
EFFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN SOLUCIÓN DE HBSS SOBRE LA DIFUSIÓN TRANSDENTINARIA EN TERCEROS MOLARES EXTRAÍDOS¹

THE EFFECT OF HANK'S BALANCED SALT SOLUTION (HBSS) STORAGE TIME ON TRANSDENTINAL DIFFUSION IN EXTRACTED THIRD MOLARS¹

FRANCISCO ARAYA,² CLAUDIA SOMMARIVA,³ GUSTAVO MONCADA,⁴ ÁLVARO CARTAGENA,⁵ CLAUDIA LETELIER,⁵

OSMIR OLIVEIRA JUNIOR,⁶ JAVIER MARTÍN,⁷ EDUARDO FERNÁNDEZ⁷

RESUMEN. Introducción: la solución en la que se almacenan los discos de dentina mientras son estudiados, ha determinado ser vital para reproducir condiciones posibles de encontrar "in vivo", y finalmente resulta crítica en la evaluación de cualquier estudio relativo a la conductancia hidráulica. El objetivo de este estudio fue determinar in vitro la variación en la tasa de filtración transdentinaria en discos de dentina humana, luego de 2, 4, 6, 7, 14, 21 y 28 días almacenados en HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), formalina al 10% y suero fisiológico. **Métodos:** se utilizaron 41 terceros molares humanos sanos en inclusión. Estos dientes fueron desinfectados en Timol al 0,1% por 24 horas, para luego ser incluidos en bloques de resina epóxica. Estos fueron cortados de manera que se lograran discos de dentina de 1 mm de grosor. Posterior a esto, a los discos dentinarios se les midió su conductancia hidráulica, luego fueron separados para ser almacenados en diferentes medios. Se conformaron los siguientes grupos: 1) formalina al 10%; b) solución de Hank (HBSS) y c) suero fisiológico. Luego se midió su conductancia hidráulica luego de 1, 2, 4, 6, 7, 14, 21 y 28 días. El análisis estadístico fue por ANOVA y post hoc de Tukey (SPSS v.15). **Resultados:** los resultados obtenidos indicaron que las medias de los discos dentinarios, en todas las soluciones de almacenamiento, aumentaron su conductancia hidráulica comparando el día de corte y el día 28 de análisis. **Conclusiones:** no existieron diferencias significativas ($p > 0,005$) de conductancia hidráulica entre los diferentes días de los discos almacenados en solución de Hank.

Palabras clave: dentina, conductancia, difusión.

Araya F, Sommariva C, Moncada G, Cartagena A, Letelier C, Oliveira O Jr et al. Efecto del almacenamiento en solución de HBSS sobre la difusión transdentinaria en terceros molares extraídos. Rev Fac Odontol Univ Antioq 2013; 25(1): 158-175.

ABSTRACT. Introduction: the solution used to store dentin disks while being studied has proven to be vital in reproducing possible "in vivo" conditions, and it is ultimately critical in evaluating hydraulic conductance studies. The goal of this in vitro study was to determine transdentinal filtration rate variation in human dentin disks after 2, 4, 6, 7, 14, 21, and 28 days stored in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), 10% formalin, and saline solution. **Methods:** this study included 41 unerupted healthy human third molars. These teeth were disinfected in 0.1% thymol for 24 hours before being embedded in epoxy resin blocks and then cut to obtain 1 mm thick dentin disks. The disks' hydraulic conductance was later measured, and then they were separated and stored in different solutions. They were sorted out in three groups: a) 10% formalin, b) Hank solution (HBSS) and c) saline solution. Hydraulic conductance was measured after 1, 2, 4, 6, 7, 14, 21, and 28 days. Statistical analysis was performed by ANOVA and Tukey's post hoc (SPSS v.15). **Results:** the results suggest that the average of dentine disks' hydraulic conductance increased in all the storage solutions when comparing the analysis between day 1 and day 28. **Conclusions:** no significant differences were found ($p > 0.005$) in terms of hydraulic conductance among the various times the disks were stored in Hank's solution.

Key words: dentin, conductance, diffusion.

Araya F, Sommariva C, Moncada G, Cartagena A, Letelier C, Oliveira O Jr et al. The effect of Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) storage time on transdentinal diffusion in extracted third molars. Rev Fac Odontol Univ Antioq 2013; 25(1): 158-175.

-
- 1 Estudio adscrito a PRI-ODO 0304/2012 UCHILE. Este estudio fue parcialmente financiado por un Fondo de Colgate-Palmolive-Chile, los autores expresan no tener ningún conflicto de intereses.
 - 2 Cirujano Dentista, Universidad de Chile.
 - 3 Profesora asistente, Departamento Odontología Restauradora, Universidad de Chile.
 - 4 Profesor titular, Departamento Odontología Restauradora, Universidad de Chile.
 - 5 Instructores, Departamento Odontología Restauradora, Universidad de Chile.
 - 6 Profesor, Departamento de Odontología Restauradora, Disciplina de Dentística, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brasil.
 - 7 Profesor Asistente, Departamento Odontología Restauradora, Universidad de Chile.

-
- 1 This study makes part of PRI-ODO 0304/2012 UCHILE. It was partially financed by a Colgate-Palmolive-Chile Grant. The authors declare having no conflict of interest.
 - 2 Dental Surgeon, Universidad de Chile.
 - 3 Assistant Professor, Department of Restorative Dentistry, Universidad de Chile.
 - 4 Professor, Department of Restorative Dentistry, Universidad de Chile.
 - 5 Instructors, Department of Restorative Dentistry, Universidad de Chile.
 - 6 Professor, Department of Restorative Dentistry, Cosmetic Dentistry Studies, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brasil.
 - 7 Assistant Professor, Department of Restorative Dentistry, Universidad de Chile.

RECIBIDO: MARZO 5/2012-ACEPTADO: OCTUBRE 15/2013

SUBMITTED: MARCH 5/2012-ACCEPTED: OCTOBER 15/2013

INTRODUCCIÓN

La dentina forma la estructura central de los dientes. Su espesor está atravesado por túbulos que se extienden desde la pulpa hasta el límite amelodentinario. Estos túbulos le confieren la característica física de permeabilidad.¹

La primera descripción de permeabilidad de sustancias a través de la dentina fue dada por Fritsch, en 1914. En la década de los 40, Lefkowitz observó cómo un colorante inyectado en la pulpa de un diente, penetró en toda la dentina en un poco más de media hora. Algunos años después, Bodecker y Lefkowitz observaron cómo el colorante de un material de obturación, puesto en una cavidad profunda, fue capaz de pasar a zonas adyacentes del esmalte, dentina y pulpa. Se define conductancia hidráulica de la dentina como la habilidad del fluido de pasar a través de esta,² y el término permeabilidad dentinaria involucra el pasaje de fluidos, iones, moléculas, partículas y bacterias en y a través de la dentina, bajo diferentes condiciones.^{1,3}

Pashley y colaboradores han estudiado la relación de la permeabilidad de la dentina con su topografía, morfología y con distintas soluciones.^{1, 3-14} También se ha investigado la permeabilidad de diversos componentes de los materiales dentales, y su posible efecto citotóxico en las células pulpares.¹⁵⁻²⁰ Otra línea de investigación que nace de la permeabilidad dentinaria, es la prueba de sistemas adhesivos.¹⁵ Producto de la hidratación y naturaleza compleja de este tejido, la adhesión a la dentina y el sellado de las superficies dentinarias expuestas, continúa siendo una problemática a pesar de los avances en la odontología adhesiva. Modelos de permeabilidad han sido usados para calcular la capacidad de los sistemas adhesivos para sellar la dentina y para determinar la fuerza de adhesión a ella de distintos sistemas adhesivos, cementos y otros materiales dentales.

A pesar de ser un campo con mucha investigación a la fecha, existe muy poca información acerca de la permeabilidad de la dentina en distintos estados de maduración o de variables sistémicas que pudieran afectar la maduración o composición de ella y su permeabilidad.

