

**LIBERACIÓN DE  
CALCIO DE UN  
SISTEMA MATRICIAL  
PARA TERAPIA  
ENDODÓNTICA.  
ESTUDIO PILOTO**

**R. Sabaté<sup>1</sup> // G. Sanchez<sup>2</sup> // A.C. Rodríguez  
Llimós<sup>3</sup> // J. Fernandez Monjes<sup>4</sup> // C. Bregni<sup>3</sup> // G.  
Alonso<sup>2</sup> // B. Maresca<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Cátedra de Endodoncia y <sup>2</sup>Cátedra de Biofísica, Facultad de Odontología. <sup>3</sup>Cátedra de Farmacotecnia, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. <sup>4</sup>Ex docentes de la Cátedra de Endodoncia, Facultad de Odontología, UBA.

## Introducción

Se conoce que la concentración del ión calcio actuaría positivamente en el proceso reparativoápico periapical. Tal efecto se halla relacionado a la modulación de un gen osteoblástico.. El alto contenido de calcio proporcionado al medio extracelular, sumado a la presencia de calcio generado durante la desmineralización del tejido óseo presente en la zona de la lesión, induce a la homeostasis o equilibrio biológico a través de un mecanismo de feedback negativo. Dicho equilibrio se debe en parte a la inducción de la apoptosis en osteoclastos y al estímulo de liberación de interleuquina 6 de los monocitos de la médula ósea local, que mediante un receptor sensible al calcio (presente en osteoblastos, osteocitos y células de la médula ósea, pero raramente en osteoclastos) estimula la quimiotaxis y la síntesis de ADN en células de la serie monocitos macrófagos J774. (Adebanjo et al 1998<sup>2</sup>; Yamaguchi et al 1998<sup>3</sup>). Estos efectos han sido observados en presencia de concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  iguales o mayores a 2,8 mM o ante la presencia de neomicina (agonista de los receptores sensibles al calcio) 100  $\mu\text{m}$ . Tal conocimiento impulsó intentos de adicionar calcio a la PLRM bajo diferentes formas químicas (hidróxido de calcio, hidroxiapatita, fosfato tricálcico, óxido de calcio) no habiéndose obtenido resultados exitosos, ya que se produce una modificación sustancial de su comportamiento reológico.

Maresca et al (SAIO 2000) <sup>1</sup> informaron sobre el desarrollo de un recurso tecnológico denominado microencapsulación que permite la liberación controlada y sostenida de calcio contenido en microesferas aerodibiles y biodegradables.

El mencionado recurso representa un método de gran utilidad a efectos de proporcionar una concentración de calcio adecuada en la zona de una lesiónápico periapical con el objeto de favorecer los procesos de reparación.

El propósito de este trabajo fue verificar la liberación controlada y sostenida de calcio a partir de la preparación pasta lentamente reabsorbible de Maisto/microesferas de alginato de calcio (PLRM/MAC) en un modelo experimental murino, a una proporción de microesferas de alginato de calcio que no altera el comportamiento reológico del material de obturación endodóntico estudiado.

## **Materiales y métodos**

### *1. Síntesis de microesferas de alginato de calcio marcadas.*

El método de formación de las microesferas es un método de gelificación iónica con un paso intermedio de formación de una emulsión. (Fundueanu et al, 1998)<sup>4</sup>. Consiste en suspender el compuesto que se va a encapsular en una solución acuosa de alginato sódico, adicionando la mezcla mediante goteo, sobre una solución acuosa de cloruro de calcio que se encuentra sometida a una velocidad de agitación adecuada. Al entrar la gota de alginato sódico en contacto con  $\text{Ca}^{++}$  se produce la gelificación instantánea de la misma obteniéndose microesferas de alginato de calcio insoluble en agua pero permeable<sup>5</sup>.

La técnica de microencapsulación utilizada por Bregni, C et al y descrita por Maresca et al (2002)<sup>6</sup> fue modificada obteniendo microesferas con carbonato de calcio y cloruro de calcio marcadas con <sup>45</sup>Ca.

Este proceso de obtención de MAC transcurre en condiciones extremadamente suaves, debido a que no requiere disolventes orgánicos, de agitación enérgica y calos, ni de agentes reticulantes perjudiciales.

