

Evaluación de la citotoxicidad de la Clindamicina en cultivos de fibroblastos gingivales humanos

Evaluation of the cytotoxicity of Clindamycin in cultures of gingival human fibroblasts

PhD. Dr. Ricardo Cabrales Salgado,^I PhD. Dr. Andrea Kanako Yamazaki,^I PhD. Dr. Antonio Díaz Caballero,^{II} PhD. Dr. Igor Prokopowitsch^I

^IUniversidad de São Paulo. Brasil.

^{II}Facultad de Odontología. Universidad de Cartagena. Colombia.

RESUMEN

Introducción: la presencia de microorganismos residuales post-preparación químico-quirúrgico de los conductos radiculares, sugiere el empleo de medicación intracanal eficaz y biológicamente compatible con los tejidos periapicales.

Objetivo: comparar la citotoxicidad de medicaciones de uso intracanal en fibroblastos gingivales humanos.

Métodos: estudio de tipo experimental. Con cuatro diferentes grupos: control (G1), Clorhidrato de Clindamicina 2g asociado a fosfato de dexametasona 0,32g (Clindex) vehiculado en solución alcohólica (G2), Clindex Vehiculado en polietilenoglicol 400 (G3), y NDP: paramonoclorofenol asociado a fosfato de dexametasona 0,32g vehiculado en polietilenoglicol 400 y solución salina (G4). Las células fueron estimuladas con las medicaciones por 24, 48 y 72 horas y la viabilidad celular fue evaluada usando la técnica de análisis de MTT y la lectura fue realizada en el espectrofotómetro de ELISA.

Resultados: fueron analizados por medio de la actividad mitocondrial y mostraron que el G2 obtuvo los mejores resultados en los tres tiempos estudiados, seguido por el G3 y el G4. Se realizó análisis estadístico (ANOVA y complementado con la prueba de Tukey) mostraron diferencias significante a nivel de 1% G2 y G3 cuando se compararon con el G4.

Conclusión: la combinación Clindamicina dexametasona independiente del vehículo presentó mayor viabilidad celular que el paramonoclorofenol asociado a fosfato de dexametasona.

Palabras clave: Endodoncia, sistemas de medicación, Clorhidrato de Clindamicina, cultivos celulares (DeCS Bireme).

ABSTRACT

Introduction: the presence of residual microorganisms after chemical-surgical preparation of root canals suggests the use of effective intracanal medication, biologically compatible with periapical tissues.

Objective: compare the cytotoxicity of intracanal medications in gingival human fibroblasts.

Methods: an experimental study was conducted with four different groups: control (G1), Clindamycin Hydrochloride 2g associated to dexamethasone phosphate 0.32g (Clindex) vehicled in alcoholic solution (G2), Clindex vehicled in polyethylene glycol 400 (G3), and NDP: paramonochlorophenol associated to dexamethasone phosphate 0.32g vehicled in polyethylene glycol 400 and saline solution (G4). The cells were stimulated with the medications for 24, 48 and 72 hours. Cell viability was evaluated with the technique of MTT analysis. Readings were performed in an ELISA spectrophotometer.

Results: the groups were analyzed in terms of mitochondrial activity. G2 had the best results in the three times studied, followed by G3 and G4. A statistical analysis was performed (ANOVA and complemented by Tukey's test). Significant differences of 1% were found when comparing G2 and G3 with G4.

Conclusion: the Clindamycin dexamethasone combination, irrespective of the vehicle, showed greater cell viability than paramonochlorophenol associated to dexamethasone phosphate.

Key words: endodontics, medication systems, Clindamycin Hydrochloride, cell cultures (DeCS Bireme)

INTRODUCCIÓN

La medicación intracanal ocupa un lugar destacado en la modulación del proceso inflamatorio y el mantenimiento de la limpieza y desinfección del sistema de canales radiculares por la acción efectiva sobre los microorganismos residuales.^{1, 2}

La efectividad de la medicación intracanal depende del contacto íntimo con las paredes del canal, de su concentración y del tiempo de acción. La acción medicamentosa se da por lograr llegar a áreas no trabajadas con la instrumentación, como istmos, ramificaciones, canales recurrentes y túbulos dentinarios, los cuales son totalmente colonizados por bacterias.^{3, 4}

