

Impacto citotóxico de la plata y flúor diamino de plata en un cultivo de seis células orales.

Cytotoxic impact of silver and silver diamine fluoride in six oral cells culture.

René García-Contreras,* Rogelio José Scougall-Vilchis,* Rosalía Contreras-Bulnes,* Hiroshi Sakagami,**
Julia Selene Baeza-Robleto,*** Rosa Isela Flores-Chávez,**** Hiroshi Nakajima**

RESUMEN

La utilización de la plata en odontología ha sido de vital importancia en el desarrollo de la ciencia de los materiales dentales debido a su potencial efecto antibacterial; sin embargo, el efecto citotóxico a nivel celular todavía no ha sido caracterizado adecuadamente. **Objetivo:** Conocer el impacto citotóxico de $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$ y AgCl en cultivo de células pulparas humanas (HPC), fibroblastos humanos de ligamento periodontal (HPLC), fibroblastos humanos gingivales (HGF) y células de carcinoma escamoso oral humano de tres diferentes pacientes (HSC-2, 3 y 4) mediante el bioensayo de colorimetría rápida de MTT. **Material y métodos:** Las células fueron cultivadas en medio DMEM a diferentes densidades; $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$ (Saforide) y AgCl fueron inoculados a diferentes concentraciones y después de 24 horas de contacto con las células, la viabilidad celular fue determinada mediante el bioensayo de colorimetría rápida MTT; el formazán fue disuelto con dimetilsulfóxido (DMSO) y el número estimado de células fue determinado con un lector de microplaca. Se determinó el porcentaje, media y desviación estándar; el análisis estadístico se llevó a cabo mediante pruebas de Kruskal-Wallis. **Resultados:** Las células más sensibles después de 24 horas de contacto con $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$ correspondieron de la siguiente manera: HSC-3>HPC>HSC-2>HSC-4>HGF>HPLF, siendo la dosis mínima para inducir toxicidad de 0.0097 mM. Por otro lado, la sensibilidad a la plata pura (AgCl) correspondió: HPC>HGF>HSC-3>HSC-2>HPLF>HSC-4, siendo la dosis media para inducir toxicidad de forma casi similar en las diferentes líneas celulares de 0.25 mM. Se observó ligero efecto de hormesis en células HGF. **Conclusiones:** Los compuestos de plata son ampliamente utilizados en odontología; sin embargo, la citotoxicidad puede ser causa de incompatibilidad biológica; el riesgo-beneficio debe ser considerado como un factor importante durante la aplicación clínica de los compuestos analizados.

Palabras clave: Flúor diamino de plata, plata pura, citotoxicidad, biocompatibilidad.

ABSTRACT

The use of silver compounds in dentistry has been important in the development of dental materials science due to their potential antibacterial effect; however, the cytotoxic effect at a cellular and molecular level has not been adequately defined. Aim: To understand the cytotoxic impact of $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$ (Saforide) and AgCl in the culture of human pulp cells (HPC), human periodontal ligament cells (HPLC), human gingival fibroblasts (HGF), and squamous carcinoma cells obtained from three different patients (HSC-2, 3, and 4), using a quick MTT colorimetric bioassay. Material and methods: The cells were cultured in DMEM medium at different densities; $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$ (Saforide) and AgCl were inoculated at different concentrations and, after being in contact with the cells for 24 hours, cell viability was determined by means of a quick MTT colorimetric bioassay; the induced formazan was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and tested in a microplate reader to estimate the number of living cells. The percentage, mean and standard deviation were calculated and statistical analysis was performed using the Kruskall-Wallis test. Results: After having been in contact with the $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$ for 24 hours, the results in terms of most sensitive cells were as follows: HSC-3>HPC>HSC-2>HSC-4>HGF>HPLF, the minimum dose needed to induce toxicity being 0.0097 mM. As regards sensitivity to pure silver (AgCl), the results were: HPC>HGF>HSC-3>HSC-2>HPLF>HSC-4, the mean dose required to induce toxicity being virtually the same in the various 0.25 mM cell lines. A slight hormesis effect was observed in the HGF. Conclusions: Silver compounds are widely used in dentistry; however, cytotoxicity may result in biocompatibility and importance should be given to the risk/benefit factor during the clinical application of the compounds analyzed.