INTRODUCTION

Dentin forms the central structure of teeth. It is crossed by tubules that extend from the pulp to the dentino-enamel junction. These tubules provide the structure with physical characteristics such as permeability.¹

The first description of substance permeation through dentine was made by Fritsch in 1914. In the 40s, Lefkowitz observed that a dye injected into a tooth's pulp penetrated the entire dentin in about half an hour. Some years later, Bodecker and Lefkowitz noted that a filler's dye applied on deep cavities was able to move to adjacent enamel areas as well as to dentin and pulp. Dentin's hydraulic conductance is defined as the ability of a fluid to pass through it,² and the term dentin permeability refers to the passage of fluids, ions, molecules, particles, and bacteria into and through the dentin under different conditions.^{1,3}

Pashley et al have studied the relationship between dentin permeability and its topography and morphology under different solutions.^{1, 3-14} The permeability of various dental material components has also been studied, as well as their possible cytotoxic effect on pulp cells.¹⁵⁻²⁰ Another field of research derived from dentin permeability is adhesive systems testing.¹⁵ Due to the humidity and complex nature of this tissue, adhesion to dentin and dental surface sealing remain a problem despite recent advances in adhesive dentistry. Several permeability models have been used to calculate the capacity of adhesive systems to seal dentin and to determine dentin adhesive strength of various adhesive systems, cements, and other dental materials.

Despite being a widely studied field, there is little information about dentin permeability at different maturation stages or about systemic variables that may affect maturation, composition, or permeability.

La información existente, acerca de cómo funcionan los modelos experimentales para estudiar la permeabilidad de la dentina *in vitro*, es poca.

Dentro de las distintas variables que existen en los estudios *in vitro* de permeabilidad dentinaria, la solución en la que se almacenan los discos de dentina mientras son estudiados ha determinado ser vital para reproducir condiciones posibles de encontrar *in vivo*, y que finalmente resulta crítica en la evaluación de cualquier estudio relativo a la conductancia hidráulica. Es así, ya que la solución en la que se encuentren las muestras determinará la manera en que se mantendrán las propiedades del disco, pudiendo influenciar notoriamente su grado de permeabilidad.²¹ Por este motivo,²² el presente estudio tiene la finalidad de analizar diferentes soluciones de almacenamiento, entregando como nueva alternativa la Solución de Hank (Hank'S Balanced Salt Solution, HBSS).²²

Esta solución actualmente posee uso reconocido en traumatismos dentales, dado que le otorga una mayor viabilidad a las células periodontales en casos de avulsión. Además, posee un pH, osmolaridad y componentes iónicos que la hacen un material ideal para el almacenamiento de tejidos dentales.^{21, 23-27} De esta manera, resultará necesario comprobar si esta sustancia mantiene en condiciones óptimas a los discos para medir su conductancia hidráulica, pudiendo convertirse en alternativa para futuras investigaciones. El suero ha sido constatado como un medio de almacenamiento inadecuado, debido a los grandes cambios estructurales producidos en dentina, y que se traducen en un aumento excesivo de permeabilidad.²⁸ De hecho, la dureza y el módulo de elasticidad de Young disminuyen cuando las muestras son almacenadas en suero, presumiblemente debido a la pérdida de calcio superficial que permite la exposición de colágeno dentinario, lo cual puede tener un efecto en la hidrólisis de las fibras de colágeno expuestas.

En el campo de la endodoncia, han utilizado diferentes soluciones con características fisiológicas, en especial para problemas derivados del traumatismo dentoalveolar, como lo es la avulsión dentaria. La avulsión dentaria es una de las formas de trauma dental más severas, siendo descrita como el desplazamiento completo del diente desde el alvéolo.

The existing information about how experimental models work to determine dentin permeability *in vitro* is scarce.

Among the variables included in dentin permeability *in vitro* studies, the solution in which dentin disks are stored while being studied has proven to be vital to reproduce possible *in vivo* conditions, and it is ultimately critical in evaluating hydraulic conductance studies. This happens because the solution in which samples are immersed determine the way disks' properties will be maintained, possibly influencing their permeability.²¹ The present study seeks therefore²² to analyze different storage solutions, presenting Hank's solution (Hank's Balanced Salt Solution, HBSS) as a new alternative.²²

The use of this solution in dental trauma currently enjoys good recognition since it provides greater periodontal cell viability in case of avulsion. Also, its pH, osmotic concentration, and ionic components make of it an ideal material for storing dental tissue.^{21, 23-27} It will be necessary to determine whether this substance is able to keep disks in optimal conditions to measure their hydraulic conductance, and therefore become a field for future research. Serum has proven to be an inadequate storage agent due to the large structural changes it causes in dentin, resulting in an excessive increase in permeability.²⁸ In fact, both hardness and Young's modulus of elasticity decrease when samples are stored in serum, probably due to the loss of surface calcium, leading to dentin collagen exposure, which may affect the hydrolysis of exposed collagen fibers.

In endodontics, several solutions with different physiological characteristics have been used, especially for problems related to dentoalveolar trauma, such as dental avulsion. Tooth avulsion is one of the most severe forms of dental trauma, and it has been described as

Dado lo complejo de la situación, el paquete vasculonervioso resulta altamente comprometido, hecho que genera muchas veces la pérdida de la vitalidad pulpar.²⁹ Por esta razón, los endodoncistas han buscado por años soluciones capaces de mantener al diente estable luego de una avulsión, para su posterior reimplantación.

En esta búsqueda es donde apareció la Solución de Hank o HBSS (Hank's Balanced Salt Solution). Esta solución es levemente básica, teniendo un pH entre 7,2 y 8,0. Es altamente concentrado en iones Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} , PO_4 y Cl^{+} , y tiene una composición comparable con las fases minerales dentales.²¹ Además, posee un bajo potencial químico de disolver las fases del calcio fosfato en el diente, por lo que la superficie de desmineralización es prevenida.²³ Igualmente, la osmolaridad de la solución de Hank es de aproximadamente 300 mOsm/l,^{24, 25} y dado que la osmolaridad ideal para la preservación de células se encuentra entre los 230 y los 400 mOsm/l, la transforman en una solución ideal para este tipo de tareas.^{26, 27} De hecho, son múltiples los estudios que comprueban la efectividad del HBSS como medio de conservación de células del ligamento periodontal en casos de traumatismo, entre ellos Ashkenazi, quien mostró que la solución de HBSS es el medio de almacenamiento más efectivo para la preservación de la viabilidad, motilidad y capacidad clonogénica de las células del ligamento periodontal, después de ser almacenadas por 24 horas a 22°C.³⁰

Dadas las características conservadoras de tejido que proporciona la solución de Hank, comenzó a ser estudiado en profundidad, además de aumentar su aplicación práctica. Resultó ser, por ejemplo, un excelente medio de conservación de dentina y esmalte para estudios a corto plazo de resistencia mecánica del diente.²³ Sin embargo, no es menor el hecho de precisar que la solución de Hank resulta ser más cara que otras soluciones, además de ser inestable cuando se expone a la luz por cortos períodos de tiempo,²⁴ razón por la que el estudio de sus características, beneficios y contraindicaciones está aún en progreso. El propósito del estudio es determinar *in vitro* la variación en la tasa de filtración transdentinaria (conductancia hidráulica) en discos de dentina humana, luego de 2, 4, 6, 7, 14, 21 y

complete displacement of teeth from alveoli. Given the complexity of this situation, the neurovascular system is highly affected, often resulting in loss of pulp vitality.²⁹ As a result, for years endodontists have sought methods to keep teeth stable after avulsion for subsequent replantation.

