las resinas a base de silorano, mostrando ausencia de efectos citotóxicos y reduciendo el potencial mutagénico. En 2007, Brackett et al.¹² evaluaron, in vitro la citotoxicidad de la resina Hermes, libre de metacrilato y precursora del Filtek™ Silorane, en cultivo de fibroblastos 3T3 de ratas BALB/c., Después de 8 semanas, la resina Hermes, cuando se comparaba con las resinas en base a metacrilato, presentó la menor citotoxicidad, equivalente al Teflón (control).

Sin embargo no hay, hasta el momento, trabajos publicados en la literatura específica evaluando la respuesta tisular frente al uso de Silorane. En el presente estudio in vivo, observamos que la resina Filtek™ Silorane, cuando se emplea sobre tejido dentinario, también presentó una compatibilidad adecuada con el tejido pulpar en los diferentes períodos de evaluación. Estamos de acuerdo con Brackett et al. (2007)¹² cuando afirman que los materiales con nuevas formas de polimerización son prometedores en cuanto a la reducción de la liberación de componentes no polimerizados y, consecuentemente, en la reducción de su citotoxicidad.

V. III. DEL RESULTADO VINCULADO

Los resultados encontrados en nuestro trabajo, pueden ser de gran aplicación. La verificación de la compatibilidad biológica del material mediante un test secundario en ratones y uno de confirmación en dientes de perros evidencian que las resinas en base a Silorano, además de presentar una reducida contracción de polimerización, mejorando su desempeño clínico, presentan compatibilidad tisular in vivo.

Los composites en base a Silorane se presentan como una alternativa válida a los composites con base de metacrilato, sin embargo tienen la desventaja de solo pueden utilizarse con un adhesivo específico del sistema, lo que puede ser una dificultad en el trabajo de la clínica diaria.

Estudios adicionales en otros niveles de investigación, incluyendo estudios clínicos, serían convenientes con el fin de añadir soporte al uso clínico de las resinas en base a Silorane y de las resinas nanoparticuladas a base de metacrilato.

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

Conforme a los resultados obtenidos en este trabajo hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1. El sistema de resinas en base a Silorane (Filtek™ Silorane) y la resina de nanopartículas en base a metacrilato (Filtek™ Supreme XT), evaluados en tejido subcutáneo de Camundongos Isogénicos presentan una compatibilidad tisular adecuada.
2. El análisis microscópico de las pruebas realizadas en perros cuando son empleados directamente en dentina presentan una compatibilidad tisular satisfactoria.

Por tanto junto a sus otras características ya demostradas en otros estudios como son la menor contracción de polimerización, una adecuada manipulación, y tomando en cuenta otros estudios clínicos, podemos decir que son materiales idóneos para usar en sectores posteriores en el trabajo clínico diario. Sin embargo, serían convenientes estudios adicionales en otros niveles de investigación, con el fin de añadir soporte al uso clínico de este tipo de resinas.

BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Bowen R. L. Dental filling material comprising vinyl silane treated fused silica and a binder consisting of the reaction product of bisphenol and glycidyl methacrylate. 1962. US 3000, 112.
- 2 Burdairon G. Manual de Biomateriales dentarios. Barcelona, . Masson; 1991.
- 3 Taylor Df, Kalachandra S, Sankarapandian M, Mcgrath JE. Relationship between filler and matrix resin characteristics and the properties of uncured composite pastes. Biomaterials 1998;19:197-204.
- 4 Ferracane JL. Status of research on new fillers and new resins for dental composites. Advanced Adhesive Dentistry. 3e International Kuraray Simposium. Granada. pp3-29. 1999.
- 5 Rodríguez G, Douglas R, Pereira S, Natalie A. Evolución y tendencias actuales en resinas compuestas. Acta Odontol Venez 2008;46(3).
- 6 Anusavice K. Phillips Ciencia de los Materiales Dentales. Undécima ed. Madrid, Elsevier, 2004
- 7 Bayne,S. Heymann, H. and Swift E. Update on dental composite restorations. J Am Dent Assoc 1994;125:687-701.
- 8 Karmaker A, Prasad A, Sarkar NK.Characterization of adsorbed silane on fillers used in dental composite restoratives and its effect on composite properties. J Mater Sci Mater Med 2007;18(6):1157-62.
- 9 Matinlinna JP, Vallittu PK. Silane Based Concepts on Bonding Resin Composite to Metals. J Contemp Dent Pract 2007;(8)2:001-008.
- 10 Burtcher P. Fraguado con luz visible de las resinas composites. Ivoclar-Vivadent Report. 2008.
- 11 Brackett MG, Bouillaguet S, Lockwood PE, Rotenberg S, Lewis JB, Messer RL, Wataha JC. In vitro cytotoxicity of dental composites based on new and traditional polymerization chemistries. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2007 May;81(2):397-402.
- 12 Davidson CI, Feilzer AJ.Polymerization shrinkage and polymerization shrinkage stress in polymer-based restoratives. J Dent 1997; 25:435-440.
- 13 Cook Wd, Forrest M, Goodwin AA. A simple method for the measurement of polymerization shrinkage in dental composites. Dent Mater 1999; 15:447-449.
- 14 Mohsen, N. Craig, R. Effect of silanation of fillers on their dispersability by monomer systems. J. Oral Rehabil 1995; 22:183-189.

-
- 15 Phillips RW (1991). *Science of dental materials*. 8th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 65.
- 16 Reichl FX, Seiss M, Kleinsasser N, Kehe K, Kunzelmann KH, Thomas P, Spahl W, Hickel R. Distribution and excretion of BisGMA in guinea pigs. *J Dent Res* 2008 Apr;87(4):378-80.
- 17 Gerzina TM, Hume WR. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine in vitro. *J Dent* 1996 Jan-Mar;24(1-2):125-8.
- 18 Rogalewicz R, Batko K, Voelkel A. Identification of organic extractables from commercial resin-modified glass-ionomers using HPLC-MS. *J Environ Monit* 2006 Jul; 8(7):750-8.
- 19 Marquardt W, Seiss M, Hickel R, Reichl FX. Volatile methacrylates in dental practices. *J Adhes Dent* 2009 Apr; 11(2):101-7.
- 20 Van Landuyt KL, Nawrot T, Geebelen B, De Munck J, Snauwaert J, Yoshihara K, Scheers H, Godderis L, Hoet P, Van Meerbeek B. How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach. *Dent Mater* 2011 Aug; 27(8):723-47.
- 21a Geurtsen W, Leyhausen G. Biological aspects of root canal filling materials--histocompatibility, cytotoxicity, and mutagenicity. *Clin Oral Investig* 1997;1:5-11.
- 22b Geurtsen W, Spahl W, Leyhausen G. Residual monomer/additive release and variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers. *J Dent Res* 1998 Dec;77(12):2012-9.
- 23 Al-Hiyasat AS, Darmani H, Milhem MM. Cytotoxicity evaluation of dental resin composites and their flowable derivatives. *Clin Oral Investig* 2005 Mar;9(1):21-5. Epub 2005 Jan 6.
- 24 Schweikl H, Schmalz G, Weinmann W. The induction of gene mutations and micronuclei by oxiranes and siloranes in mammalian cells in vitro. *J Dent Res* 2004;83(1):17-21.
- 25 Wada H, Tarumi H, Imazato S, Narimatsu M, Ebisu S. In vitro estrogenicity of resin composites. *J Dent Res* 2004;83:222-6.
- 26 Stanley HR. Effects of dental restorative materials: local and systemic responses reviewed. *J Am Dent Assoc*. 1993;124(10):76-80.
- 27 Stanley HR. Dental iatrogenesis. *Int Dent J* 1994;44:3-18.
- 28 Rakich DR, Wataha JC, Lefebvre CA, Weller RN. Effect of dentin bonding agents on the secretion of inflammatory mediators from macrophages. *J Endod* 1999;25(2):114-7.