### *2. Caracterización de las microesferas.*

El tamaño y distribución de tamaño de las microesferas se determinó mediante tamices estándares (USP).

Para determinar las características morfológicas (forma superficial) se sometieron a microscopía electrónica de barrido.

### *3. Análisis mediante EDAX.*

Las microesferas fueron sometidas al análisis por dispersión de rayos X en un EDAX 9100 con impacto de disparo de 200 nm.

### *4. Modelo experimental.*

Se emplearon 8 ratas Wistar machos de 300 gramos de peso. Se colocaron 3 tubitos de teflón en el tejido subcutáneo de cada animal en diferentes regiones topográficas de la espalda y patas traseras. Los tubitos (utilizados con el objeto de contener los materiales a estudiar) permanecieron posicionados durante períodos de tiempo de 24, 72 y 168 horas. Los animales se clasificaron en 2 grupos según el contenido de los tubitos: Grupo A): PLRM 150 mg + MAC marcadas 50 mg (n=3) y Grupo B): lanolina 150mg + MAC marcadas 50 mg (n=3). Dos animales se emplearon como controles y se posicionaron en ellos tubitos conteniendo PLRM 150 mg y otro lanolina 150 mg. Luego de transcurridos los intervalos de tiempo mencionados se procedió al sacrificio de los animales bajo anestesia con dietil éter a dosis adecuadas; se retiraron los tubitos del tejido celular subcutáneo y se midió la radiactividad remanente en el contenido de los mismos en un contador de centelleo líquido. Para ello se tomó el contenido de los tubos y se solubilizó en solución buffer MOPS-TRIS 50 mM, pH 7,4. Luego se tomaron alícuotas de diferente volumen y se incluyeron en solución de centelleo.

### *5. Análisis de datos.*

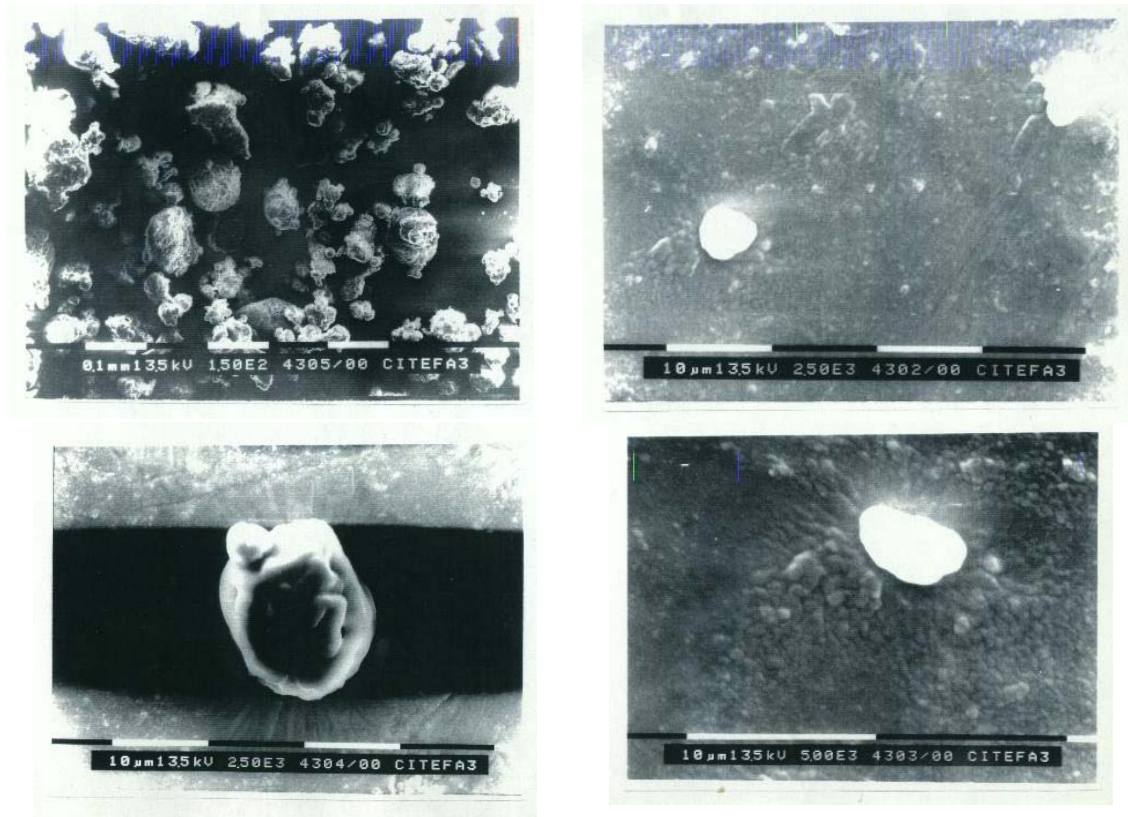
Los datos se expresan con indicación de DS. La diferencia entre medias de grupos se estudió a través del test t de Student con un nivel de significación de  $p < 0,05$ . Se empleó para tal tarea aplicaciones software adecuadas (Primer 3.02, Mc Graw Hill, St Louis, USA). El ajuste de curvas se llevó a cabo a través del método de cuadrados mínimos haciendo uso del algoritmo de Gauss (Fraser & Susuki, 1973)<sup>7</sup>.