La Clindamicina es un fármaco derivado de la Lincomicina, la cual atraviesa fácilmente las barreras de los tejidos, presentando la propiedad de penetrar en el interior de los macrófagos y leucocitos polimorfonucleares, lo que puede explicar la alta concentración de esta droga en abscesos.⁵ Debido a su excelente penetración en el tejido óseo, la clindamicina es considerada el fármaco de elección para el tratamiento

de infecciones endodónticas en pacientes alérgicos a la penicilina y en los casos resistentes.⁶

La acción de la clindamicina utilizada como alternativa de medicación intracanal fue evaluada por Molander, Reit y Dahlén en 1990⁷, y por Mohammadi y Abbott (2009) donde observaron que la clindamicina ofrece una ventaja antimicrobiana adicional sobre la medicación de hidróxido de calcio, pudiendo ser recomendada en la terapéutica convencional rutinaria.⁸

Analizando su acción como medicación intracanal,⁹ Gilad y otros en 1999 desarrollaron una fibra impregnada con clindamicina para la liberación lenta y constante en el interior del canal radicular. Desarrollaron tres análisis: 1) evaluación de la efectividad de la clindamicina frente a microorganismos comúnmente encontrados en infecciones endodónticas, *S. intermedius*, *P. micros*, *F. nucleatum* y *P. intermedia*, 2) en dientes contaminados con cultivos puros y 3) combinaciones mixtas de estos microorganismos. El dispositivo permaneció intracanal por un periodo de 7 días. Los resultados demostraron la eficacia de este sistema contra *P. intermedia* y *F. nucleatum* y menor eficiencia sobre *P. micros*. La medicación propuesta es eficaz en la reducción de la microbiota intracanal.⁹

En el 2003, Lin S, Levin L, Peled M, Weiss EI, Fuss evaluaron la acción de la perfusión intradentaria de la clindamicina y tetraciclina en dentina bovina, contaminada por *Streptococcus sanguis*. Fue posible observar que la clindamicina 2 % mostró ser más efectiva cuando fue comparada con la tetraciclina.¹⁰

Una especie bacteriana frecuentemente encontrada en los casos de fracaso endodóntico es el *Actinomyces* spp y por ese motivo, LeCorn y otros en el 2007 evaluaron la susceptibilidad de esas especies frente a diferentes antimicrobianos, para que puedan ser utilizados en contacto con el tejido apical en cirugías endodónticas.⁶ La concentración inhibitoria mínima fue establecida por medio de E-test, resultando de mayor eficacia la clindamicina.

Estableciendo los conceptos en ese orden de ideas, el presente estudio tuvo como objetivo comparar la citotoxicidad del Clorhidrato de Clindamicina asociada a dexametasona vehiculada en solución alcohólica o en polietilenoglicol 400 y el NDP (fosfato de dexametasona, paramonoclorofenol, vehiculado en polietilenoglicol 400 y solución salina) usados como medicaciones de uso intracanal en células de fibroblastos gingivales humanos.

MÉTODOS

Estudio experimental con 4 diferentes grupos que fueron: grupo I control; el grupo II utilizó Clorhidrato de Clindamicina 2g asociado a dexametasona 0,32 g vehiculado en solución alcohólica 54ml; el grupo III utilizó Clorhidrato de Clindamicina 2 g asociado a dexametasona 0,32 g vehiculado en polietilenoglicol 400; el grupo IV utilizó NDP (fosfato de dexametasona 0,32 g, paramonoclorofenol 2 g, vehiculado en polietilenoglicol 400 y solución salina qsp 100 ml).

El presente estudio fue aprobado por el comité de ética en investigaciones de la Facultad de Odontología de la Universidad de Sao Paulo, siguiendo los parámetros bioéticos establecidos en la declaración del Informe de Helsinki con el uso de células y tejidos de origen humano en procesos de investigación.

Se utilizaron fibroblastos gingivales humanos (FMM1), cedidos por el laboratorio de investigaciones del departamento de odontología de la Universidad de Sao Paulo (FOUSP).