-
- 29 Sloan AJ, Smith AJ (2007) Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis* 13:151–157
- 30 Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4(5):679-728..
- 31 Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent*. 2000 Feb;28(2):77-92. Review
- 32 Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H (1995) Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol* 39:273–280
- 33 Jontell M, Hanks CT, Bratel J, Bergenholtz G. Effects of unpolymerized resin components on the function of accessory cells derived from the rat incisor pulp. *J Dent Res* 1995 May;74(5):1162-7.
- 34 Braga RR, Ferracane JL. Alternatives in polymerization contraction stress management. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004 Jun 4;15(3):176-84.
- 35 Pfeifer CS, Ferracane JL, Sakaguchi RL, Braga RR. Factors affecting photopolymerization stress in dental composites. *J Dent Res*.2008;87(11):1043-7.
- 36 Kostoryz EL, Tong PY, Strautman AF, Glaros AG, Eick JD, Yourtee DM. Effects of dental resins on TNF-alpha-induced ICAM-1 expression in endothelial cells. *J Dent Res* 2001; 80(9):1789-92.
- 37 Gregson KS, Terrence O'Neill J, Platt JA, Jack Windsor L. In vitro induction of hydrolytic activity in human gingival and pulp fibroblasts by triethylene glycol dimethacrylate and monocyte chemotactic protein-1. *Dent Mater* 2008 Nov;24(11):1461-7. Epub 2008 Apr 24.
- 38 Rakich DR, Wataha JC, Lefebvre CA, Weller RN. Effects of dentin bonding agents on macrophage mitochondrial activity. *J Endod* 1998;24(8):528-33.
- 39 Silva LAB, Freitas AC, Carvalho FK, Queiroz AM, Nelson-Filho P, Porto-Neto ST. Direct pulp capping with a self-etching adhesive system: histopathologic evaluation in dogs' teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108(1):e34-40
- 40 Vallikathan Nadarajah, Robert E Cohen, Mirdza E Neiders, Alfredo Aguirre. Cellular inflammatory responses to implanted dental materials. *J Prosthet Dent* 1996;75(5):552-561
- 41 Mitra SB, Wu D, Holmes BN. An application of nanotechnology in advanced dental materials. *J Am Dent Assoc*.2003 Oct;134(10):1382-90.
- 42 Ferracane J. New polymer resins for dental restoratives. *Oper Dent. Supplement* 2001;6:199-209.
- 43 Weinmann W, Thalacker C, Guggenberger R. Siloranes in dental composites. *Dent Mater* 2005;21:68-74.