### *6. Origen y calidad de los reactivos.*

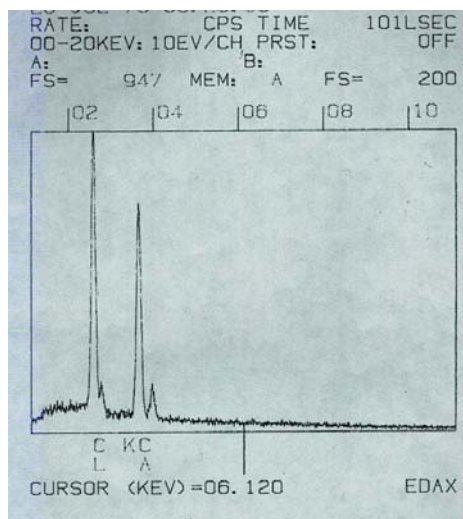
Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica. El <sup>45</sup>Ca( $\text{CaCl}_2$ ) empleado en la síntesis de las microesferas de alginato de calcio fue provisto por Sigma (New England, USA).

## Resultados

Se obtuvieron microesferas de alginato de calcio de distintos tamaños, eligiendo las de tamaño menor a 105  $\mu\text{m}$ .



El análisis con EDAX mostró que las microesferas están constituidas por Calcio 53,65%, Cloruro 45,42%, Potasio 0,93%.



```

LIST--ZAF:
LABEL =
26-JUL-73 00:19:04
101.280 LIVE SECONDS
KV= 20. TILT= 0. TKOFF=25
ZAF CORRECTION

ELEM  K    Z    A    F
CLK  0.4355  0.987  0.946  1.027
K K  0.0070  0.990  0.727  1.051
CAK  0.4301  1.013  0.792  1.000

ELEM      CPS      WT %
CL K      71.3664   45.42
K K        1.0367    0.93
CA K      59.1330   53.65
-----
100.00
    
```

La figura 1 muestra el porcentaje de calcio remanente en los tubitos luego de transcurridos los intervalos de tiempo ya mencionados para los Grupos A y B. Se hallaron diferencias significativas entre las medidas de ambos grupos para los intervalos de tiempo 24 hs ( $t= 4.70$ ,  $p=0.009$ ,  $gl= 8$ ), 72 hs ( $t=10.35$ ,  $p<0.001$ ,  $gl=8$ ) y 168 hs ( $t=3.04$ ,  $p=0.039$ ,  $gl=8$ ). Ello evidencia que la liberación de calcio

de la preparación PLRM/MAC es mas lenta si se compara con la preparación lanolina/MAC.