Todos los procedimientos experimentales, para la obtención del cultivo celular de fibroblastos fueron realizados en una cabina de flujo laminar bajo un estricto protocolo de desinfección a temperatura ambiente.¹¹

Las células fueron descongeladas rápidamente en baño de maría a 37 °C. Posteriormente fue realizada la neutralización de la solución de dimetilsulfóxido por medio de la transferencia del contenido del eppendorf a un tubo de ensayo con 5 ml de medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco, complementado con suero fetal bovino al 10 % y solución antibiótica-antimicótica al 1 %.¹² Posteriormente se sometió a centrifugación por un periodo de 5 minutos, observando la precipitación de los fibroblastos. El sobrenadante fue removido y el precipitado celular fue agitado en 1mL en medio fresco y transferido a un frasco de cultivo celular de 75cm² conteniendo 15mL de medio de cultivo.¹³

Las células fueron mantenidas en incubadora a 37 °C, en un ambiente húmedo conteniendo 95 % de aire y 5 % de CO₂. El monitoreo del crecimiento celular, fue realizado cada 24 horas, utilizando un microscopio de fase invertida, hasta que fue constatado el estado de subconfluencia de las células.¹⁴ Es importante destacar que para el mantenimiento de la viabilidad de las células, se realizó el cambio del medio de cultivo cada 48 horas.¹⁵

Al constatar el estado de la subconfluencia, momento en el cual se encontraba una cantidad del 70 % del recipiente ocupado por una monocapa de células, eran realizados los subcultivos. Para esto, el centro del frasco fue aspirado y la monocapa celular lavada una vez con solución tampón fosfato salino sin calcio y magnesio (PBSA) de pH 7,2 a seguir la monocapa de células adheridas al fondo el frasco fueron removidas utilizando 3 mL de solución de tripsina, 0,25 % de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) durante 1 minuto a 37 °C.¹⁶

Posteriormente la tripsina fue inactivada con 5 mL de medio de cultivo conteniendo suero fetal bovino. Las células en suspensión fueron transferidas para un tubo de ensayo y centrifugadas a 300 RPM, durante 5 minutos a temperatura ambiente.¹⁶

El precipitado de células resultante de la centrifugación fue nuevamente agitado en 1 mL de medio fresco y la suspensión de células fue colocada y mantenida en dos nuevos frascos de cultivo de 75 cm² conteniendo 15 mL de medio de cultivo.¹⁷

Los subcultivos se repitieron hasta obtener cantidades de células suficientes para el experimento. Cabe resaltar que cada subcultivo representa un cambio en el pasaje de la célula, para este estudio fueron utilizadas células del sexto pasaje.¹⁸

Se realizó conteo celular para el recipiente, donde, las células crecidas en los frascos fueron lavadas en PBSA y posteriormente embebidas en tripsina y contadas para determinar el número de células existentes.¹⁹ Esa suspensión fue centrifugada por 5 minutos y el precipitado de las células fue nuevamente agitado en 1ml de medio de cultivo. Parte de la suspensión (100 µl) fue depositada en un nuevo tubo de 15 ml conteniendo 800 µl de PBSA y 100 µl de azul de Tripán, que fue aplicado en una cámara de Neubauer y el número total de las células de los frascos fue obtenido a través del siguiente cálculo:²⁰

Nº total de células viables contadas x dilución x 10^4

Nº de cuadrados del hemocitometro utilizados en el conteo

Para obtener 1×10^4 células que fue aplicado en cada placa de Petri fue realizada una regla de tres con base en el número total de células presentes en el frasco, el volumen total a nuestra disposición y el volumen deseado.

Para la aplicación en el cultivo de células, 20 μ L de cada medicación fueron diluidas en 10ml de medio DMEM.

Fueron utilizadas 3 placas de 93 pozos, una para cada tiempo experimental, 2-48 y 72 horas. Las células fueron colocadas en placas de Petri en densidad de 200 células por pozo en 32 pozos. Las placas fueron mantenidas en incubadora a 37 °C, con atmósfera húmeda conteniendo 95 % de aire y 5 % de CO₂ durante exactamente 4 horas.

La prueba de citotoxicidad fue basada en el análisis de la actividad mitocondrial de los fibroblastos por el método de reducción de MTT.²¹ Para su realización, fueron preparados los reactivos A y B. el reactivo A era compuesto por 0,05g de MTT en 10 ml de PBSA y el reactivo B estaba constituido por 1g de SDS en 10 ml de 0,01 M de HCL.