-
- 44 Wei YJ, Silikas N, Zhang ZT, Watts DC. Hygroscopic dimensional changes of self-adhering and new resin-matrix composites during water sorption/desorption cycles. *Dent Mater* 2011 Mar;27(3):259-66. Epub 2010 Nov 26.
- 45 Lien W, Vandewalle KS. Physical properties of a new silorane-based restorative system. *Dent Mater* 2010;26(4):337-44
- 46 Gao BT, Lin H, Han JM, Zheng G. Polymerization characteristics, flexural modulus and microleakage evaluation of silorane-based and methacrylate-based composites. *Am J Dent* 2011 Apr;24(2):97-102.
- 47 Al-Boni R, Raja OM. Microleakage evaluation of silorane based composite versus methacrylate based composite. *J Conserv Dent* 2010 Jul;13(3):152-5.
- 48 Usha H, Kumari A, Mehta D, Kaiwar A, Jain N. Comparing microleakage and layering methods of silorane-based resin composite in class V cavities using confocal microscopy: An in vitro study. *J Conserv Dent* 2011 Apr;14(2):164-8.
- 49 Mine A, De Munck J, Van Ende A, Cardoso MV, Kuboki T, Yoshida Y, Van Meerbeek B. TEM characterization of a silorane composite bonded to enamel/dentin. *Dent Mater* 2010 Jun;26(6):524-32.
- 50 Burke FJ, Crisp RJ, James A, Mackenzie L, Pal A, Sands P, Thompson O, Palin WM. Two year clinical evaluation of a low-shrink resin composite material in UK general dental practices. *Dent Mater* 2011 Jul;27(7):622-30.
- 51 Poggio C, Arciola CR, Rosti F, Scribante A, Saino E, Visai L. Adhesion of *Streptococcus mutans* to different restorative materials. *Int J Artif Organs* 2009;32(9):671-7.
- 52 Yaman BC, Efes BG, Dörter C, Gömeç Y, Erdilek D, Yazıcıoğlu O. Microleakage of repaired class V silorane and nano-hybrid composite restorations after preparation with erbium:yttrium-aluminum-garnet laser and diamond bur. *Lasers Med Sci* 2010 Feb 17.
- 53 Kopperud HM, Schmidt M, Kleven IS. Elution of substances from a silorane-based dental composite. *Eur J Oral Sci* 2010;118(1):100-2.
- 54 Papadogiannis D, Kakaboura A, Palaghias G, Eliades G. Setting characteristics and cavity adaptation of low-shrinking resin composites. *Dent Mater* 2009;25:1509-16.
- 55 Schweikl H, Altmannberger I, Hanser N, Hiller KA, Bolay C, Brockhoff G, Spagnuolo G, Galler K, Schmalz G. The effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cell cycle of mammalian cells. *Biomaterials* 2005a;26(19):4111-8.
- 56 Schweikl H, Hiller KA, Bolay C, Kreissl M, Kreismann W, Nusser A, Steinhauser S, Wiecek J, Vasold R, Schmalz G. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. *Biomaterials*. 2005b;26(14):1713-9.

57 Kostoryz EL, Tong PY, Chappelow CC, Eick JD, Glaros AG, Yourtee DM. In vitro cytotoxicity of solid epoxy-based dental resins and their components. *Dent Mater* 1999 Sep;15(5):363-73.

58a Eick JD, Kostoryz EL, Rozzi SM, Jacobs DW, Oxman JD, Chappelow CC, Glaros AG, Yourtee DM. In vitro biocompatibility of oxirane/polyol dental composites with promising physical properties. *Dent Mater* 2002 Jul;18(5):413-21.

59b Eick JD, Smith RE, Pinzino CS, Kotha SP, Kostoryz EL, Chappelow CC. Photopolymerization of developmental monomers for dental cationically initiated matrix resins. *Dent Mater* 2005 Apr;21(4):384-90.

60 Krifka S, Seidenader C, Hiller KA, Schmalz G, Schweikl H. Oxidative stress and cytotoxicity generated by dental composites in human pulp cells. *Clin Oral Investig* 2011 Jan 18.

61c Eick JD, Kotha SP, Chappelow CC, Kilway KV, Giese GJ, Glaros AG, Pinzino CS. Properties of silorane-based dental resins and composites containing a stress-reducing monomer. *Dent Mater* 2007; 23:1011-7.

62 Ilie N, Jelen E, Hickel R. Is the soft-start polymerisation concept still relevant for modern curing units? *Clin Oral Investig* 2011 Feb;15(1):21-9. Epub 2009 Nov 24.

63 International Standard ISO 7405:2008(E). Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry - Test methods for dental materials. 2008.

64 Cordeiro PG, Hidalgo DA. Conceptual considerations in mandibular reconstruction. *Clin Plast Surg* 1995 Jan;22(1):61-9. Review

65 Leonardo MR, Silva LA, Utrilla LS, Assed S, Ether SS. Calcium hydroxide root canal sealers--histopathologic evaluation of apical and periapical repair after endodontic treatment. *J Endod* 1997 Jul;23(7):428-32.