Key words: Fluor diamine silver, pure silver, cytotoxicity, biocompatibility.

www.medigraphic.org.mx INTRODUCCIÓN

* Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados en Odontología (CIEAO). Facultad de Odontología. Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM), Toluca, México.

** Facultad de Odontología, Universidad de Meikai, Saitama, Japón.

*** Especialista en Odontopediatría. Práctica privada. Toluca, México.

**** Facultad de Odontología, UAEM. Toluca, México.

Recibido: Octubre 2012. Aceptado para publicación: Febrero 2013.

La inhabilidad de la mayoría de los tejidos para regenerarse después de un daño ha sido frustrante para la mayoría de los médicos, dentistas y pacientes. La utilización de la plata en odontología ha sido de vital importancia en el desarrollo de la ciencia de los materiales dentales

debido a su potencial efecto antibacterial;¹ la plata se ha utilizado en materiales de restauración en forma de aleación, desafortunadamente el efecto citotóxico a nivel celular todavía no ha sido caracterizado adecuadamente. La biocompatibilidad de los materiales es de suma importancia en las restauraciones; las aleaciones dentales se han utilizado a lo largo de la historia de la odontología; sin embargo, diversos estudios han mostrado que existen iones metálicos desprendidos de las aleaciones que causan daño celular estructural e inducen a inflamación local.²⁻⁵ El oro (Au), la plata (Ag) y el paladio (Pd) han causado reacciones alérgicas en la cavidad bucal.⁶ Por otro lado, se ha reportado que los iones desprendidos de aleaciones dentales basadas en níquel (Ni) interfieren con el metabolismo y la función celular de los fibroblastos gingivales humanos (HGF).^{7,8} Recientemente, en un estudio realizado por nuestro equipo de investigación, en el cual se estudió la citotoxicidad de diversos metales en cultivo de HGF, correspondió de mayor a menor toxicidad de la siguiente manera: flúor diamino de plata ($\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$)>Plata pura (AgCl)>Cobre (CuCl_2)> CuCl ,>Cobalto (CoCl_2)>níquel (NiCl_2)> Hierro (FeCl_2 , FeCl_3) y ninguno de los metales mostró efecto hormético. El contacto con $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$ y HGF durante una hora indujo a una muerte celular irreversible; no mostraron fragmentación del ADN evaluado por electroforesis, ni activación de la caspasa-3 (apoptosis), concluyendo así, una posible muerte celular por necrosis,⁹ datos similares a los reportados en el contacto de estos metales sobre células osteoblásticas de ratón (MC3T3-E1), donde la muerte celular puede ser inducida por la vía de necrosis.¹⁰ El flúor diamino de plata ($\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$) (Saforide, J. Morita Corp., Osaka, Japón) es una sustancia relativamente nueva, utilizada para detener e inhibir la caries por la combinación de flúor y plata a una concentración del 38%; sin embargo, parece ser un componente sumamente tóxico contra las células orales.¹¹ El presente trabajo tiene como objetivo conocer el impacto citotóxico de $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$ y AgCl en cultivo de células pulparas humanas (HPC), fibroblastos humanos de ligamento periodontal (HPLC), fibroblastos humanos gingivales (HGF) y células de carcinoma escamoso oral humano de tres diferentes pacientes (HSC-2, 3 y 4) mediante el bioensayo de colorimetría rápida de MTI.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo celular