Todos los medios fueron aspirados y enseguida aplicado 100 μ L de medio DMEM fresco. Cantidades de 10 μ L de reactivo A fueron adicionados en cada pozo conteniendo células, tomando el cuidado para protegerla de la luminosidad con hoja de papel aluminio y mantenidas a 37 °C en atmosfera húmeda conteniendo 95 % de aire y 5 % de CO₂ durante exactamente 4 horas.

Posterior a este periodo, la placa fue llevada a la cabina de flujo laminar para aplicación de 100 μ L del reactivo B. nuevamente se volvió a incubar a 37 °C por un periodo de 12 horas. En la primera y en la última columna de cada placa, en que no había células, también fueron aplicados los reactivos A y B para ayudar en la lectura del espectrofotómetro.

RESULTADOS

Los resultados están expresados en gráficos comparativos (1 y 2) de la actividad mitocondrial en los diferentes grupos experimentales. (Tabla)

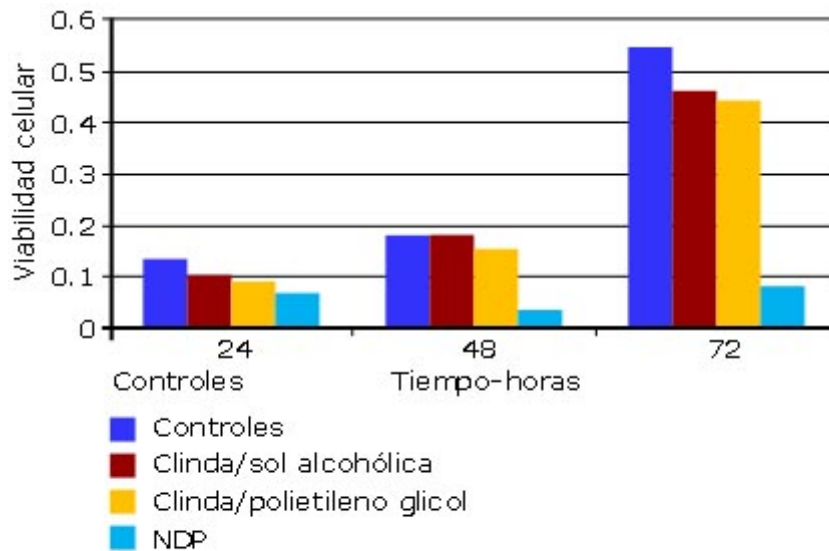


Fig. 1. Comportamiento celular de las diferentes sustancias y del control en relación al tiempo experimental.

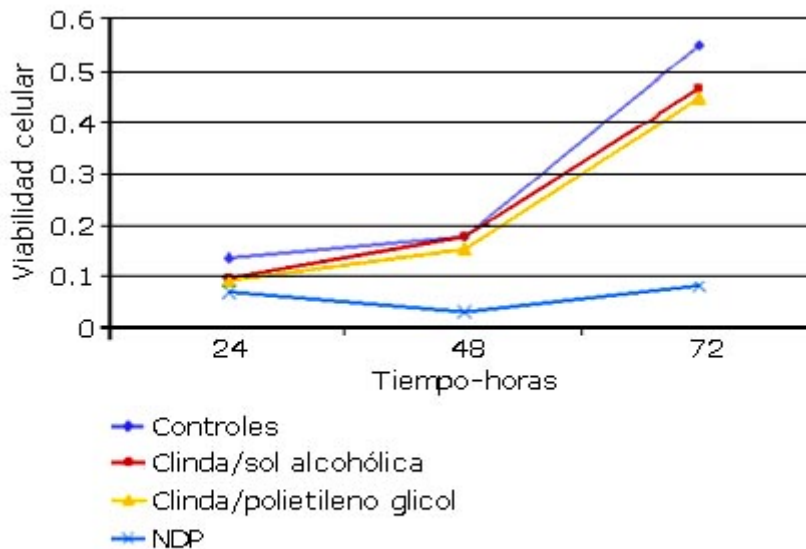


Fig. 2. Comportamiento celular de las diferentes sustancias y de control en relación al tiempo experimental.