This search resulted in Hank's Solution or HBSS (Hank's Balanced Salt Solution). This solution is slightly basic, with a pH ranging between 7.2 and 8.0. It is highly concentrated in Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} , PO_4 , and Cl^{+} ions, and its composition is comparable to dental mineral phases.²¹ Also, it has a low chemical potential to dissolve calcium phosphate phases in teeth, so it prevents surface demineralization.²³ Similarly, Hank's solution's osmolarity is approximately 300 mOsm/l,^{24, 25} and since the optimum osmolarity for cell preservation ranges between 230 and 400 mOsm/l, it is an ideal solution for this type of tasks.^{26, 27} In fact, multiple studies have proven the effectiveness of HBSS as a preservative of periodontal ligament cells in case of trauma, including the study by Ashkenazi, who showed that HBSS solution is the most effective storage agent for preserving viability, motility, and the clonogenic capacity of periodontal ligament cells after being stored for 24 hours at 22°C.³⁰

Given the tissue conservation characteristics of Hank's solution, it has been thoroughly studied and its practical application is on the rise. It proved to be, for instance, an excellent suspension for dentin and enamel preservation in short-term studies on tooth mechanical resistance.²³ However, it is important to note that Hank's solution turns out to be more expensive than other solutions, besides being unstable when exposed to light for short periods of time;²⁴ this is why the study of its characteristics, benefits, and contraindications is still in progress. The purpose of this *in vitro* study is to determine transdentinal filtration variation rate (hydraulic conductance) in human dentin disks after 2, 4, 6, 7, 14, 21, and

28 días almacenados en solución de HBSS, en formalina al 10% y en suero fisiológico.

MÉTODOS

En este estudio de tipo observacional, se utilizaron 41 terceros molares humanos sanos en inclusión, extraídos de personas entre 16 y 30 años, cuyo diámetro coronal no fue mayor de 12mm, obtenidos previa firma de un consentimiento informado por parte del paciente, el cual fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Posterior a la extracción, se limpiaron manualmente con Cureta 13-14 Gracey (HuFriedy-USA), luego fueron desinfectados durante 24 horas en una solución de Timol al 0,1% (SIGMA, England), y finalmente fueron dejados en una solución de HBSS, a temperatura ambiente, y por dos semanas o menos.

Luego, los especímenes en estudio fueron incluidos en bloques de resina epóxica Bosh, de 25 mm de tamaño. Para esto, los molares fueron limpiados con agua destilada, se les aplicó ácido ortofosfórico (Coltene-Whaledent) al 37%, por 30 segundos. Fueron lavados, secados y pincelados con cianocrilato. Los dientes después fueron fijados en el interior de un molde cilíndrico de silicona envaselinada, de 25mm de diámetro, usando cera rosada en su cara oclusal para fijarlos. Finalmente, la resina epóxica fue vertida en el molde, esperando su polimerización, al menos 48 horas.

Una vez polimerizada la resina epóxica, se hicieron cortes de manera perpendicular al eje mayor del diente, a la altura de la corona, logrando de esta manera discos de 1 mm de grosor. Estos cortes se hicieron con la recortadora ISOMET BUEHLER LER LAKEBUFF IL, USA 1000, a 700 rpm, con 500 gr de presión, bajo abundante refrigeración. Obtenidos los discos, las caras oclusales y pulpares se regularizaron con papel abrasivo (N.º 600 Silicon carbide) bajo agua circulando para estandarizar los espesores y lograr un alisado superficial. Se procedió luego al grabado ácido de cada superficie para eliminar el barro dentinario, por medio de ácido ortofosfórico al 37% por 15 s en cada superficie, y luego lavado profuso con agua.

28 days stored in HBSS solution, 10% formalin, and saline solution.

METHODS

In this observational study, we used 41 unerupted healthy human third molars extracted from subjects between 16 and 30 years of age, with a coronal diameter no greater than 12 mm. These teeth were obtained once patients signed an informed consent, and the study was approved by the Ethics Committee of Universidad de Chile School of Dentistry. After extraction, teeth were manually cleaned with a Gracey 13-14 curette (HuFriedy -USA) and disinfected for 24 hours in a 0.1% thymol solution (SIGMA, England); finally, they were stored in an HBSS solution at room temperature for two weeks or less.

The samples were later embedded in Bosh epoxy resin blocks of 25 mm in size. For this purpose, the molars were cleansed with distilled water and applied 37% orthophosphoric acid (Coltene-Whaledent) for 30 seconds. They were washed, dried, and brushed with cyanoacrylate, and then inserted in a cylindrical Vaseline silicone mold of 25 mm in diameter, using pink wax on their occlusal side to fix them. Finally, the epoxy resin was poured into the mold and left to polymerize for at least 48 hours.

Once the epoxy resin polymerized, sections were made perpendicularly to the larger axis of each tooth at the level of the crown, thus achieving disks 1 mm thick. These sections were made with an ISOMET BUEHLER LER (Lakebuff IL, USA) 1000 trimmer at 700 rpm, with 500 grams of pressure and under abundant cooling. Once the disks were obtained, the occlusal and pulp sides were regularized with abrasive paper (No. 600 silicon carbide) under running water in order to standardize thickness and to achieve surface smoothing. Each surface was etched in order to remove smear layers by using 37% orthophosphoric acid for 15 s on each surface, and then the samples were generously washed with water.

La recortadora fue utilizada a 700 rpm, con 500 gr de presión en su brazo de corte y bajo abundante refrigeración de agua. El modelo experimental utilizado para medir el flujo, es una modificación al dispuesto por el equipo de Pashley.^{31, 32} El modelo experimental utilizado para medir el flujo se confeccionó con un reservorio de agua destilada, en una columna vertical de agua de 200 mm, conectada a una llave de paso. Luego, por medio de un tubo de silicona, se conectó a un tubo capilar milimetrado en posición horizontal, al cual se le incorporó una gota de aire. El capilar se conectó distalmente a una cámara en donde se fijaron los discos en estudio (discos de dentina sellados por medio de anillos de silicona) a través de un tubo de silicona (figura 1).

Modificada a la utilizada por Pashley, cuenta con una columna vertical con 200 mm de agua, conectada por medio de una goma a un capilar, que a su vez se conecta a la cámara donde está el disco dentinario.

The trimmer was set at 700 rpm, with 500 grams of pressure on its cutting arm and under abundant cool water. The experimental model we used to measure flow was a modification to Pashley's equipment^{31, 32} and it was provided with a reservoir of distilled water in a vertical water column of 200 mm, connected to a stopcock. Then a silicone tube was used to make a connection with a graduated capillary tube horizontally positioned, to which a drop of air was added. The capillary tube was distally connected to a chamber where the disks under study were placed (dentin disks sealed by silicon rings) by means of a silicone tube (figure 1).

A modification to that used by Pashley; it has a vertical column of 200 mm of water, connected with silicone to a capillary tube, which in turn is connected to the chamber where dentin disks are placed.

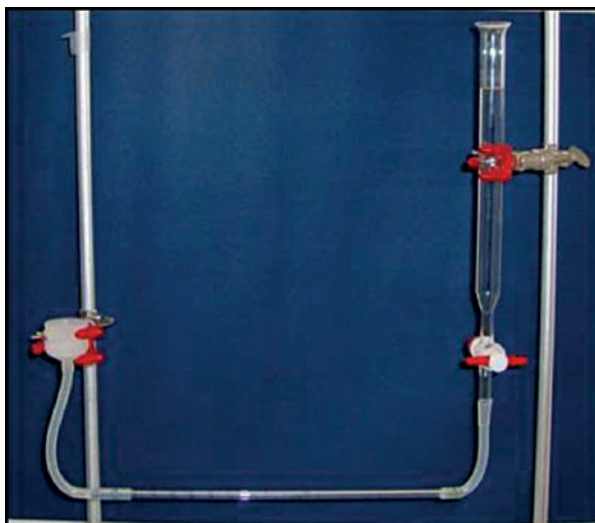


Figura 1. Cámara de difusión

Figure 1. Diffusion chamber

El tiempo durante el cual se dispuso cada disco del estudio, fue de 20 minutos, repitiéndose cada medición 3 veces al día, a fin de lograr un promedio diario. De esta manera, además, cada disco fue medido el día en que fue cortado, y a los días 2, 4, 6, 7, 14, 21 y 28 posterior al corte.

Each disk under study was observed for 20 minutes, repeating each measurement three times a day to obtain a daily average. Furthermore, each disk was measured the day it was cut, and 2, 4, 6, 7, 14, 21, and 28 days afterwards.

De esta manera, y dado los objetivos del estudio, se conformaron 5 grupos experimentales, que fueron los siguientes: Discos almacenados en Solución de Hank (SIGMA, England) (n: 15), Discos almacenados en formalina al 10% (n: 18), Discos almacenados en suero (n: 5), Medición sin disco (control negativo), Disco de Resina Epóxica (control positivo).

La tasa de flujo de permeabilidad fue medida registrando la posición inicial de la burbuja de aire dentro del capilar, para consignar su posición final después de que transcurrieran 20 minutos (figura 2).

Se mide la variación que tuvo la burbuja de aire dentro del capilar en 20 minutos, con lo que se puede saber la cantidad de agua que traspasó la dentina.

Consequently, following this study's objectives, five experimental groups were formed, as follows: disks stored in Hank's solution (SIGMA, England) (n: 15); disks stored in 10% formalin (n: 18); disks stored in serum (n: 5); measurement with no disk (negative control), epoxy resin disk (positive control).

The permeation flow rate was measured by recording the initial position of the air bubble inside the capillary in order to determine its final position after 20 minutes (figure 2).

Measurement of the variation experienced by the air bubble inside the capillary during 20 minutes, in order to know the amount of water passing through the dentin.



Figura 2. Medición de tasa de flujo de permeabilidad

Figure 2. Measurement of permeation flow rate

Las mediciones del área de dentina expuesta por disco, fueron calculadas por el *software* computacional Image J³³ (figura 3). Una vez obtenida el área y la tasa de flujo de cada disco, se procedió a calcular la conductancia hidráulica mediante la siguiente fórmula: la conductancia hidráulica corresponde a una fórmula que determina la permeabilidad, en este caso, de los discos de dentina. La variable F corresponde a la tasa de flujo de cada grupo experimental; la variable A corresponde al área de dentina expuesta al fluido; la variable P corresponde a la presión intrapulpal, cuyo valor corresponde a la altura de la columna de agua destilada (200 mm); y la variable t es el tiempo en minutos.

The measurements of each disk's exposed dentin area were calculated by the Image J computer software³³ (figure 3). After measuring each disk's area and flow rate, hydraulic conductance was calculated by the following hypothesis: hydraulic conductance corresponds to a formula that determines permeability, in this case dentin disks. Variable F corresponds to the flow rate of each experimental group; variable A is the dentine area exposed to the fluid; variable P is the intrapulpal pressure, which value corresponds to the height of the column with distilled water (200 mm), and variable t is time in minutes.

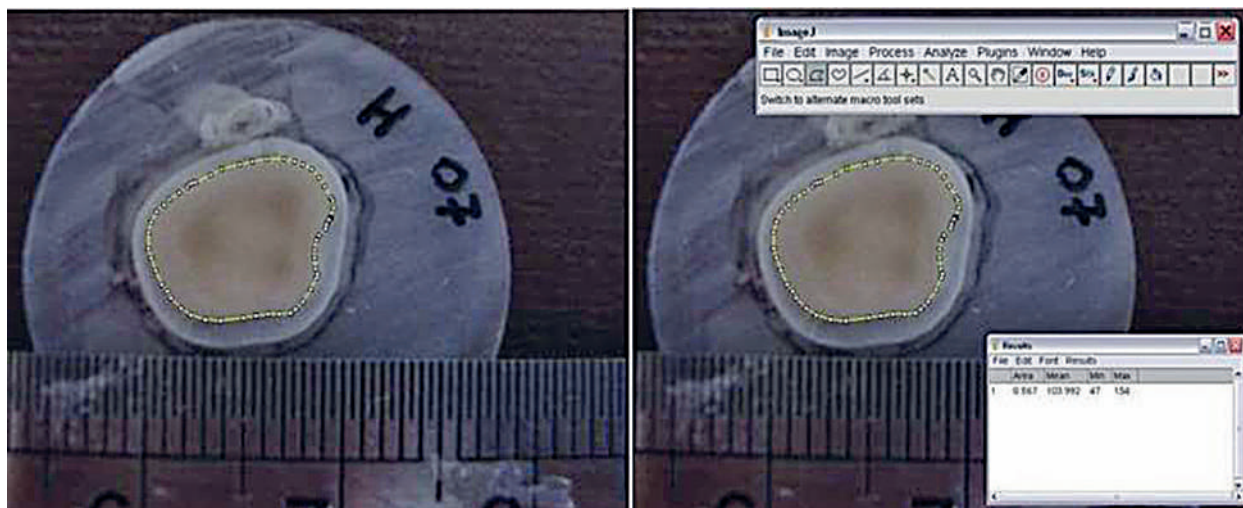


Figura 3. Medición del área de dentina expuesta

Figure 3. Measurement of the exposed dentin area

Una vez obtenida la imagen del disco de dentina, con el software Image J se selecciona el área requerida y se obtienen los valores solicitados.

Análisis estadístico: se hizo por medio de la prueba de ANOVA de dos variables y post hoc de Tuckey (SPSSv15). Todo este análisis fue hecho en el *software* G*Power 3.1, y para la muestra se determinó un valor $p = 0,05$, un poder estadístico de 0,8 y un tamaño de efecto de 0,5.

RESULTADOS

De un total de 41 terceros molares recolectados en perfectas condiciones para el estudio, se obtuvieron 41 discos de dentina de 1 mm ($\pm 0,01$ mm), divididos en 3 grupos, correspondientes a las 3 soluciones de almacenamiento analizadas en este estudio. Los grupos fueron:

- 18 discos de dentina en solución formalina al 10%.
- 15 discos de dentina en solución de Hank.
- 8 discos de dentina en solución suero fisiológico.

Once the dentin disk image is obtained with Image J, the required area is selected and the requested values obtained.

Statistical analysis was performed by two-way ANOVA test and Tuckey's post hoc (SPSS v.15). All this analysis was conducted on G* Power 3.1 software, and the sample was determined by $p = 0.05$, a statistical power of 0.8 and an effect size of 0.5.

RESULTS

From a total of 41 third molars in perfect conditions collected for this study, 41 dentin disks of 1 mm (± 0.01 mm) were obtained and divided into three groups, corresponding to the three storage solutions under study. The groups were:

- 18 dentin disks in 10% formalin solution.
- 15 dentin disks in Hank's solution.
- 8 dentin disks in saline solution.

La tabla 1 corresponde a las medias con sus respectivas desviaciones tipo, de las diferentes permeabilidades obtenidas en los diferentes medios de almacenamiento. Cabe recordar que los n de cada solución eran diferentes, ya que en la Formalina al 10% el n era de 18 muestras, en Solución de Hank el n era de 15 muestras, y en suero fisiológico el n era de 8 muestras. La figura 4, en tanto, corresponde a la comparación de las medias diarias de los 3 grupos en estudio.

Table 1 shows the means and their respective standard deviations of the different permeability rates obtained in various storage media. It should be noted that n values in each solution were different, since in 10% formalin n = 18 samples, in Hank's solution n = 15 samples, and in saline solution n = 8 samples. Figure 4 shows the comparison of daily averages of the 3 study groups.