Las células pulparas humanas (HPC), los fibroblastos humanos de ligamento periodontal (HPLC), los fibroblastos humanos gingivales (HGF) y las células de carcinoma esca-

moso oral humano de tres diferentes pacientes (HSC-2, 3 y 4) fueron obtenidas del stock establecido del Departamento de Ciencias Diagnósticas y Terapéuticas de la Universidad de Meikai, Escuela de Odontología, Saitama, Japón. Las células se encontraban almacenadas a -80 °C y fueron subcultivadas en medio de cultivo del águila modificado de Dulbecco (DMEM) (GIBCO BRL, Grand Island, NY, EUA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (JRH Bioscience, Lenexa, KS, EUA) inactivado por calor, 100 UI/mL de penicilina G y 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina en cajas de cultivo celular de polietileno (10 cm) (BectonDickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) dentro de la campana de flujo (CCV-811, IkemotoRika Co. Tokio, Japón). Las células fueron incubadas (10-0211, IkemotoRika Co. Tokio, Japón) a 37 °C en una atmósfera de medio húmedo con 5% de CO_2 , lavadas con solución salina buffer de fosfato (PBS) sin Ca^{2+} y Mg^{2+} (pH 7.4) y resuspendidas enzimáticamente del fondo del plato de polietileno con tripsina al 0.25%, adicionado con EDTA-2Na (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EU) en PBS (-) para cada experimento.

Estimación del número de células viables

Las células orales normales (HPLF, HGF, HPC) fueron incubadas en platos de 96 pocillos a una densidad de 1:3 de un nivel doble de población (PDL) de 8-9 divisiones celulares, mientras que las células orales cancerosas (HSC-2, 3, 4) fueron inoculadas a una densidad de 3×10^4 /mL, 2.5×10^4 /



Figura 1. Imagen representativa de la solución remineralizante e inhibidora de caries (Saforide, J. Morita Corp., Osaka, Japón).

mL y 2×10^4 /mL, respectivamente. Las células fueron incubadas durante 48 horas para permitir la completa adhesión y proliferación en los platos de cultivo celular. Los componentes de plata $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$ (flúor diamino de plata, J. Morita Corp., Osaka, Japón) (*Figura 1*) y AgCl (WakoPureChem Co., Tokio, Japón) fueron disueltos en agua bidestilada a una concentración de 0.62 mM y 1 mM, respectivamente, los cuales fueron divididos sucesivamente a una concentración media a lo largo de los platos de cultivo, utilizando la última hilera del plato como control y toda la hilera de la periferia fue llenada con 100 μl de PBS para evitar la evaporación del medio de cultivo.

Las células fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C con las diferentes concentraciones de los componentes de plata. Posteriormente, las células fueron incubadas durante 4 horas con 0.2 mg/mL del reactivo MTT ([3-(4, 5-dimetil-

tiazol-2-yl)-2, 5-difeniltetrasodio-bromuro]-Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) disuelto en medio DMEM fresco. El formazán inducido durante el tiempo de incubación fue disuelto con 0.1 mL de dimetilsulfóxido (WakoPureChem Co., Tokio, Japón) y la actividad mitocondrial fue determinada en un espectrofotómetro de microplaca (Multiskan, Biochromatic, LabSystem, Osaka, Japón) a una longitud de onda de 540 nm de absorbancia. Los experimentos se realizaron por triplicado para obtener datos reproducibles.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calculó el porcentaje de células viables, el promedio y desviación estándar (D.S.) utilizando la hoja de cálculo Excel (Microsoft Office System, Redmond, Washington, EUA). Se utilizaron pruebas no paramétricas de análisis