DISCUSIÓN

El control de la inflamación se realiza para evitar una etapa inflamatoria descontrolada y excesiva, capaz de retardar o impedir la reparación de la región apical además de proporcionar un post-operatorio favorable con ausencia de la sensibilidad dolorosa.^{22, 23}

La medicación intracanal es un coadyuvante al combatir la infección que resiste los métodos de preparación químico-quirúrgico, una vez que los microorganismos

alojados en el sistema de canales radiculares, constituyen un factor que complica el desarrollo y el mantenimiento de reabsorciones óseas periapicales.²⁴

La combinación de antimicrobianos y antiinflamatorios tiene la intención de actuar sobre los microorganismos anaerobios facultativos y aerobios resistentes y controlar la inflamación existente.²⁵

De misma forma, para que sea eficiente la medicación no debe ser agresiva en los tejidos vivos periapicales. Así, el presente estudio tuvo como propuesta analizar alternativas de medicamentos como la asociación de clorhidrato de clindamicina o fosfato de dexametasona en diferentes vehículos y la combinación del mismo corticoide o paramonoclorofenol, vehiculado en polietilenglicol sobre cultivos de fibroblastos gingivales humanos.

Los resultados de las pruebas *in vitro* de citotoxicidad deben ser interpretadas con cautela cuyo objetivo principal es demostrar el grado de citotoxicidad de una sustancia y no la reacción residual provocada, siempre en relación al grupo control. Un material que presenta resultados insatisfactorios en pruebas *in vitro* de toxicidad puede o no ser descartado. Si fueron seguidos los principios para la limitación del problema, este material puede tener aplicabilidad clínica.^{26, 27}

Las células escogidas para esta investigación, fueron fibroblastos gingivales humanos de sexto paso celular; por ser microorganismos de fácil manipulación y con características metabólicas parecidas con las células presentes en los tejidos periapicales; además su división celular proporciona concentraciones elevadas de células necesarias para esta investigación.

El número de células utilizadas (10^2 células/pozo) fue establecido por la realización de la prueba piloto permaneciendo 96 horas, todos los procedimientos fueron realizados en ambiente aséptico (cabina de flujo laminar), siguiendo el protocolo elaborado por el laboratorio de investigaciones básicas de la facultad de odontología de la USP.

El colorante MTT, inicialmente soluble en agua y de coloración amarillo fluorescente, es incorporado por células viables en el interior del sitio enzimático mitocondrial y entonces metabolizados, adquiriendo la forma de cristales formando compuestos insolubles y de coloración azul oscura.²⁸ Estos cristales son entonces solubilizados por el detergente SDS, permitiendo el cálculo de la absorbancia para la lectura ELISA con longitud de onda de 560nm, sabiendo que la absorbancia de la sustancia es directamente proporcional a la concentración celular.

Cabe mencionar que los resultados presentados en este experimento *in vitro* muestra la respuesta biológica de un cultivo celular cuando está en contacto directo con la clindamicina en diferentes vehículos y de NDP, por este motivo los efectos citotóxicos observados deben ser interpretados con moderación y siempre en relación a lo ocurrido en el grupo control.

El análisis de la distribución del número de células viables fue normal, volviendo posible la comparación de las medias entre grupos por la aplicación de análisis de varianza (ANOVA) complementado por la prueba de Tukey, adoptando niveles de significancia de 1 %.

Todas las placas utilizadas representaron un tiempo experimental, por tanto, cada una contenía un grupo control.

En el tiempo experimental de 24 horas, el NDP presentó menor media de células viables, cuando se compararon con el grupo control presentando diferencias estadísticamente significante. Los grupos comprendidos por la medicación de clindamicina en diferentes vehículos, no presentaron diferencias estadísticas cuando se relacionaron con el grupo control.

A las 48 horas, hubo diferencia estadística en la interacción de todos los grupos con el grupo control.

Finalmente, en el tiempo experimental de 72 horas, la misma relación de NDP los demás grupos experimentales demostraron diferencias estadística, indicando mayor inhibición del crecimiento celular.

Estos resultados también están de acuerdo con los presentados por Wijsman y otros en el 2005²⁹ en el cual refiere que la toxicidad depende de la dosis de la clindamicina.