66 Da Silva LA, Leonardo MR, da Silva RS, Assed S, Guimarães LF. Calcium hydroxide root canal sealers: evaluation of pH, calcium ion concentration and conductivity. *Int Endod J* 1997 May;30(3):205-9.

67 Faraco Júnior IM. Estudo histopatológico dos tecidos periapicais de cães submetidos à ação de duas técnicas utilizadas na terapia endodôntica de dentes decíduos com polpa necrosada [Dissertação]. Araçatuba:Faculdade de Odontologia-UNESP; 1996.

68 Browne RM. Animal tests for biocompatibility of dental materials: relevance, advantages and limitations. *J Dent* 1994;22:21-24.

69 Willis-Owen AG, Flint J. The genetic basis of emotional behaviour in mice. *European J of Hum Genet* 2006;14: 721-728.

-
- 70 Nelson-Filho P. Avaliação da resposta inflamatória, após injeção de diferentes pastas à base de hidróxido de cálcio, no tecido conjuntivo subcutâneo e na cavidade peritoneal de camundongos isogênicos. Dissertação. Araraquara: Faculdade de Odontologia-UNESP, 1996.
- 71 International Standard ISO 10993-6. Biological evaluation of medical devices- Part 6: Tests for local effects after implantation. 1994:1-11.
- 72 Zmener O, Guglielmotti MB, Cabrini RL. Tissue response to an experimental calcium hydroxide-based endodontic sealer: a quantitative study in subcutaneous connective tissue of the rat. *Endod Dent Traumatol* 1990;6:66-72.
- 73 Zmener O, Guglielmotti MB, Cabrini RL. Biocompatibility of two calcium hydroxide-based endodontic sealers: a quantitative study in the subcutaneous connective tissue of the rat. *J Endod* 1988;14:229-35.
- 74 Zmener O. Tissue response to a new methacrylate-based root canal sealer: preliminary observations in the subcutaneous connective tissue of rats. *J Endod* 2004;30(5):348-51.
- 75 Zafalon EJ, Versiani MA, de Souza CJ, Moura CC, Dechichi P. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the subcutaneous connective tissue of rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:e88-94.
- 76 Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. *J Endod* 2004;30:95-9.
- 77 Sumer M, Muglali M, Bodrumlu E, Guvenc T. Reactions of connective tissue to amalgam, intermediate restorative material, mineral trioxide aggregate, and mineral trioxide aggregate mixed with chlorhexidine. *J Endod* 2006;32:1094-6.
- 78 Shimizu T, Kawakami T, Ochiai T, Kurihara S, Hasegawa H. Histopathological evaluation of subcutaneous tissue reaction in mice to a calcium hydroxide paste developed for root canal fillings. *J Int Med Res* 2004;32:416-21.
- 79 Olsson B, Sliwkowski A, Langeland K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *J Endod* 1981;7:355-67.
- 80 Ozbas H, Yaltirik M, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to compomers, composite and amalgam root-end filling materials. *Int Endod J* 2003;36:281-7.
- 81 Bilginer S, Esener T, Söylemezoğlu F, Tiftik AM. The investigation of biocompatibility and apical microleakage of tricalcium phosphate based root canal sealers. *J Endod* 1997;23:105-9.
- 82 Silva RAB. Hidróxido de Cálcio associado à Clorexidina – Estudo em Cultura de Células (RAW 264.7 e Cultura Primária de Células da Linhagem Osteoblástica) e em Tecido

Subcutâneo de Camundongos. Avaliação da Atividade Antimicrobiana. Tese. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia-USP, 2007.

83 Molloy D, Goldman M, White RR, Kabani S. Comparative tissue tolerance of a new endodontic sealer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;73:490-3.

84 Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. I. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1966;21:379-87.

85 Kolokuris I, Economides N, Beltes P, Vlemmas I. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the subcutaneous connective tissue of rats. *J Endod* 1998;24:82-5.

86 Langeland K, Guttuso J, Langeland LK, Tobon G. Methods in the study of biological responses to endodontic materials. *Oral Surg* 1969;27:522-42.