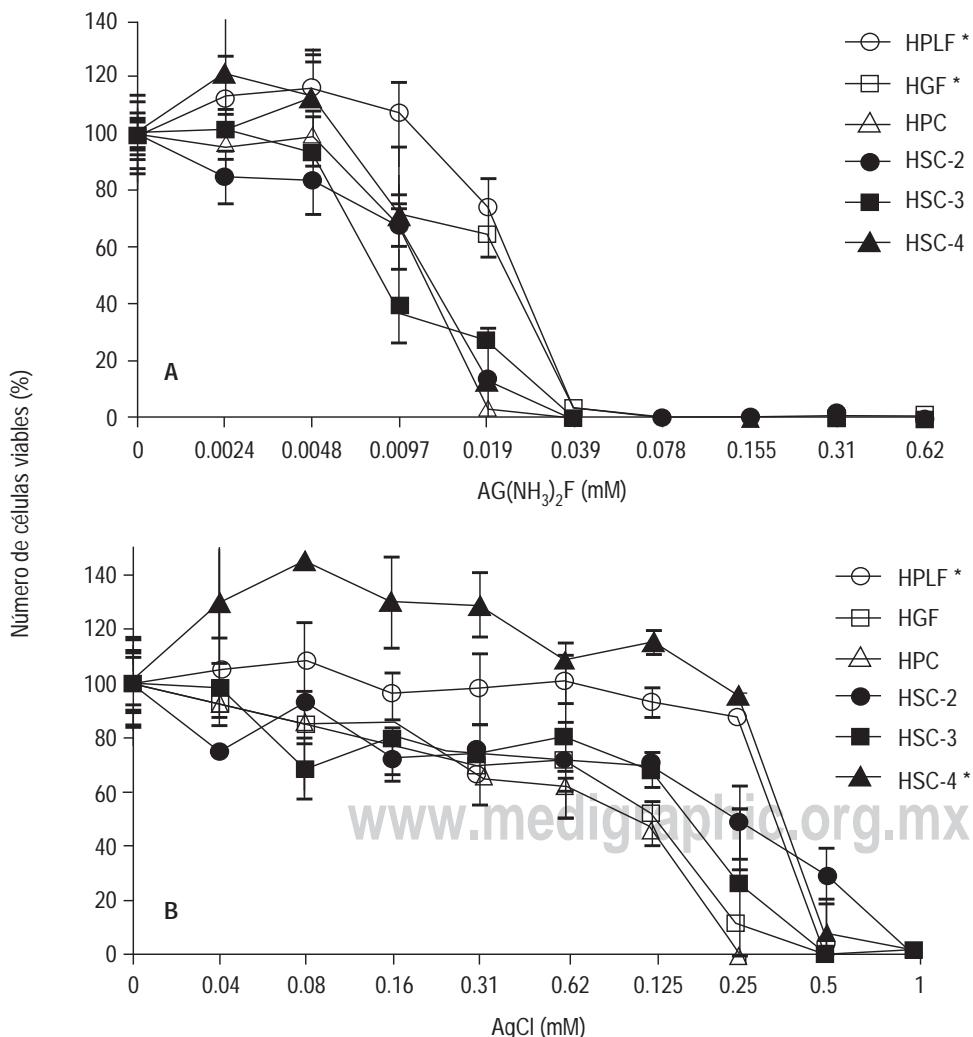


Figura 2.

Citotoxicidad en las seis líneas celulares de A) $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$ (Saforide) y B) AgCl . Datos obtenidos por triplicado para ser reproducibles de tres experimentos independientes. *Kruskal-Wallis $p < 0.05$.

de la varianza de Kruskal-Wallis con el paquete estadístico SPSS (Versión 15, Chicago, Illinois, EUA). La significancia del valor estadístico se estableció a un nivel de 0.05.

RESULTADOS

La toxicidad de $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$ y AgCl se muestra en la figura 2 A y B. Las células más sensibles después de 24 horas de contacto con $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$ (Saforide) fueron de la siguiente manera: HSC-3>HPC>HSC-2>HSC-4HGF>HPLF, siendo la dosis mínima para inducir toxicidad de 0.00097 mM. Por otro lado, la sensibilidad a la plata pura (AgCl) correspondió a HPC>HGF>HSC-3>HSC-2>HPLF>HSC-4, siendo la dosis media para inducir toxicidad de forma casi similar en las diferentes líneas celulares de 0.25 mM. Se observó ligero efecto de hormesis en células HGF orales, mientras se detectó un efecto similar con células HSC-3 y 4 en contacto con $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$ a muy bajas dosis (0.0024-0.0097 mM). En lo que respecta a AgCl , un mayor efecto de hormesis fue encontrado en células HGF y HSC-4 a mayores dosis.