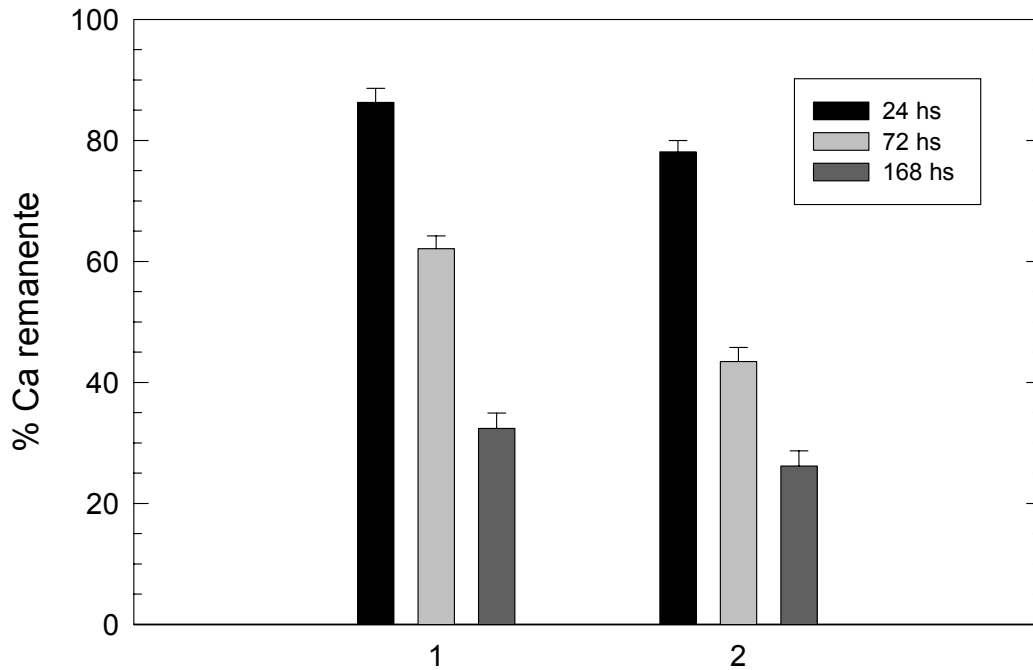


Fig 1. Porcentaje de calcio remanente en tubos de teflón posicionados en el tejido celular subcutáneo de la rata luego de 24, 72 y 168 hs. 1: PLRM 150 mg + MAC marcadas 50 mg (n=3) y 2: lanolina 150 mg + MAC marcadas 50 mg (n=3).

La figura 2 muestra el porcentaje de calcio remanente (representado en escala logarítmica) en función del tiempo. El ajuste de los datos a rectas permite estimar el tiempo en el cual el porcentaje de calcio remanente es mínimo, obteniéndose los siguientes resultados: Grupo A: 28 días y Grupo B: 23 días. Esto indica que la preparación PLRM/MAC presenta una liberación de calcio mas sostenida en el tiempo que la preparación lanolina/MAC.