87 Batista RF, Hidalgo MM, Hernandez L, Consolaro A, Velloso TR, Cuman RK, Caparroz-Assef SM,

88 Kim JS, Baek SH, Bae KS. In vivo study on the biocompatibility of newly developed calcium phosphate-based root canal sealers. *J Endod* 2004;30:708-11.

89 Nadarajah V, Cohen RE, Neiders ME, Aguirre A. Cellular inflammatory responses to implanted dental materials. *J Prosthet Dent* 1996;75:552-61.

90 Mjör IA. Dentin permeability: the basis for understanding pulp reactions and adhesive technology. *Braz Dent J*. 2009;20(1):3-16.

91 Pashley DH. Dentin-predentin complex and its permeability: physiologic overview. *J Dent Res* 1985;64:613-20

92 Gerzina TM, Hume WR. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine in vitro. *J Dent* 1996;24:125-8.

93 Pameijer CH, Stanley HR. The disastrous effects of the "total etch" technique in vital pulp capping in primates. *Am J Dent*. 1998 Jan;11 Spec No:S45-54. Erratum in: *Am J Dent* 1998;11:148.

94 Accorinte Mde L, Loguercio AD, Reis A, Muench A, de Araújo VC. Adverse effects of human pulps after direct pulp capping with the different components from a total-etch, three-step adhesive system. *Dent Mater* 2005;21:599-607.

95 Koliniotou-Koumpia E, Tziafas D. Pulpal responses following direct pulp capping of healthy dog teeth with dentine adhesive systems. *J Dent* 2005;33:639-47.

96 Fernandes AM, Silva GA, Lopes N Jr, Napimoga MH, Benatti BB, Alves JB. Direct capping of human pulps with a dentin bonding system and calcium hydroxide: an

immunohistochemical analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:385-90.

97 Anagnostou M, Chatzianni E, Doucoudakis S, Potamianou A, Tesseromatis C. Biocompatibility of resin composites subcutaneously implanted in rats with experimentally induced arthritis. *Dent Mater* 2009;25:863-7.

98 Senawongse P, Pongprueksa P. Surface roughness of nanofill and nanohybrid resin composites after polishing and brushing. *J Esthet Restor Dent* 2007;19:265-73.

99 Hansasuta C, Neiders ME, Aguirre A, Cohen RE. Cellular inflammatory responses to direct restorative composite resins. *J Prosthet Dent* 1993;69:611-6.

100 Choi KK, Condon JR, Ferracane JL. The effects of adhesive thickness on polymerization contraction stress of composite. *J Dent Res* 2000;79:812-7.

101 Friedl, S. Schmalz, H. Placement and replacement of composite restorations. *Oper Dent* 1995; 20:34-38.

102 Ferracane JL. Developing a more complete understanding of stresses produced in dental composites during polymerization. *Dent Mater* 2005;21:36-42.

103 Weinmann W, Thalacker C, Guggenberger R. Siloranes in dental composites. *Dent Mater* 2005;21:68-74.

104 Palin WM, Fleming GJ, Burke FJ, Marquis PM, Randall RC. The influence of short and medium-term water immersion on the hydrolytic stability of novel low-shrink dental composites. *Dent Mater* 2005;21:852-63.

105 Ilie N, Hickel R. Macro-, micro- and nano-mechanical investigations on silorane and methacrylate-based composites. *Dent Mater* 2009;25:810-9.

106 Rowe AH. Problems of intracanal testing of endodontic materials. *Int Endod J* 1980;13:96-103.

107 Holland R. et al. Healing process os the pulp stump and periapical tissue in dog teeth.III Histopathological findings following root filling with with calcium hydroxide. *Rev Fac Odontol Araçatuba* 1978;7:25-37.