DISCUSIÓN

La plata se ha utilizado desde tiempo remoto en odontología, principalmente en su forma metálica, como el nitrato de plata y sulfadiazina de plata para el tratamiento de quemaduras, heridas e infecciones bacterianas. Conocer la toxicidad de los iones metálicos y materiales utilizados en odontología es de vital importancia para conocer la biocompatibilidad con los tejidos y las células orales. El tipo de muerte celular inducido por algunos componentes adquiere un papel importante para conocer el impacto biológico de los materiales dentales en la biocompatibilidad con el ambiente bucal. Recientemente, el flúor diamino de plata se ha utilizado como solución bactericida, bacteriostática, inhibidora y remineralizante de caries.¹¹ Además, esta solución se ha utilizado para la desinfección y el lavado de conductos radiculares. El flúor reacciona con el esmalte afectado formando flúor hidroxiapatita. Mientras que el nitrato de plata actúa sobre la hidroxiapatita formando fosfato de plata que produce la coagulación de las proteínas, lo que resulta en acción bacteriostática y en disminución de su permeabilidad por la obturación de los túbulos dentinarios, lo que se refleja en la disminución de la hipersensibilidad dental.¹

Estudios coinciden que los iones plata (Ag) interactúan con los grupos sulfídricos de las proteínas y el ADN, alterando los enlaces de hidrógeno, el proceso respiratorio, anulación de ADN, síntesis de la pared y

división celular.^{12,13} A nivel macroscópico, estas interacciones producen efectivamente la muerte bacteriana.¹⁴ Diversos estudios coinciden que los iones de plata cargados positivamente son esenciales para la actividad antimicrobiana, la interacción electrostática con la carga negativa de las membranas de la bacteria ayuda a conseguir el efecto bactericida;¹⁵ la actividad antimicrobiana de la plata es de amplio espectro, frente a bacterias Gram positivas se logra mediante la creación de «fisuras» en la pared celular, mostrando un aumento significativo de la permeabilidad, lo que origina muerte bacteriana. Principalmente, la plata induce la desnaturalización y la oxidación de la pared bacteriana, las cuales conducen a la ruptura de los organelos celulares internos.^{11,16} La lisis inducida sobre las bacterias podría ser explicada por la modulación del perfil de la fosfotirosina de los péptidos bacterianos, lo que afecta la señal de transducción bacteriana e inhibe el crecimiento de los microrganismos.¹⁷ La resistencia de las bacterias es extremadamente rara frente al elemento más básico de plata;¹⁸ sin embargo, el efecto antibacteriano de la plata sobre bacterias Gram negativas no se ha estudiado ampliamente.¹⁹ Estudios han mostrado que la solución de flúor diamino de plata (Saforide) tiene propiedades antibacterianas sobre *Actinomyces* (anaerobio facultativo) aislados de conductos radiculares.¹⁹ En lo que respecta a las células normales se ha reportado que la plata produce oxígeno reactivo^{20,21} y daño mitocondrial.^{22,23} Se ha observado muerte celular por apoptosis inducida por plata en macrófagos de la línea celular RAW264.7²¹ y en fibroblastos de ratón de la línea celular NIH3T3.²²

El uso de la solución de flúor diamino de plata ($\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$) (Saforide) ha tenido un importante auge en el área de odontología pediátrica debido a sus beneficios en la detención e inhibición de caries.²⁴ El efecto de acción del $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$ corresponde a la formación de fluoruro de calcio (CaF_2) y fosfato de plata (Ag_3PO_4) en un entorno de base, la segunda reacción es la disociación subsiguiente de calcio y fluoruro.²⁵ Una de las principales desventajas del $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$ es la presencia de una zona negra sobre las cavidades tratadas.