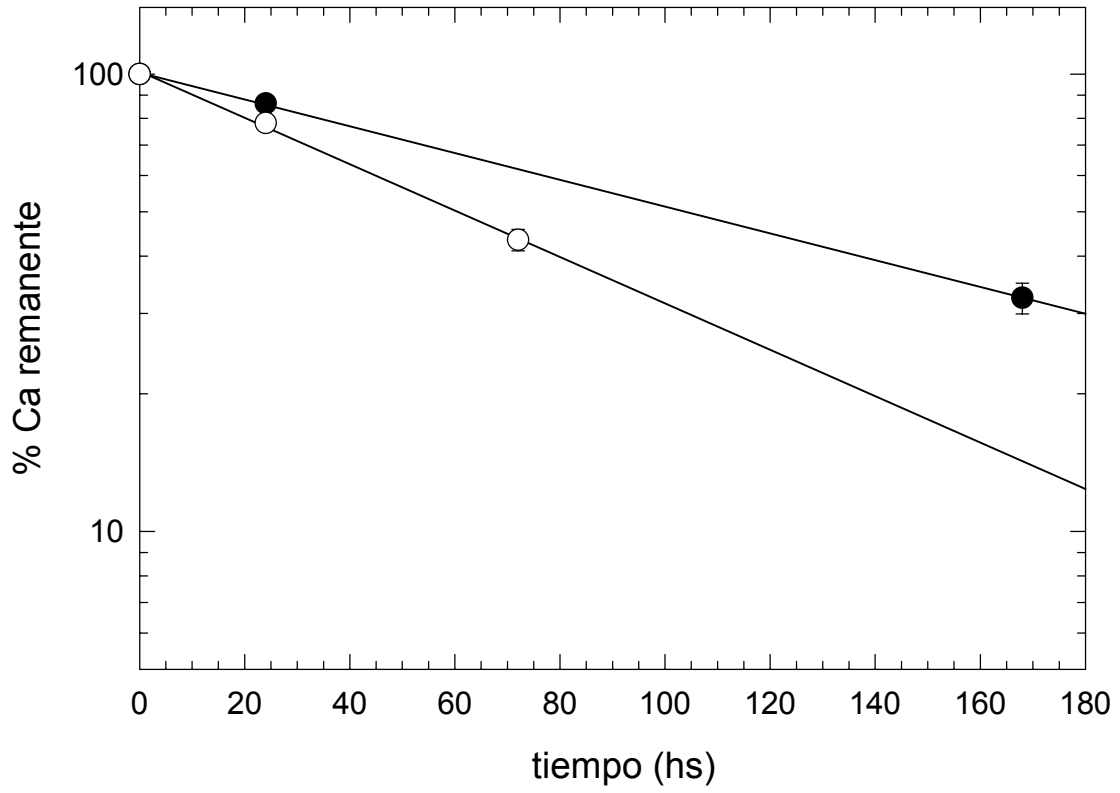


Fig 2. Porcentaje de calcio remanente en tubos de teflón posicionados en el tejido celular subcutáneo de la rata luego de 24, 72 y 168 horas. (●) PLRM 150 mg + MAC marcadas 50 mg (n=3).

## Discusión

Desde su introducción en 1867 por Bowman<sup>8</sup>, la gutapercha es el material de elección para la obturación de conductos radiculares.

Los cementos selladores para la obturación de conductos han sido concebidos para estar confinados en el interior del espacio endodóntico y hasta el límite ideal de trabajo como complemento de los conos de gutapercha con el objeto de lograr una obturación inerte y hermética<sup>9 10 11 12</sup>.

La infección remanente por la compleja anatomía radicular en conductillos dentinarios, deltas apicales, conductos laterales y las imperfecciones de la preparación quirúrgica (Maisto, O 1984)<sup>13</sup> son factores que dificultan la obturación y por ende influyen en el éxito del tratamiento.

El intento de superar estos inconvenientes llevó a la industria dental a incorporar a los materiales de obturación distintas sustancias antisépticas (N<sub>2</sub>: AGSA, Suiza; cemento de Rickert: KERR SYBRON Corp, USA), corticoesteroides (RC" B; Endomethasone: SEPTODONT, Paris), calcio (Sealapeex: KERR SYBRON Corp, EUA; CRCS: HYGENIC Co, EUA; entre otros) y hasta yodoformo (Vitapex, presentado por Kawakami en 1987: NEO DENTAL CHEMICAL PRODUCTS, Japón), para ejercer una acción coadyuvante dentro del conducto radicular, acción que en los cementos selladores se ejerce solo hasta que concluye su fraguado.

Maisto, O; sostenía que la permanencia de infección debida a las dificultades anatómicas que en cada caso se oponen a una preparación quirúrgica ideal sumada a los inconvenientes de las técnicas operatorias del proceso de obturación, crean impedimentos en el orden quirúrgico que tratamos de compensar con otros "medios terapéuticos".

El empleo de pastas antisépticas para obturar conductos se basa en la acción terapéutica de sus componentes sobre las paredes del conducto y sobre la zona periapical (Maisto, O 1984)<sup>14</sup>.

Maresca, B sostiene que con la utilización de la PLRM (Según fórmula original de Maisto, O 1962) se ejerce una acción terapéutica no solo dentro del conducto radicular y su área de influencia, sino inclusive en el mismo sitio de la lesión a través de la sobreobturación con dicho material.

Utilizando como recurso tecnológico la microencapsulación se incorpora a un material de obturación endodóntico permanente como la PLRM (cuyas propiedades físico químicas, mecánicas, reológicas y bacteriológicas ya han sido estudiadas por Maresca et al 1997<sup>15</sup>) un determinado principio activo, en este caso el ión calcio, que de otra manera sería incompatible en la misma forma farmacéutica.

Así obtenemos una liberación controlada y sostenida en el tiempo del principio activo encapsulado, sumado a la liberación lenta de yodo contenido en la fórmula de la PLRM (Fernández Monjes, J et al 1994)<sup>16</sup> sin alterar el comportamiento reológico del material utilizado como vector (Maresca et al, 2000)<sup>1</sup>.