Tabla 1. Media de permeabilidades diarias según solución de almacenamiento

	Discos en formalina		Discos en solución Hank		Discos en suero fisiológico	
	n: 18		n: 15		n: 8	
	Media	Desviación tipo	Media	Desviación tipo	Media	Desviación tipo
Día 0	0,0085914	0,00411188	0,00992	0,00768505	0,0047218	0,00084685
Día 1	0,0111774	0,00697289	0,009444	0,00623537	0,0122634	0,00795829
Día 2	0,0092548	0,00793506	0,013011	0,00786034	0,0216613	0,0159102
Día 4	0,0125119	0,00833844	0,014979	0,00962621	0,0208516	0,01338581
Día 6	0,0121645	0,00933203	0,0162909	0,00903347	0,0225419	0,01384858
Día 7	0,0125107	0,00860715	0,0198833	0,01305656	0,0261553	0,01248182
Día 14	0,0115384	0,00706308	0,0203575	0,01238945	0,0176666	0,00993662
Día 21	0,0095336	0,0044576	0,0177976	0,01402329	0,0192641	0,00867944
Día 28	0,0173291	0,01104267	0,0204728	0,01668525	0,015198	0,00786436

Valores de Conductancia Hidráulica expresados en $\mu\text{L}/\text{min}/\text{cm}^2$

Table 1. Daily permeabilities means per storage solution

	Disks in formalin		Disks in Hank's solution		Disks in saline solution	
	n: 18		n: 15		n: 8	
	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation
Day 0	0.0085914	0.00411188	0.00992	0.00768505	0.0047218	0.00084685
Day 1	0.0111774	0.00697289	0.009444	0.00623537	0.0122634	0.00795829
Day 2	0.0092548	0.00793506	0.013011	0.00786034	0.0216613	0.0159102
Day 4	0.0125119	0.00833844	0.014979	0.00962621	0.0208516	0.01338581
Day 6	0.0121645	0.00933203	0.0162909	0.00903347	0.0225419	0.01384858
Day 7	0.0125107	0.00860715	0.0198833	0.01305656	0.0261553	0.01248182
Day 14	0.0115384	0.00706308	0.0203575	0.01238945	0.0176666	0.00993662
Day 21	0.0095336	0.0044576	0.0177976	0.01402329	0.0192641	0.00867944
Day 28	0.0173291	0.01104267	0.0204728	0.01668525	0.015198	0.00786436

Hydraulic conductance values are given in $\mu\text{L}/\text{min}/\text{cm}^2$

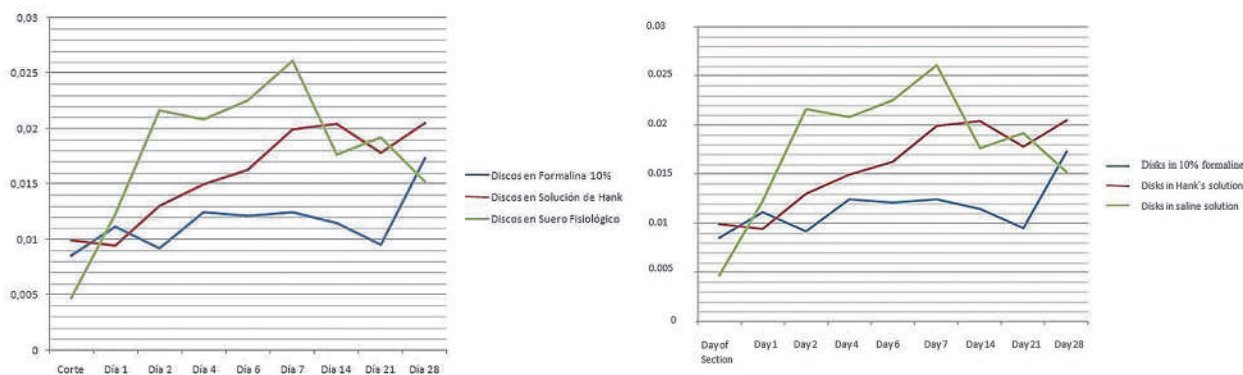


Figura 4. Comparación de medias de conductancia hidráulica entre los 3 diferentes tipos de soluciones de almacenamiento

Figure 4. Comparison of hydraulic conductance means of the 3 different types of storage solutions

No hay diferencia entre los grupos en los días 0 ($p = 0,101$), 1 ($p = 0,614$), 4 ($p = 0,155$), 6 ($p = 0,67$) ni 28 ($p = 0,621$). Sin embargo, sí existe diferencia entre los grupos los días 2 ($p = 0,020$), 7 ($p = 0,017$), 14 ($p = 0,043$) y 21 ($p = 0,024$) (tabla 2).

The groups do not show differences on days 0 ($p = 0.101$), 1 ($p = 0.614$), 4 ($p = 0.155$), 6 ($p = 0.67$) or 28 ($p = 0.621$). However, they do differ on days 2 ($p = 0.020$), 7 ($p = 0.017$), 14 ($p = 0.043$) and 21 ($p = 0.024$) (table 2).

Tabla 2. Test de Anova para determinar diferencias significativas entre los grupos de estudio

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Día 0 Intergrupos		0,000	2	0	2,433	0,101
(Día de Corte)	Intragrupos	0,001	38	0		
	Total	0,001	40			
Día 1 Intergrupos		0,000	2	0	0,494	0,614
Día 1	Intragrupos	0,002	38	0		
	Total	0,002	40			
Día 2 Intergrupos		0,001	2	0	4,369	0,02
Día 2	Intragrupos	0,004	38	0		
	Total	0,005	40			
Día 4 Intergrupos		0,000	2	0	1,961	0,155
Día 4	Intragrupos	0,004	38	0		
	Total	0,004	40			
Día 6 Intergrupos		0,001	2	0	2,897	0,067
Día 6	Intragrupos	0,004	38	0		
	Total	0,005	40			
Día 7 Intergrupos		0,001	2	0,001	4,521	0,017
Día 7	Intragrupos	0,005	38	0		
	Total	0,006	40			
Día 14 Intergrupos		0,001	2	0	3,427	0,043
Día 14	Intragrupos	0,004	38	0		
	Total	0,004	40			
Día 21 Intergrupos		0,001	2	0	4,141	0,024
Día 21	Intragrupos	0,004	38	0		
	Total	0,004	40			
Día 28 Intergrupos		0,000	2	0	0,482	0,621
Día 28	Intragrupos	0,006	38	0		
	Total	0,006 0,007	40			

* Basado en las medidas observadas.

Table 2. Anova test to determine significant differences among the study groups

		Sum of squares	df	Root mean square	F	Significance
Day 0 (Day sections were made)	Intergroups	0.000	2	0	2.433	0.101
	Intragroups	0.001	38	0		
	Total	0.001	40			
Day 1	Intergroups	0.000	2	0	0.494	0.614
	Intragroups	0.002	38	0		
	Total	0.002	40			
Day 2	Intergroups	0.001	2	0	4.369	0.02
	Intragroups	0.004	38	0		
	Total	0.005	40			
Day 4	Intergroups	0.000	2	0	1.961	0.155
	Intragroups	0.004	38	0		
	Total	0.004	40			
Day 6	Intergroups	0.001	2	0	2.897	0.067
	Intragroups	0.004	38	0		
	Total	0.005	40			
Day 7	Intergroups	0.001	2	0.001	4.521	0.017
	Intragroups	0.005	38	0		
	Total	0.006	40			
Day 14	Intergroups	0.001	2	0	3.427	0.043
	Intragroups	0.004	38	0		
	Total	0.004	40			
Day 21	Intergroups	0.001	2	0	4.141	0.024
	Intragroups	0.004	38	0		
	Total	0.004	40			
Day 28	Intergroups	0.000	2	0	0.482	0.621
	Intragroups	0.006	38	0		
	Total	0.007	40			

* Based on observed measurements.

Para determinar entre qué grupos hay diferencia significativa, se hace el test post hoc de Tukey (figuras 5, 6 y 7).

In order to determine which groups present significant difference, the post-hoc test is conducted (figures 5, 6, and 7).

	Día 0	Día 1	Día 2	Día 4	Día 6	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
Día 0		0,986	1,000	0,852	0,907	0,853	0,969	1,000	0,027
Día 1			0,998	1,000	1,000	1,000	1,000	0,999	0,314
Día 2				0,944	0,971	0,944	0,944	1,000	0,058
Día 4					1,000	1,000	1,000	0,967	0,651
Día 6						1,000	1,000	0,985	0,559
Día 7							1,000	0,967	0,650
Día 14								0,998	0,398
Día 21									0,077
Día 28									

* Basado en las medidas observadas.