El método de MTT es un bioensayo que se basa en la reducción metabólica del bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa que se reduce a formazán, dando un color púrpura y permitiendo determinar la actividad mitocondrial (citotoxicidad) de las células tratadas; es un bioensayo útil para determinar la citotoxicidad de fármacos y sustancias en contacto celular.²⁶

El efecto de hormesis tiene una relevante importancia para conocer qué sustancias y qué tipo de línea celular produce una proliferación a bajas dosis del compuesto y hasta dónde puede ser benéfico y tolerado; al exceder el límite de la curva de dosis-respuesta tolerable, la toxicidad es irreversible, causando una muerte celular súbita. El efecto de hormesis es vital en la biocompatibilidad y en la persistencia de compuestos en contacto con tejidos y células. El estudio mostró un ligero efecto de hormesis en HGF a bajas concentraciones en contacto con $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$ y AgCl , lo que sugiere que a bajas concentraciones puede ser benéfico para la duplicación celular; sin embargo, es necesario estudiar más a fondo el efecto aquí observado y descartar el efecto contrario que puede ser antagonista y perjudicial como se ha observado con diversos fármacos.

El presente estudio revela que el $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$ mostró ser el componente con mayor citotoxicidad en las seis líneas celulares en comparación con AgCl , estos resultados concuerdan con estudios previos realizados con células de fibroblastos humanos gingivales (HGF)^{9,23,27} y células osteoblásticas de ratón.^{10,23} La evaluación de la toxicidad y biocompatibilidad de compuestos de plata no han sido estudiados ampliamente en la literatura, los resultados aquí mostrados sugieren una elevada citotoxicidad del flúor diamino de plata sobre algunas células orales e incluso cancerosas; la aplicación de esta solución, clínicamente, debe ser manejada con especial atención sobre los tejidos orales. En un futuro, a pesar de que se utiliza actualmente en humanos, es necesario estudiar la toxicidad más a fondo con diversos experimentos de expresión de los genes celulares, tipo de muerte celular inducido por la solución y utilizar modelos animales para evaluar la biocompatibilidad. Es importante determinar el riesgo-beneficio que este sistema remineralizante de lesiones cariosas confiere, principalmente en la dentición temporal y tener precaución en su manipulación clínica por la alta citotoxicidad sobre células pulparas, células de ligamento periodontal y células gingivales aquí reportado. Basados en los resultados encontrados, se sugiere la utilización de aislamiento total del campo operatorio mediante dique de hule, para evitar el contacto con el borde gingival, mientras que su aplicación puede estar contraindicada en cavidades profundas cercanas al tejido pulpar.

CONCLUSIONES

Los compuestos de plata son ampliamente utilizados en odontología; sin embargo, la citotoxicidad puede

ser causa de incompatibilidad biológica; el riesgo-beneficio debe ser considerado como un factor importante durante la aplicación clínica de los compuestos analizados.