Dewelhenke y otros en el 2007³⁰ establecieron que la concentración que inhibe 20 % de las células se presentaron en espectro entre 20 a 40 µg/mL en 48 horas. El presente estudio contó con la muerte celular de aproximadamente 30 % en la concentración de 50µg/mL en el mismo periodo.

Molander, Reit y Dahlén en 1990 utilizaron clindamicina en concentración de 159 µg encontraron efectividad sobre microorganismos anaerobios. De acuerdo con el presente experimento, esta concentración es inviable en pruebas biológicas.⁷ Lo que está en contradicción a esa afirmación Mohammadi y Abbott en 2009 observaron que la clindamicina ofrece una ventaja antimicrobiana adicional ya que muestra reducción de los microorganismos presentes en el canal radicular.⁸

Los resultados de este experimento están de acuerdo con LeCorn y otros en el 2007⁶, que evaluaron la susceptibilidad de la clindamicina frente a *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces gerencseriae*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces viscosus*, y *Actinomyces odontolyticus*, encontrando que la concentración inhibitoria mínima para este antimicrobiano fue de 1.0 µg/mL.

En el presente estudio se pudo concluir que todas las medicaciones evaluadas presentaron citotoxicidad cuando fueron comparadas con el grupo control.

El NDP presentó los menores valores de viabilidad celular y, la medicación compuesta por clindamicina en diferentes vehículos permitió una mayor viabilidad celular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rodriguez-Nunez A, Cisneros-Cabello R, Velasco-Ortega E, Llamas-Carreras JM, Torres-Lagares D, Segura-Egea JJ. Antibiotic use by members of the Spanish Endodontic Society. J Endod. 2009;35(9):1198-1203.
2. Segura-Egea JJ, Velasco-Ortega E, Torres-Lagares D, Velasco-Ponferrada MC, Monsalve-Guil L, Llamas-Carreras JM. Pattern of antibiotic prescription in the management of endodontic infections amongst Spanish oral surgeons. Int Endod J. 2010;43(4):342-50.
3. Parmar D, Hauman CH, Leichter JW, McNaughton A, Tompkins GR. Bacterial localization and viability assessment in human ex vivo dentinal tubules by fluorescence confocal laser scanning microscopy. Int Endod J. 2011;44(7):644-51.

4. Jung DJ, Al-Ahmad A, Follo M, Spitzmuller B, Hoth-Hannig W, Hannig M, et al. Visualization of initial bacterial colonization on dentine and enamel in situ. *J Microbiol Methods*. 2010;81(2):166-74.
5. Puglisi S, Privitera S, Maiolino L, Serra A, Garotta M, Blandino G, et al. Bacteriological findings and antimicrobial resistance in odontogenic and non-odontogenic chronic maxillary sinusitis. *J Med Microbiol*. 2011;60(Pt 9):1353-9.
6. LeCorn DW, Vertucci FJ, Rojas MF, Progulske-Fox A, Belanger M. In vitro activity of amoxicillin, clindamycin, doxycycline, metronidazole, and moxifloxacin against oral *Actinomyces*. *J Endod*. 2007;33(5):557-60.
7. Molander A, Reit C, Dahlen G. Microbiological evaluation of clindamycin as a root canal dressing in teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1990;23(2):113-8.
8. Mohammadi Z, Abbott PV. On the local applications of antibiotics and antibiotic-based agents in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J*. 2009;42(7):555-67.
9. Gilad JZ, Teles R, Goodson M, White RR, Stashenko P. Development of a clindamycin-impregnated fiber as an intracanal medication in endodontic therapy. *J Endod*. 1999;25(11):722-7.
10. Lin S, Levin L, Peled M, Weiss EI, Fuss Z. Reduction of viable bacteria in dentinal tubules treated with clindamycin or tetracycline. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;96(6):751-6.
11. Bratka-Robia CB, Mitteregger G, Aichinger A, Egerbacher M, Helmreich M, Bamberg E. Primary cell culture and morphological characterization of canine dermal papilla cells and dermal fibroblasts. *Vet Dermatol*. 2002;13(1):1-6.
12. Danisovic L, Varga I, Polak S, Ulicna M, Bohmer D, Vojtassak J. Morphology of in vitro expanded human muscle-derived stem cells. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2008;152(2):235-8.
13. Leik CE, Willey A, Graham MF, Walsh SW. Isolation and culture of arterial smooth muscle cells from human placenta. *Hypertension*. 2004;43(4):837-40.
14. Fadda S, Cincotti A, Cao G. A novel population balance model to investigate the kinetics of in vitro cell proliferation: Part I. model development. *Biotechnol Bioeng*. 2012;109(3):772-81.
15. Linder B, Bostrom M, Gerdin B, Rask-Andersen H. In vitro growth of human endolymphatic sac cells: a transmission electron microscopic and immunohistochemical study in patients with vestibular schwannoma and Meniere's disease. *Otol Neurotol*. 2001;22(6):938-43.
16. Asakawa N, Shimizu T, Tsuda Y, Sekiya S, Sasagawa T, Yamato M, et al. Pre-vascularization of in vitro three-dimensional tissues created by cell sheet engineering. *Biomaterials*. 2010;31(14):3903-9.
17. Soos K, Valkusz Z, Vetro O, Juhasz A, Petri A, Molnar G, et al. Primary mono-layer cell cultures as model system for studying of environmental toxic agents: organochlorine compounds. *Cent Eur J Public Health*. 2000;8 Suppl:35-6.
18. Sardi JC, Duque C, Mariano FS, Marques MR, Hofling JF, Goncalves RB. Adhesion and invasion of *Candida albicans* from periodontal pockets of patients with chronic periodontitis and diabetes to gingival human fibroblasts. *Med Mycol*. 2012;50(1):43-9.
19. Akerud A, Dubicke A, Sennstrom M, Ekman-Ordeberg G, Malmstrom A. Differences in heparan sulfate production in cervical fibroblast cultures from women undergoing term and preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2008;87(11):1220-8.
20. Hager B, Bickenbach JR, Fleckman P. Long-term culture of murine epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 1999;112(6):971-6.

21. Malkoc S, Corekci B, Ulker HE, Yalcin M, Sengun A. Cytotoxic effects of orthodontic composites. *Angle Orthod.* 2010;80(4):571-6.
22. Ng YL, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of nonsurgical root canal treatment: part 1: periapical health. *Int Endod J.* 2011;44(7):583-609.
23. Contardo L, Meneguzzi E, Cadenaro M, Di Lenarda R. Clinical evaluation of antibiotic prophylaxis before endodontic treatment of necrotic teeth. *Minerva Stomatol.* 2005;54(3):153-60.
24. Trairatvorakul C, Detsomboonrat P. Success rates of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole, and minocycline antibiotics used in the non-instrumentation endodontic treatment of mandibular primary molars with carious pulpal involvement. *Int J Paediatr Dent.* 2012 May;22(3):217-27. doi: 10.1111/j.1365-263X.2011.01181.x.
25. Mohammadi Z. Systemic, prophylactic and local applications of antimicrobials in endodontics: an update review. *Int Dent J.* 2009;59(4):175-186.
26. Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL. Cytotoxicity of endodontic materials. *J Endod.* 1998;24(2):91-96.
27. Davis RR, Lockwood PE, Hobbs DT, Messer RL, Price RJ, Lewis JB, et al. In vitro biological effects of sodium titanate materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007;83(2):505-11.
28. Collier AC, Pritsos CA. The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. *Biochem Pharmacol.* 2003;66(2):281-7.
29. Wijsman JA, Dekaban GA, Rieder MJ. Differential toxicity of reactive metabolites of clindamycin and sulfonamides in HIV-infected cells: influence of HIV infection on clindamycin toxicity in vitro. *J Clin Pharmacol.* 2005;45(3):346-51.
30. Duewelhenke N, Krut O, Eysel P. Influence on mitochondria and cytotoxicity of different antibiotics administered in high concentrations on primary human osteoblasts and cell lines. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(1):54-63.

Recibido: 13 de abril de 2012.

Aprobado: 18 de mayo de 2012.

PhD. Dr. Ricardo Cabrales Salgado. Facultad de Odontología Universidad d Cartagena. Campus de La Salud, Barrio Zaragocilla. Cartagena de Indias. Bolívar. Colombia.
Tel: 057+5+6698172, ext 110. Fax: 057+ 5+ 6698173, ext 124.
Móvil: 057+3015598942. Correo electrónico: cabralessrj@yahoo.com