	Day 0	Day 1	Day 2	Day 4	Day 6	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Day 0		0.986	1.000	0.852	0.907	0.853	0.969	1.000	0.027
Day 1			0.998	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	0.314
Day 2				0.944	0.971	0.944	0.944	1.000	0.058
Day 4					1.000	1.000	1.000	0.967	0.651
Day 6						1.000	1.000	0.985	0.559
Day 7							1.000	0.967	0.650
Day 14								0.998	0.398
Day 21									0.077
Day 28									

* Based on observed measurements.

Figura 5. Comparaciones múltiples. Test de Tukey para formalina 10

Figure 5. Multiple comparisons. Tukey's test for 10% formalin

	Día 0	Día 1	Día 2	Día 4	Día 6	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
Día 0		1,000	0,998	0,947	0,827	0,276	0,220	0,599	0,207
Día 1			0,994	0,914	0,763	0,220	0,172	0,520	0,161
Día 2				1,000	0,997	0,759	0,687	0,962	0,668
Día 4					1,000	0,956	0,926	0,999	0,917
Día 6						0,994	1,000	1,000	1,000
Día 7							1,000	0,999	1,000
Día 14								0,999	0,999
Día 21									0,999
Día 28									

* Basado en las medidas observadas.

	Day 0	Day 1	Day 2	Day 4	Day 6	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Day 0		1,000	0,998	0,947	0,827	0,276	0,220	0,599	0,207
Day 1			0,994	0,914	0,763	0,220	0,172	0,520	0,161
Day 2				1,000	0,997	0,759	0,687	0,962	0,668
Day 4					1,000	0,956	0,926	0,999	0,917
Day 6						0,994	1,000	1,000	1,000
Day 7							1,000	0,999	1,000
Day 14								0,999	0,999
Day 21									0,999
Day 28									

* Based on observed measurements.

Figura 6. Comparaciones múltiples. Test de Tukey para Solución de Hank

Figure 6. Multiple comparisons. Tukey's test for Hank's solution

	Día 0	Día 1	Día 2	Día 4	Día 6	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
Día 0		0,902	0,068	0,097	0,045	0,007	0,322	0,185	0,608
Día 1			0,735	0,818	0,632	0,235	0,986	0,934	1,000
Día 2				1,000	1,000	0,996	0,998	1,000	0,958
Día 4					1,000	0,987	1,000	1,000	0,981
Día 6						0,999	0,993	1,000	0,915
Día 7							0,827	0,939	0,549
Día 14								1,000	1,000
Día 21									0,998
Día 28									

* Basado en las medidas observadas.

	Day 0	Day 1	Day 2	Day 4	Day 6	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Day 0		0,902	0,068	0,097	0,045	0,007	0,322	0,185	0,608
Day 1			0,735	0,818	0,632	0,235	0,986	0,934	1,000
Day 2				1,000	1,000	0,996	0,998	1,000	0,958
Day 4					1,000	0,987	1,000	1,000	0,981
Day 6						0,999	0,993	1,000	0,915
Day 7							0,827	0,939	0,549
Day 14								1,000	1,000
Day 21									0,998
Day 28									

* Based on observed measurements.

Figura 7. Comparaciones múltiples. Test de Tukey para Solución salina

Figure 7. Multiple comparisons. Tukey's test for Saline solution

En los resultados, podemos apreciar que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las muestras de formalina y suero para el día 2 ($p = 0,014$), para el día 7 ($p = 0,018$) y también entre las muestras de formalina y solución de Hank para el día 14 ($p = 0,038$). Asimismo, se hizo el test post hoc de Tukey en cada solución para determinar entre qué días hubo diferencias significativas.

Dado los resultados, es posible observar diferencias significativas ($p < 0,05$) en las muestras almacenadas en formalina entre los días 0 y 28 ($p = 0,027$), y para las muestras almacenadas en suero fisiológico, entre los días 0 y 6 ($p = 0,045$) y 0 y 7 ($p = 0,007$).

DISCUSIÓN

Este estudio se origina por la necesidad de contar con materiales que permitan desarrollar estudios, tanto a corto como a largo plazo, en permeabilidad dentinaria, sin que se altere el medio por reacciones entre los tejidos dentarios, los materiales utilizados y la solución de almacenamiento. Las actuales alternativas probadas, no han demostrado tener todas estas condiciones, ya que,

The results show significant difference ($p < 0.05$) between formalin and saline solution on days 2 ($p = 0.014$) and 7 ($p = 0.018$) as well as between formalin and Hank's solution on day 14 ($p = 0.038$). The Tukey's post hoc test was conducted for each solution in order to identify the days in which significant differences occurred.

Based on the results, it is possible to observe significant differences ($p < 0.05$) in samples stored in formalin between days 0 and 28 ($p = 0.027$) and in samples stored in saline, solution between days 0 and 6 ($p = 0.045$) and 0 and 7 ($p = 0.007$).

DISCUSSION

This study arises from the need for materials to develop short- and long-term studies on dentin permeability without altering the agents by reactions among dental tissues, materials used, and storage solution. The alternatives currently tested have not proven to provide all of these conditions, since

por una parte, las soluciones salinas y otras soluciones similares no han podido demostrar su utilidad como medios de almacenamiento a mediano plazo, y otras, como la formalina, si bien han demostrado mejores resultados como soluciones almacenadoras, alteran características propias de los tejidos que finalmente terminan por afectar los resultados obtenidos.^{21, 25, 29}

El modelo utilizado para este estudio, está basado en el modelo utilizado por el grupo de investigación a cargo del grupo de Pashley³¹ y posteriormente utilizado por otros investigadores. Este modelo otorga una herramienta simple y confiable, como lo es la cámara de difusión, para medir la conductancia hidráulica de discos de dentina de manera visual, lo que nos permite tener un reflejo de la permeabilidad dentinaria. El diseño de este estudio varía básicamente en la presión hidrostática utilizada, correspondiente a 20 cm de H₂O a 20°C. Dentro de la técnica utilizada, cabe comparar con Sekimoto, el cual utilizó el mismo modelo pero con una presión de 15 psi de N₂ sobre una solución salina fosfatada al 0,2%, equivalente a 1054,8 cm de H₂O a 4°C.³⁴ En muchas investigaciones tienden a aumentar significativamente la presión, debido a lo lento que es el proceso en sí, a fin de obtener medidas mayores. En este caso, y debido a futuros usos del estudio mismo, se decidió utilizar una presión cercana a la fisiológica pulpar, presión que para muchos autores ronda entre los 12 y 18 cm H₂O.³⁵

El hecho de que el flujo dentinario tienda a ir de pulpar hacia afuera del diente, está dado por la diferencia entre la presión ambiental y la pulpar, por lo que ésta última, al ser mayor, genera un flujo expulsivo de fluidos desde la pulpa.¹² Sin embargo, el presente estudio fue hecho generando un flujo desde oclusal hacia pulpar, teniendo en cuenta los resultados de Pashley, quien señaló que el flujo tiende a disminuirse en dirección pulpar-oclusal, debido al mayor riesgo de obliteración de los túbulos por productos pulpares. Pese a esto, la variación encontrada por este autor entre ambos sentidos de flujo no fue estadísticamente significativa.³⁶

En este estudio, se utilizó ácido ortofosfórico para tratar la dentina superficial, dado que este tiende a permear las

some agents such as saline solutions and other similar solutions have failed to demonstrate their usefulness as storage agents in the mid-term and others, such as formalin, have shown better results but they alter tissue characteristics that may eventually affect the results.^{21, 25, 29}

The model used for this study is based on that used by the research group led by Pashley³¹ and other researchers afterwards. This model offers a simple, reliable tool: the diffusion chamber that allows to visually measure dentin disks' hydraulic conductance and to determine dentin permeability. Basically, the design of the present study differs in the hydrostatic pressure used, namely 20 cm of H₂O at 20° C. Based on the technique used, we may establish a comparison with Sekimoto, who used the same model but with a pressure of 15 psi of N₂ on a 0.2% phosphate saline solution, equivalent to 1054.8 cm H₂O at 4° C. ³⁴ Since the process is slow, many studies tend to significantly increase pressure in order to obtain larger values. In this case, and because of possible future uses of this study, we decided to use a pressure close to physiological pulpal pressure which according to several authors ranges between 12 and 18 cm H₂O.³⁵

The fact that dentin flow tends to move from the pulp towards the tooth's external portion is due to the difference in pressure between the environment and the pulp; since the latter is higher, it generates an expulsive flow of fluid from the pulp.¹² However, this study was performed by producing flow from oclusal to pulpal, taking into account the results by Pashley, who pointed out that flow tends to decrease in pulpal-oclusal direction, due to an increased risk of tubule obliteration by pulpal products. Nevertheless, the variation found by this author between both flow directions was not statistically significant.³⁶

In this study, orthophosphoric acid was used to treat the dentin surface because it tends to permeate

superficies obliteradas, aumentando la permeabilidad en rangos que van desde 87 a 146%.³⁷ Asimismo, se intentó hacer el tratamiento de ácido bajo condiciones y tiempos similares a las usadas en el trabajo clínico, además de desechar la idea de usar otro tipo de grabadores ácidos de poca aplicación clínica, como lo es el ácido cítrico.

Bajo el mismo parámetro, se utilizó agua destilada, en vez de suero, para medir la tasa de permeabilidad, a fin de evitar cualquier precipitación de sales que pudiesen obliterar los túbulos dentinarios.^{1, 28, 38}

El motivo de utilizar la solución de Hank en este estudio, es el de introducir en estudios de permeabilidad dentinaria una solución que ha demostrado mantener tejidos dentinarios en el tiempo, conservando gran parte de sus características mecánicas, químicas e incluso fisiológicas. Todo lo anterior es en gran parte debido a sus similitudes, tanto en pH como en osmolaridad, aparte de poseer iones similares a las de las fases minerales del diente.

Obtenidos los resultados de este estudio, es posible inferir algunos hechos. Una vez que las muestras comenzaron a ser analizadas, esto es, que fueron puestas en solución de almacenamiento y se midió su permeabilidad en el tiempo, la conductancia hidráulica de las mismas aumentó conforme al paso de los días, situación similar a lo recopilado bibliográficamente. Igualmente, y teniendo en cuenta la figura 4, el grupo que presentó un aumento comparativamente mayor al resto, en especial en los primeros días de estudio, fue el de las muestras almacenadas en suero fisiológico. La contrapartida a esta situación fueron las muestras almacenadas en formalina al 10%, las cuales, si bien tuvieron un incremento de su permeabilidad con respecto al tiempo, fueron las muestras que presentaron menor variación en comparación a su condición basal. Para Goodis y colaboradores,²⁸ esto muy probablemente se debe a la propiedad fijadora de la formalina, hecho que conservaría estructuralmente los túbulos dentinarios, determinando un cambio menor de la conductancia hidráulica.

En los resultados, podemos ver que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las muestras de formalina y suero para el día 2 ($p = 0,014$) y para el día 7

obliterated surfaces increasing permeability in values ranging from 87 to 146%.³⁷ Similarly, we attempted acid treatment under conditions and times similar to those used in clinical conditions, avoiding other type of etchers with limited clinical applications, such as citric acid.

Similarly, permeability rate was measured by means of distilled water instead of serum in order to avoid precipitation of salts, which may obliterate dentinal tubules.^{1, 28, 38}

Hank's solution was used in this study with the intention of providing dentin permeability studies with a solution that has shown to maintain dentinal tissue over time, as it retains much of its mechanical, chemical, and even physiological properties. All this is due in large part to its similarities with tooth mineral phases, both in pH and osmolarity, besides sharing similar ions with them.

The results of this study allow us to infer some facts. Once the samples began to be analyzed, that is, immersed in storage solution and measured their permeability over time, their hydraulic conductance increased as days went by—similar to what has been reported in the literature—. Similarly, and considering Figure 4, the group that showed the highest increases, particularly during the first days of study, was that of the samples stored in saline solution. Their counterpart was the samples stored in 10% formalin, which, although presented increased permeability over time, were the ones that presented the least variation when compared to baseline. For Goodis et al,²⁸ this is probably due to the fixative property of formalin, which retains the dentinal tubules structure, producing smaller hydraulic conductance changes.

These results show significant differences ($p < 0.05$) between the formalin and serum samples for days 2 ($p = .014$) and 7

($p = 0,018$), y también entre las muestras de formalina y solución de Hank para el día ($p = 0,038$). Esto se suma al análisis del test post hoc de Tukey en cada solución, donde se aprecian diferencias significativas en las muestras almacenadas en formalina entre los días 0 y 28 ($p = 0,027$), y para las muestras almacenadas en suero fisiológico entre los días 0 y 6 ($p = 0,045$) y 0 y 7 ($p = 0,007$).

Podemos concluir que los medios estudiados entre sí, poseen diferencias significativas en algunos tramos de análisis, no pudiendo hacerse homologable, al menos en lo que a conductancia hidráulica se refiere, el hecho de almacenar muestras en cualquier solución de almacenamiento. Por otra parte, las variaciones en las muestras, tanto en suero fisiológico como en formalina al 10%, mostraron algunos tramos en que presentaron diferencias significativas, hecho que concuerda con la literatura, respecto a lo difícil que resulta predecir el comportamiento de la permeabilidad dentinaria, incluso en soluciones estimadas como buenas preservantes, como la formalina. Con respecto a la Solución de Hank, no existe diferencia significativa entre los diferentes días de estudio de las muestras, comprobándose por tanto la hipótesis nula de este estudio.

Sin embargo, se sugiere hacer estudios sobre la permeabilidad dentinaria y el comportamiento de la solución de Hank, como medio de almacenamiento, en estudios aún más prolongados en el tiempo que el actual. Se recomienda también, previo a analizar cualquier material en esta solución, comprobar cualquier tipo de reacción del material con la solución de Hank.

CONCLUSIONES

- Hay diferencia estadísticamente significativa en los distintos tipos de almacenamiento de muestras dentarias, para 4 de los 9 días en que se estudió la conductancia hidráulica de las muestras (días 2, 7, 14 y 21).

($p = 0.018$), and also between formalin and Hank's solution samples for day 14 ($p = 0.038$). Also, Tukey's post hoc test in each solution shows significant differences in samples stored in formalin between days 0 and 28 ($p = 0.027$), and for samples stored in saline solution between days 0 and 6 ($p = 0.045$) and 0 and 7 ($p = 0.007$).

We may conclude that the agents under study present significant differences among themselves in some moments of the analysis but they cannot be comparable, at least in terms of hydraulic conductance, to the fact of storing samples in any storage solution. Moreover, variations in the samples, both in saline solution and in 10% formalin, showed significant differences at times, being consistent with the literature concerning the difficulty of predicting the behavior of dentin permeability, even in agents considered to be good preservative solutions such as formalin. Regarding Hank's solution, no significant difference was observed among the samples during the days of study, therefore proving the null hypothesis of this study.

However, we suggest performing further studies on dentin permeability and Hank's solution's behavior as a storage agent by means of projects that include even longer times than the ones evaluated in the present study. It is also recommended to check any reaction of the material against Hank's solution before analyzing any material in this solution.

CONCLUSIONS

- There are statistically significant differences among the various types of dental sample storage for 4 of the 9 days when the samples' hydraulic conductance was studied (days 2, 7, 14, and 21).

- Las muestras almacenadas en formalina al 10%, fueron las que mostraron mayores variaciones de su conductancia hidráulica durante el estudio.
- Las muestras almacenadas en Solución de Hank, no mostraron diferencia significativa en su conductancia hidráulica entre los días de estudio.
- La cámara de difusión utilizada en el trabajo, derivada del modelo de Pashley, es un instrumento simple y confiable para el estudio de la difusión en dentina.

CORRESPONDENCIA

Eduardo Fernández Godoy
 Universidad de Chile
 Olivos 943 Independencia
 Santiago, Chile
 Teléfono/Fax: 56-998854770
 Correo electrónico: edofdez@yahoo.com

- The samples stored in 10% formalin were the ones that showed the greatest hydraulic conductance variation.
- The samples stored in Hank's solution did not show significant differences in hydraulic conductance during the study days.
- The diffusion chamber used in this study, derived from Pashley's model, is a simple and reliable tool for the study of dentine diffusion.

CORRESPONDING AUTHOR

Eduardo Fernández Godoy
 Universidad de Chile
 Olivos 943 Independencia
 Santiago, Chile
 Telephone/Fax number: 56-998854770
 E-mail Address: edofdez@yahoo.com

REFERENCIAS / REFERENCES

1. Reeder OW Jr, Walton RE, Livingston MJ, Pashley DH. Dentin permeability: determinants of hydraulic conductance. *J Dent Res* 1978; 57(2): 187-193
2. Maita E, Simpson MD, Tao L, Pashley DH. Fluid and protein flux across the pulpodentine complex of the dog in vivo. *Arch Oral Biol* 1991; 36(2): 103-110.
3. Pashley DH, Andringa HJ, Derkson GD, Derkson ME, Kalathoor SR. Regional variability in the permeability of human dentine. *Arch Oral Biol* 1987; 32(7): 519-523.
4. Pashley DH, Nelson R, Williams EC. Dentin hydraulic conductance: changes produced by red blood cells. *J Dent Res* 1981; 60(10): 1797-1802.
5. Pashley DH, Michelich V, Kehl T. Dentin permeability: effects of smear layer removal. *J Prosthet Dent* 1981; 46(5): 531-537.
6. Pashley DH, Thompson SM, Stewart FP. Dentin permeability: effects of temperature on hydraulic conductance. *J Dent Res* 1983; 62(9): 956-959.
7. Derkson GD, Pashley DH, Derkson ME. Microleakage measurement of selected restorative materials: a new in vitro method. *J Prosthet Dent* 1986; 56(4): 435-440.
8. Pashley DH. Dentin permeability, dentin sensitivity, and treatment through tubule occlusion. *J Endod* 1986; 12(10): 465-474.
9. Pashley DH, Depew DD. Effects of the smear layer, Copalite, and oxalate on microleakage. *Oper Dent* 1986; 11(3): 95-102.
10. Pashley EL, Tao L, Derkson G, Pashley DH. Dentin permeability and bond strengths after various surface treatments. *Dent Mater* 1989; 5(6): 375-378.
11. Pashley DH. Mechanisms of dentin sensitivity. *Dent Clin North Am* 1990; 34(3): 449-473.
12. Pashley DH. Dentine permeability and its role in the pathobiology of dentine sensitivity. *Arch Oral Biol* 1994; 39 Supl: 73S-80S.

13. Gillam DG, Mordan NJ, Newman HN. The Dentin Disc surface: a plausible model for dentin physiology and dentin sensitivity evaluation. *Adv Dent Res* 1997; 11(4): 487-501.
14. Pashley DH, Livingston MJ, Reeder OW, Horner J. Effects of the degree of tubule occlusion on the permeability of human dentine in vitro. *Arch Oral Biol* 1978; 23(12): 1127-1133.
15. Lanza CR, de Souza Costa CA, Furlan M, Alécio A, Hebling J. Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. *Cell Biol Toxicol* 2009; 25(6): 533-543.
16. Lessa FC, Nogueira I, Huck C, Hebling J, Costa CA. Transdental cytotoxic effects of different concentrations of chlorhexidine gel applied on acid-conditioned dentin substrate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010; 92(1): 40-47.
17. Lessa FC, Nogueira I, Vargas Fda S, Spolidorio DM, Hebling J, Garcia-Godoy F, Costa CA. Direct and transdental antibacterial activity of chlorhexidine. *Am J Dent* 2010; 23(5): 255-259.
18. Soares DG, Ribeiro AP, Sacono NT, Coldebella CR, Hebling J, Costa CA. Transenamel and transdental cytotoxicity of carbamide peroxide bleaching gels on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Int Endod J* 2011; 44(2): 116-125.
19. Turrioni AP, de Oliveira CF, Basso FG, Moriyama LT, Kurachi C, Hebling J et al. Correlation between light transmission and permeability of human dentin. *Lasers Med Sci* 2012; 27(1): 191-196.
20. Lima AF, Lessa FC, Mancini MN, Hebling J, Costa CA, Marchi GM. Transdental protective role of sodium ascorbate against the cytopathic effects of H₂O₂ released from bleaching agents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109(4): e70-76.
21. Thomas T, Gopikrishna V, Kandaswamy D. Comparative evaluation of maintenance of cell viability of an experimental transport media "coconut water" with Hank's balanced salt solution and milk, for transportation of an avulsed tooth: An in vitro cell culture study. *J Conserv Dent* 2008; 11(1): 22-29.
22. Cummins D. Dentin hypersensitivity: from diagnosis to a breakthrough therapy for everyday sensitivity relief. *J Clin Dent* 2009; 20(1): 1-9.
23. Habelitz S, Marshall GW Jr, Balooch M, Marshall SJ. Nanoindentation and storage of teeth. *J Biomech* 2002; 35(7): 995-998.
24. Anjum A, Otsuki M, Matin K, Tagami J. Preservation in the liquid media produces alterations in enamel surface properties. *J Dent* 2009; 37(11): 884-890.
25. De Souza BD, Bortoluzzi EA, da Silveira Teixeira C, Felipe WT, Simões CM, Felipe MC. Effect of HBSS storage time on human periodontal ligament fibroblast viability. *Dent Traumatol* 2010; 26(6): 481-483.
26. Blomlöf L. Milk and saliva as possible storage media for traumatically exarticulated teeth. *Swed Dent J Suppl* 1981; 8: 1-26.
27. Lindskog S, Blomlöf L, Hammarström L. Mitoses and microorganisms in the periodontal membrane after storage in milk or saliva. *Scand J Dent Res* 1983; 91(6): 465-472.
28. Goodis HE, Marshall GW Jr, White JM. The effects of storage after extraction of the teeth on human dentine permeability in vitro. *Arch Oral Biol* 1991; 36(8): 561-566.
29. Gopikrishna V, Baweja PS, Venkateshbabu N, Thomas T, Kandaswamy D. Comparison of coconut water, propolis, HBSS, and milk on PDL cell survival. *J Endod* 2008; 34(5): 587-589.
30. Ashkenazi M, Marouni M, Sarnat H. In vitro viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in four at room temperature. *Endod Dent Traumatol* 2000; 16(2): 63-70.
31. Outhwaite WC, McKenzie DM, Pashley DH. A versatile split-chamber device for studying dentin permeability. *J Dent Res* 1974; 53(6): 1503.
32. Ozok AR, Wu MK, Wesselink PR. Comparison of the in vitro permeability of human dentine according to the dentinal region and the composition of the simulated dentinal fluid. *J Dent* 2002; 30(2-3): 107-111.
33. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012; 9(7): 671-675.
34. Sekimoto T, Derkson GD, Richardson AS. Effect of cutting instruments on permeability and morphology of the dentin surface. *Oper Dent* 1999; 24(3): 130-136.

35. Ciucchi B, Bouillaguet S, Holz J, Pashley D. Dentinal fluid dynamics in human teeth, in vivo. *J Endod* 1995; 21(4): 191-194.
36. Greenhill JD, Pashley DH. The effects of desensitizing agents on the hydraulic conductance of human dentin in vitro. *J Dent Res* 1981; 60(3): 686-698.
37. Tagami J, Tao L, Pashley DH, Hosoda H, Sano H. Effects of high-speed cutting on dentin permeability and bonding. *Dent Mater* 1991; 7(4): 234-239.
38. Camps J, Martin P, Ladeque P, Rieu R, Fusseri J. Influence of tooth cryopreservation on human dentin permeability, in vitro. *Dent Mater* 1994; 10(3): 210-214.