BIBLIOGRAFÍA

1. García-Contreras R, Argueta-Figueroa L, Mejía-Rubalcava C, Jiménez-Martínez R, Cuevas-Guajardo S, Sánchez-Reyna P et al. Perspectives for the use of silver nanoparticles in dental practice. *Int Dent J.* 2011; 61: 297-301.
2. Geis-Gerstorfer J, Sauer KH, Passler K. Ion release from Ni-Cr-Mo and Co-Cr-Mo casting alloys. *Int J Prosthodont.* 1991; 4: 152-158.
3. Wataha JC, Hanks CT, Craig RG. The release of elements of dental casting alloys into cell culture medium. *J Dent Res.* 1991; 70: 1014-1018.
4. Messer RL, Bishop S, Lucas LC. Effects of metallic ion toxicity on human gingival fibroblasts morphology. *Biomaterials.* 1999; 20: 1647-1657.
5. Wataha JC, Hanks CT, Craig RG. *In vitro* synergistic, antagonistic, and duration of exposure effects of metal cations on eukaryotic cells. *J Biomed Mater Res.* 1992; 26: 1297-1309.
6. Mehulic M, Mehulic K, Kos P, Komar D, Katunoric M. Expression of contact allergy in undergoing prosthodontic therapy patients with oral disease. *Minerva Stomatol.* 2005; 54: 303-309.
7. Bumgardner JD, Doeller J, Lucas LC. Effect of nickelbased dental casting alloys on fibroblast metabolism and ultrastructural organization. *J Biomed Mater Res.* 1995; 29: 611-617.
8. Messer RL, Lucas LC. Localization of metallic ions with gingival fibroblast subcellular fractions. *J Biomed Mater Res.* 2002; 59: 466-472.
9. García CR, Sakagami H, Nakajima H, Shimada J. Type of cell death induced by various metal cations in cultured human gingival fibroblast. *In vivo.* 2010; 24: 513-518.
10. García CR, Scougall VR, Sakagami H, Nakamura Y, Nakamura Y, Hibino Y et al. Type of cell death induced by seven metals in cultured mouse osteoblastic cells. *In vivo.* 2010; 24: 507-512.
11. Yee R, Holmgren C, Mulder J, Lama D, Walker D, Van Palestijn Helderman W. Efficacy of silver diamine fluoride for arresting caries treatment. *J Dent Res.* 2009; 88: 644-647.
12. Lansdown AB. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. *Curr Probl Dermatol.* 2006; 33: 17-34.
13. Oppermann RV, Johansen JR. Effect of fluoride and non-fluoride salts of copper, silver and tin on the acidogenicity of dental plaque *in vivo*. *Scand J Dent Res.* 1980; 88: 476-80.
14. Wu MY, Suryanarayanan K, van Ooij WJ et al. Using microbial genomics to evaluate the effectiveness of silver to prevent biofilm formation. *Water Sci Technol.* 2007; 55: 413-419.
15. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed Nanotechnol Biol Med.* 2007; 3: 95-101.
16. Lara HH, Ixtépan-Turrent L, Garza-Trevino EN et al. PVP-coated silver nanoparticles block the transmission of cell-free and cell-associated HIV-1 in human cervical culture. *J Nanobiotechnology.* 2010; 8: 15.
17. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci.* 2004; 275: 177-182.
18. Rai M, Yadav V, Glade A. silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *BiothecAdv.* 2009; 27: 76-83.

19. Mohamed HI. Current perspectives of nanoparticles in medical and dental biomaterials. *J Biomed Res.* 2012; 26: 143-151.
20. Carison C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J PhysChem B.* 2008; 112: 1360-1619.
21. Park EJ, Yi J, Kim Y, Choi K, Park K. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicol In Vitro.* 2010; 24: 872-878.
22. Hsin YH, Chem CF, Huang S, Shih TS, Lai PS, Chueh PJ. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS -andJNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol Lett.* 2008; 179: 130-139.
23. AshaRani PV, Low KahMunG, Hande MP, Valiyaveettil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in humancells. *ACS Nano.* 2009; 3: 279-290.
24. Rosenblatt A, Stamford TC, Niederman R. Silver diamine fluoride: a caries "silver-fluoride bullet". *J Dent Res.* 2009; 88: 116-125.
25. Ahn SJ, Lee SJ, Kook JK et al. Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. *Dent Mater.* 2009; 25: 206-213.
26. Bautista GC, Acosta GE, Toledo GI. Evaluación del bioensayo de MTT para determinar la proliferación *in vitro* de linfocitos de bovino, frescos y congelados. *VetMex.* 2001; 31: 101-106.
27. Yamamoto A, Honma R, Sumita M. Cytotoxicity evaluation of 43 metal salt using murine fibroblast and osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res.* 1998; 391: 331-340.

Correspondencia:

Dr. Rogelio J. Scougall-Vilchis

Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados en Odontología (CIEAO), Facultad de Odontología, Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM), Toluca, Estado de México, México.
E-mail: rogelio_scougall@hotmail.com