108 Citrome GP, Kaminski EJ, Heur MA. A comparative study of took apexification in the dog. *J Endod* 1979;5:1110-6.

109 Leonardo MR. Contribuição para o estudo da reparação apical e periapical pós-tratamento de canais radiculares [tesis]. Faculdade de Farmácia de Araraquara, São Paulo; 1973.

-
- 110 Queiroz AM, Assed S, Leonardo MR, Nelson-Filho P, Silva LAB. MTA and calcium hydroxide for pulp capping. *J Appl Oral Sci* 2005;13:126-30
- 111 Asgary S, Eghbal MJ, Parirokh M, Ghanavati F, Rahimi H. A comparative study of histologic response to different pulp capping materials and a novel endodontic cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106:609-14.
- 112 Nelson-Filho P. Efeito da endotoxina (LPS) associada ou não ao hidróxido de cálcio, sobre os tecidos apicais e perapicais de dentes de cães: avaliação histopatológica [Tese]. Araraquara: Univ. Estadual Paulista; 2000.
- 113 Queiroz AM. Adesivo dentinário autocondicionante e Agregado de Trióxido Mineral (MTA): avaliação histopatológica após aplicação direta sobre o tecido pulpar, em dentes de cães [Dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2002.
- 114 Nakashima M. Induction of dentine in amputated pulp of dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins-2 and -4 with collagen matrix. *Arch Oral Biol* 1994;39(12):1085-9.
- 115 Katebzadeh N, Hupp J, Trope M. Histological periapical repair after obturation of infected root canals in dogs. *J Endod* 1999;25(5):364-8.
- 116 Faraco Junior IM, Holland R. Histomorphological response of dogs' dental pulp capped with white mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J* 2004;15(2):104-8. Epub 2005 Mar 11.
- 117 Leonardo MR, Flores DS, de Paula E Silva FW, de Toledo Leonardo R, da Silva LA. A comparison study of periapical repair in dogs' teeth using RoekoSeal and AH plus root canal sealers: a histopathological evaluation. *J Endod* 2008 Jul;34(7):822-5. Epub 2008 May 16.
- 118 Silva LAB, Leonardo MR, Oliveira DSB, Silva RAB, Queiroz AM, Gatón-Hernández P, Nelson-Filho P. Histopathological evaluation of root canal filling materials for primary teeth. *Braz Dent J* 2010;21(1):38-45.
- 119 Mjor IA. Interactions between filling materials and the dental pulp. *Inf Dent* 1983;65(38):3605-12.
- 120 Trowbridge H, Edwall L, Panopoulos P. Effect of zinc oxide-eugenol and calcium hydroxide on intradental nerve activity. *J Endod* 1982 Sep;8(9):403-6.
- 121 Garberoglio R, Brännström M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Arch Oral Biol* 1976;21(6):355-62.
- 122 Pashley DH. Dentin-predentin complex and its permeability: physiologic overview. *J Dent Res* 1985;64 Spec No:613-20.

-
- 123 Pashley DH, Andringa HJ, Derkson GD, Derkson ME, Kalathoor SR. Regional variability in the permeability of human dentine. *Arch Oral Biol* 1987;32(7):519-23
- 124 Goodis HE, Schein B, Stauffer P. Temperature gradients at two locations within the tooth during cavity preparation in vitro. *J Prosthet Dent* 1988 Dec;60(6):684-8.
- 125 Pashley DH, Matthews WG, Zhang Y, Johnson M. Fluid shifts across human dentine in vitro in response to hydrodynamic stimuli. *Arch Oral Biol* 1996 Nov;41(11):1065-72.
- 126 Murray PE, About I, Lumley PJ, Franquin JC, Remusat M, Smith AJ. Human odontoblast cell numbers after dental injury. *J Dent* 2000 May;28(4):277-85.
- 127 Murray PE, About I, Lumley PJ, Smith G, Franquin JC, Smith AJ. Postoperative pulpal and repair responses. *J Am Dent Assoc* 2001 Mar;131(3):321-9.
- 128 Wisithphrom K, Murray PE, About I, Windsor LJ. Interactions between cavity preparation and restoration events and their effects on pulp vitality. *Int J Perio Rest Dent* 2006 Dec;26(6):596-605.
- 129 Duque C, Hebling J, Smith AJ, Giro EM, Oliveira MF, de Souza Costa CA. Reactionary dentinogenesis after applying restorative materials and bioactive dentin matrix molecules as liners in deep cavities prepared in nonhuman primate teeth. *J Oral Rehabil* 2006 Jun;33(6):452-61
- 130 Murray PE, Hafez AA, Smith AJ, Cox CF. Hierarchy of pulp capping and repair activities responsible for dentin bridge formation. *Am J Dent* 2002 Aug;15(4):236-43.
- 131 Pameijer CH. On the clinical performance of a glass ionomer cement. *Swed Dent J Suppl.* 1991;80:1-117.
- 132a Pereira SA, de Menezes FC, Rocha-Rodrigues DB, Alves JB. Pulp reactions in human teeth capped with self-etching or total-etching adhesive systems. *Quintessence Int* 2009 Jun;40(6):491-6.
- 133b Pereira JC, Segala AD, Costa CA. Human pulpal response to direct pulp capping with an adhesive system. *Am J Dent* 2000 Jun;13(3):139-47.
- 134 Accorinte ML, Loguercio AD, Reis A, Muench A, Araújo VC. Adverse effects of human pulps after direct pulp capping with the different components from a total-etch, three-step adhesive system. *Dent Mater* 2005; 21:599-607.
- 135 Hörsted-Bindslev P, Vilkinis V, Sidlauskas A. Direct capping of human pulps with a dentin bonding system or with calcium hydroxide cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003 Nov;96(5):591-600.

136 Hörsted-Bindslev P, Vilkinis V, Sidlauskas A. Direct capping of human pulps with a dentin bonding system or with calcium hydroxide cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003 Nov;96(5):591-600.

137 Sübay RK, Demirci M. Pulp tissue reactions to a dentin bonding agent as a direct capping agent. *J Endod* 2005 Mar;31(3):201-4.

138 Silva LAB, Freitas AC, Carvalho FK, Queiroz AM, Nelson-Filho P, Porto-Neto ST. Direct pulp capping with a self-etching adhesive system: histopathologic evaluation in dogs' teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108(1):e34-40.

139 Gwinnett AJ, Tay F. Early and intermediate time response of the dental pulp to an acid etch technique in vivo. *Am J Dent* 1998 Jan;11 Spec No:S35-44.

140 Pameijer CH, Stanley HR. The disastrous effects of the "total etch" technique in vital pulp capping in primates. *Am J Dent*. 1998 11 Spec No:S45-54. Erratum in: *Am J Dent* 1998; 11(3):148.

141 1: Silva LA, Leonardo MR, Faccioli LH, Figueiredo F. Inflammatory response to calcium hydroxide based root canal sealers. *J Endod* 1997 Feb;23(2):86-90.

142 Elias RV, Demarco FF, Tarquinio SB, Piva E. Pulp responses to the application of a self-etching adhesive in human pulps after controlling bleeding with sodium hypochlorite. *Quintessence Int* 2007 Feb;38(2):e67-77.

143 Gerzina TM, Hume WR. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine in vitro. *J Dent* 1996;24(1-2):125-8

144 Polydorou O, König A, Hellwig E, Kümmerer K. Urethane dimethacrylate: a molecule that may cause confusion in dental research. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009 Oct;91(1):1-4.

145 Franz A, Konradsson K, König F, Van Dijken JW, Schedle A. Cytotoxicity of a calcium aluminate cement in comparison with other dental cements and resin-based materials. *Acta Odontol Scand* 2006 Feb;64(1):1-8.

146 Mitra SB, Wu D, Holmes BN. An application of nanotechnology in advanced dental materials. *J Am Dent Assoc* 2003 Oct;134(10):1382-90.