Una pequeña sobreobturación con dicho material (PLRM/MAC) sumaría a la acción terapéutica de la PLRM la acción del calcio, actuando positivamente en el proceso reparativoápico periapical.

En este trabajo se presentan resultados piloto relativos a la liberación de calcio de la preparación PLRM/MAC en un modelo experimental murino. Se observó que la liberación de calcio de la preparación PLRM/MAC es mas lenta que la liberación de la preparación lanolina/MAC. Ello sugiere que la interacción con los componentes de la PLRM retardaría el movimiento de las microesferas, y por ende del calcio en ellas contenido, hacia los tejidos circundantes al tubo de teflón. Ello constituiría una ventaja pues permite una liberación sostenida de calcio de mayor persistencia en el tiempo. Los resultados indican que existe una liberación de calcio controlada y sostenida en el tiempo de la preparación en estudio en este modelo experimental a una proporción de MAC que no altera el comportamiento reológico del material de obturación. Los resultados aquí presentados contribuyen a una mejor comprensión del comportamiento de las microesferas de alginato de calcio combinadas con la PLRM, que además de liberar yodo actúa como vector de las MAC para la liberación

de calcio. No obstante, por tratarse de un estudio piloto, estos resultados serán validados por estudios posteriores que involucren a un mayor número de unidades experimentales.

## Bibliografía

1. Sabaté R. (2001). Alginate microspheres in an endodontic filling material. *J Dent Res* 80(4): 949.
2. Adebajo O, Moonga B, Yamate T, Sun L, Minkin C, Abe E and Zaidi M. (1988). Mode of action of interleukin-6 on mature osteoclasts. Novel interactions with extracellular  $Ca^{2+}$  sensing in the regulation of osteoclastic bone resorption. *J Cell Biol* 142(5): 1347-1356.
3. Yamaguchi T, Kifor O, Chattopadhyay N, Bai M and Brown EM. (1998). *J Bone Miner Res* 13(9): 1390-1397.
4. Fundueanu G, Eposito D and Mihai D. (1998). Preparation and characterization of Ca-alginate microspheres by a new emulsification method. *Int J Pharmaceutics* 170: 11-21.
5. Técnica Farmacéutica. Vol. I. Cap. 10: Microencapsulado de medicamentos. pp. 601-602. Supervisor José Luis Lastre García. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
6. Sabaté R, Rodríguez Llimos AC, F Monjes J, Sánchez G, Alonso G y Maresca B. (2002). Liberación de calcio de la preparación PLRM/MAC en un modelo experimental. XXXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Odontológica. Bs. As. Argentina.
7. Fraser R and Suzuki E. (1973). The use of least squares in data analysis, en: Leach S (Ed.) *Physical principles and techniques of protein chemistry. Parte C*, pp. 301-355. Academic Press, New York, USA.
8. Bowman GA. (1968). *History of dentistry in Missouri*. Fulton, MO, Ovid Bell Press. Pág. 423.
9. Grosman, L. *Práctica endodóntica*. 9na Edición. Editorial Mundi. (1981). Capítulo 17, pág. 316.
10. Ingle, J. *Endodoncia*. 4ta Edición. Editorial Interamericana. Capítulo 4, pág. 239.
11. Cohen, S. *Los caminos de la pulpa*. 4ta Edición. Editorial Panamericana. (1991). Capítulo 8, pág. 243.
12. Walton, R. *Endodoncia: principios y práctica clínica*. Editorial Interamericana. (1994). Capítulo 14, pág. 242.
13. Maisto, O. *Endodoncia*. Editorial Mundi. (1984). pág. 200.
14. Maisto, O. *Endodoncia*. Editorial Mundi. (1984). pág. 209.
15. Maresca B, Mascaro A, Ferreira, S, F Monjes J y Sierra L. (1997). Estudio fisicoquímico del sistema óxido de cinc-yodoformo en un material de obturación endodóntica. *Bolletino Chimico Farmaceutico. Rivista di Scienze Farmaceutiche e Biologiche* 136, 488-491.
16. (2000) Titulación de yoduros en pastas antisépticas para obturación de conductos Fernandez Monjes Jorge, Maresca B, Bregni C, Guarco C, Szeliga E, Fernandez Monjes Eduardo. XXXII Reunión Científica Anual de la División Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica