



UNC

Universidad
Nacional
de Córdoba



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESCUELA DE POSGRADO

**“EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE DOS CEMENTOS DE
IONÓMEROS VITREOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE
FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS: ESTUDIO
ESTRUCTURAL Y MICROANALÍTICO”**

TESISTA:

OD. CARLOS ALFREDO ROZAS

DIRECTOR:

PROF. DR. ANTONIO CAMPOS MUÑOZ

CÓRDOBA, 2010



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE DOS
CEMENTOS DE IONÓMEROS VÍTREOS EN UN
MODELO EXPERIMENTAL DE FIBROBLASTOS
GINGIVALES HUMANOS.

ESTUDIO ESTRUCTURAL Y MICROANALÍTICO

TESIS DOCTORAL

Od. CARLOS ALFREDO ROZAS

2010

**“EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE DOS
CEMENTOS DE IONÓMEROS VÍTREOS EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE FIBROBLASTOS GINGIVALES
HUMANOS.”
ESTUDIO ESTRUCTURAL Y MICROANALÍTICO**

Tesis que presenta el Odontólogo Carlos Alfredo Rozas para optar al grado de
Doctor.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios del Grupo de Ingeniería Tisular del Departamento de Histología de la Universidad de Granada y dentro del programa de doctorado “Ingeniería Tisular en Medicina y Odontología” y al amparo del Convenio de Colaboración existente entre la Universidad de Granada, España y la Universidad Nacional de Córdoba de Argentina de fecha 29 de Julio de 1999.

Córdoba, Junio de 2010

Memoria que presenta el Odontólogo
Carlos Alfredo Rozas
para aspirar al título de Doctor

Fdo: Carlos Alfredo Rozas

VºBº El Director de Tesis

VºBº El Director de Tesis

Fdo.: Prof. Dr. Antonio Campos Muñoz
Catedrático de Histología
Facultad de Medicina y Odontología
Universidad de Granada

Fdo.: Prof. Dr. Jorge Uribe Echevarría
Profesor Titular Plenario
Cátedra de Operatoria I “A”
Facultad de Odontología
Universidad Nacional de Córdoba

Asesor Científico: Prof. Dra. María Elsa Gómez de Ferraris

Universidad Nacional de Córdoba
2010

CERTIFICADOS

CONSENTIMIENTO INFORMADO

La Cirugía Oral se realiza para resolver determinados problemas de la cavidad oral, tales como: extracción de piezas dentarias o restos apicales incluidos, fenestración o tracción de dientes retenidos, plastia de frenillos labiales, extirpación de quistes maxilares y pequeños tumores de los mismos o del resto de la cavidad oral, implantes dentarios y cirugía preprotésica fundamentalmente. La intervención puede realizarse con anestesia general o local (con los riesgos inherentes a ellas), y que los fármacos utilizados pueden producir determinadas alteraciones del nivel de conciencia por lo que no podré realizar determinadas actividades inmediatamente, tales como conducir un vehículo. Todos estos procedimientos suponen un indudable beneficio, sin embargo no están exentos de complicaciones, algunas de ellas inevitables, tales como:

- Alergia al anestésico u otro medicamento utilizado, antes, durante o después de la cirugía.
- Hematoma y edema de la región.
- Hemorragia postoperatoria.
- Dehiscencia de la sutura.
- Daño de dientes adyacentes.
- Hipoestesia o anestesia del nervio dentario inferior, temporal o definitiva.
- Hipoestesia o anestesia del nervio lingual, temporal o definitiva.
- Hipoestesia o anestesia del nervio infraorbitario, temporal o definitiva.
- Infección postoperatoria.
- Osteítis.
- Sinusitis.
- Comunicación oronasal y/o orosinusal.
- Fracturas óseas.
- Rotura de instrumentos.

Recibida la anterior información, considero que he comprendido la naturaleza y propósitos del procedimiento

.....
Además, en entrevista personal con el Dr. he sido informado/a en términos asequibles, del alcance de dicho tratamiento. En la entrevista he tenido oportunidad de proponer y resolver mis posibles dudas, y de obtener cuanta información complementaria he creído necesaria. Asimismo se me ha expuesto que si durante el acto quirúrgico, el cirujano considera que existe algún material hístico sobrante, con mi consentimiento, el mismo podrá ser utilizado con fines de investigación. Por ello, me considero en condiciones de ponderar debidamente tanto sus posibles riesgos como la utilidad y beneficios que de él puedo obtener.



Universidad de Granada
Departamento de Histología

D. Antonio Campos Muñoz, Catedrático de Histología y Director del Grupo de Investigación de Ingeniería Tisular de Universidad de Granada,

CERTIFICA que D. Carlos Alfredo Rozas ha realizado una estadia en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Granada entre los días 12 de Abril y 16 de Mayo, durante la cual ha desarrollado labores de investigación correspondientes a su tesis doctoral sobre el tema *Biocompatibilidad de Cementos de Ionómeros de Vidrio sobre células fibroblásticas humanas*.

Y para que conste y surta los efectos oportunos firmo el presente certificado en Granada a 14 de mayo de 2007.

Prof. Antonio Campos
Catedrático de Histología
Director del Grupo de Investigación de Ingeniería Tisular
Universidad de Granada





Universidad de Granada
Departamento de Histología

Antonio Campos Muñoz Catedrático de Histología y Director del grupo de Investigación de Ingeniería Tisular de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Granada, España.

Certifica que Don Carlos Alfredo Rozas Ferrara ha realizado desde el 12 de Marzo hasta el 10 de Abril de 2008 una pasantía en Ingeniería Tisular en el Departamento de Histología de la Universidad de Granada .

Durante esta estadia

- 1) Ha participado en cursos y seminarios del Programa Oficial de Posgrado (Máster y Doctorado) de Ingeniería Tisular.
- 2) Ha realizado trabajos experimentales pertenecientes a su tesis Doctoral. Para la realización de dichos trabajos ha utilizado cultivos celulares y Microscopía Electrónica Analítica.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Granada, a 10 de abril de 2008.

CIQUIBIC



CONICET
U N C



F C Q

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN QUÍMICA BIOLÓGICA DE CÓRDOBA - CIQUIBIC
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA, FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, 21 de mayo de 2010

A quien corresponda:

S-----/-----D

De mi mayor consideración:

Certifico que las imágenes de microscopía de la Tesis Doctoral del Odontólogo Carlos Alfredo Rozas DNI: 20501353N "Evaluación de la Citotoxicidad de dos cementos de ionómeros vítreos en un modelo experimental de fibroblastos gingivales humanos. Estudio Estructural y Microanalítico", realizado bajo la dirección de los Profesores; Prof. Dr. Jorge Uribe Echevarría, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba; Prof. Dr. Antonio Campos Muñoz, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, España, fueron obtenidas empleando el microscopio confocal invertido LSM5 Pascal (Zeiss), y el microscopio invertido (Zeiss 135M) en el Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Para este último se empleó cámara digital color Axiocam HRC (Zeiss).

Para ser presentado ante quien corresponda.

Dr. Carlos R. Mas

Prof. Principal del CONICET

Personal a cargo del Lab. de Microscopía Óptica del CIQUIBIC

Dpto. de Química Biológica

Facultad de Ciencias Químicas

Univ. Nac. De Córdoba

Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC- CONICET),
Departamento de Química Biológica,
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba,
Haya de la Torre y Medina Allende, Ciudad Universitaria, X5000HUA - Córdoba - República Argentina
TEL: ++54-351-4334168/4171, FAX: ++54-351-4334074
Web: www.ciquibic.gov.ar

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis Doctoral representa el logro de una meta, en pos de la cual comencé en el momento que decidí estudiar Odontología y trabajar en la docencia en la facultad de Odontología. Me resulta muy difícil en unas líneas poder expresar mi agradecimiento a los que de una u otra manera han contribuido tanto profesional como personalmente, durante estos años, a la culminación de este trabajo de Tesis.

En todo este tiempo, recibí la ayuda y el apoyo de muchas personas a las que quisiera dirigir estas líneas de agradecimiento, confiando en no olvidar a nadie y pidiendo disculpas, si así fuera el caso.

A la comisión de Doctorado, por todo su apoyo, por la orientación, consejos y estímulo para el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral.

Quisiera agradecer al profesorado del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada por su excelente labor docente, tanto teórica como práctica, y en especial al Dr. Vicente Crespo, por su apoyo durante los cursos de doctorado, por guiarme en todo el ámbito de la Universidad de Granada, asistirme y solucionar trámites ante el Rectorado.

A mis directores de Tesis: al Prof. Dr. Jorge Uribe Echevarría por sus consejos, su ayuda y por las horas compartidas en pos de lograr la consecución de este trabajo. Por el permanente apoyo y la confianza que depositó en mi al darme la posibilidad de realizar mis investigaciones y conectarme con la Facultad de Medicina de Granada.

Al Dr. Antonio Campos Muñoz, una de las personas que más ha influido en mi vida en estos últimos tres años, y me ha brindado la posibilidad de iniciarme en el campo de la investigación, facilitando todos los recursos necesarios para el desarrollo de este trabajo. Me ha enseñado la importancia de la investigación en cultivos de células, así como transmitirme sin egoísmos sus enormes conocimientos en el ámbito de la medicina, la docencia y la investigación.

A la Prof. Dra. Maria Elsa Gómez de Ferraris por su apoyo, su confianza en haberme metido en el mundo de la célula, haberme guiado en mis primeros días de Granada, estimulándome a conseguir los objetivos planteados, y a no bajar los brazos cuando las cosas no salían.

Al Dr. Ismael Rodriguez, por todo el tiempo y dedicación puesto al desarrollo de este trabajo, por las horas compartidas en el laboratorio de Granada, en su consultorio en Rio Cuarto, las tardes de los sábados escribiendo y analizando los resultados obtenidos. Las reuniones científicas en la Facultad de Odontología, Rosario o San Luis. Y por sobre todo el haber compartido todo como un hermano, muchas gracias.

A la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. A la Prof. Dra. María del Carmen Visvisian, Decana de la Facultad de Odontología de Córdoba sin cuyo apoyo no hubiese sido posible la realización del doctorado. Por su compromiso y el constante estímulo a seguir creciendo.

Al Dr. Carlos Mas de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, por su gran ayuda en el estudio con confocal láser scanning microscope.

Al Dr. Miguel Alaminos, por su ayuda inconmensurable, por ser mi guía dentro del laboratorio, por las horas destinadas a que pudiese poner a punto las pruebas e interpretar lo que estaba viendo y volcarlo a mis planillas. Por todo el trabajo estadístico de esta tesis. Siempre a mi lado ayudándome y animándome, por sus consejos en momentos críticos y su permanente apoyo, además trasmitirme sus conocimientos sin egoísmo, aportando ideas esenciales. También el disfrutar las horas de trabajo dentro del laboratorio.

A la Dra. M^a Carmen Sánchez Sánchez-Quevedo, por transmitirme sus conocimientos y el gran aporte científico para la realización de este trabajo de investigación, así como contribuir en espacios de alegría en los momentos más difíciles que duró el doctorado.

A Ingrid Johanna Garzón, por su ayuda , por estar siempre al pendiente de los cultivos celulares y de todo lo referente al trabajo en el laboratorio, por brindarme todo su conocimiento sin egoísmos, y por enseñarme a transitar por todo el ámbito del laboratorio, enseñarme a preparar los cultivos celulares, los medios de cultivos, ver el estado de las células. Y por su infinita paciencia.

Al Dr. Manuel Toledano, por sus conocimientos impartidos durante los cursos de Doctorado. Por permitirme acceder y utilizar todo lo necesario en el Laboratorio de Materiales Dentales de la Facultad de Odontología de Granada. A Judit, por asesorarme en el uso del instrumental del Laboratorio, por las charlas y las horas compartidas

Al Dr José Manuel García por su asesoramiento en el uso de los programas de computación, y el uso de las fórmulas de Excel, planillas y todo lo concerniente al uso de internet en el ámbito de la Universidad de Granada.

A la Universidad de Granada por permitirme ser parte de su Historia, por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad de estudiar en tan prestigiosa institución, y sobre todo a España ese hermoso país donde nació mi abuelo y un día partió hacia Argentina para no volver nunca más como cantidad de inmigrantes. Por poder conocer la tierra de donde vienen mis raíces.

A todos mis amigos y compañeros de trabajo, (Eduardo, Rubén, Pablo, Andrea, Marcela, Irene, Germán, Celeste, Natalia, Marisa, Paola, Elin) y como no, a Eduardo Pedro Vega, con quien tantas cosas he compartido. Al Dr. Mario Sezín por su extraordinario aporte y aliento para terminar mi trabajo. A mi hermano Jorge por su ayuda en mis presentaciones. Por la amistad de todos ellos que me brindaron su incondicional apoyo y siempre creyeron en mi y estuvieron impulsándome en cada momento. Forman parte de mi vida; a todos ustedes muchas gracias.

A vos Ana, por haberme aguantado y ayudado tanto durante todos estos años, por tu ayuda con mi inglés.

Al Dr. José Luis Zuriarrain y familia, a María Jesús, Martín Oyarbide y familia por hacerme conocer y disfrutar fuera de mi país, por sus muestras de cariño haciéndome sentir uno más de su familia.

Y por último, a las dos personas a las que les debo todo. A mi Madre, María, del que no transcurre un día sin recordarte. Después de todo lo que pasamos juntos, de todo lo que me enseñaste y todo lo que me cuidaste, de las risas, el cariño, quiero pensar que te sentirás más que contenta con el logro que supone este trabajo de Tesis. Te extraño mucho. A vos Alfredo, mi Padre, quien más me ha ayudado en este proyecto, que me lo ha dado todo siempre y sin nada a cambio, que sin duda eres mi mejor amigo y compañero.

ÍNDICE

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	14
1.1. Cementos de Ionómero de Vidrio	16
1.2. Complejo Dentinopulpar	17
1.2.1. Dentina	18
1.2.1.1. Capa Estirada, Deformada o Smear Layer	19
1.2.1.2. Permeabilidad	20
1.2.1.3. Acción del acondicionamiento ácido sobre dentina	21
1.2.2 Pulpa Dentaria	22
1.2.3. Zonas topográficas de la pulpa dental	22
1.3. Citotoxicidad de los biomateriales	24
1.3.1. Métodos de evaluación de citotoxicidad de los biomateriales.	25
OBJETIVOS	29
Objetivo General.	29
Objetivos Específicos.	29
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
2.1. Material y Reactivos	31
2.1.1. Material	31
2.1.2. Reactivos	31
2.2. Cementos de Ionómeros Vítreos	31
2.3. Cultivo Celular. Obtención de la muestra	32
2.4. Obtención de Cultivos Primarios de Fibroblastos de Mucosa Oral	32
2.5. Subcultivo de Fibroblastos Procedentes de Cultivos Primarios de Mucosa Oral	33
2.6. Tratamiento de las Muestras.	33
2.7. Estudio de la citotoxicidad mediante la Cuantificación de LDH libre	34
2.8. Estudio de la citotoxicidad mediante la cuantificación de ADN libre	35
2.9. Estudio Morfológico	35
2.9.1. Microscopía Óptica	36
2.9.2. Fotovideomicroscopía	26
2.9.3. Confocal Laser Scanning Microscopy	27
2.10. Estudio de la Citotoxicidad mediante Microanálisis por Energía Dispersiva de Rayos X	26
2.10.1. Adhesión de las Células al Soporte	26
2.10.2. Eliminación del Medio Extracelular	37
2.10.3. Criofijación y Criodesecación de las Muestras	37
2.10.4. Montaje y recubrimiento de las muestras	39
2.10.5. Instrumentación 2.10.5.1. Parámetros analíticos y condiciones de observación	39
2.10.5.2. Observación de las muestras	39
2.11. Estudio Estadístico	43

3. RESULTADOS	45
3.1. Resultados del estudio de la citotoxicidad mediante la liberación de ldh	46
3.2. Resultados del estudio de la citotoxicidad de los cementos de ionómero de vidrio mediante la liberación de ADN	51
3.3 Resultados del estudio de la citotoxicidad de los ionómeros de vidrio mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X	56
3.3.1 Análisis Cualitativo	56
3.3.2 Análisis Cuantitativo	56
3.4. Resultados del estudio de la citotoxicidad mediante el análisis morfológico utilizando la microscopía invertida y confocal laser scanning microscope.	82
3.4.1. Microscopía Invertida.	82
3.4.2. Confocal Laser Scanning Microscope	83
4. DISCUSIÓN	92
5. CONCLUSIONES	104
6. RESUMEN	101
7. SUMMARY	104
8. BIBLIOGRAFÍA	114

1. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La protección del complejo dentino pulpar ha sido y es una preocupación para la Odontología Restauradora ya que al superar la unión amelodentinaria durante el tallado de una preparación cavitaria, inevitablemente se cortan cantidades infinitesimales de túbulos dentinarios, conteniendo o no prolongaciones odontoblásticas, nervios y generando como consecuencia la salida de fluido dentinario. Se produce así un desequilibrio en la interrelación entre los diversos componentes del tejido dentinario, imponiendo la necesidad de sellar y proteger el isosistema dentino-pulpar (Uribe Echevarría et al. 2003).

El advenimiento de los cementos de ionómero de vidrio y sus propiedades adhesivas a los sustratos dentarios y específicamente a la dentina, ha transformado a este biomaterial en un material de elección para la protección del complejo dentino-pulpar. Sin embargo algunos autores señalan que determinados cementos de ionómeros vítreos serían citotóxicos. (Oliva et al. 1996, Costa CA et al. 2003)

Durante mucho tiempo, se dio mayor énfasis a las propiedades físicas y químicas de los materiales para obturación y la investigación dental se concentró en el logro de su mejoramiento. Sin embargo, actualmente las consideraciones biológicas han alcanzado tanta importancia como las propiedades físicas y químicas. “La compatibilidad biológica de los materiales restauradores con los tejidos dentarios, debe prevalecer sobre cualquier otra característica” (Mondelli et al., 1979).

Hoy se sabe que los materiales no son sustancias inertes y al ser aplicados sobre los tejidos, pueden no sólo originar daño tisular o celular, sino ocasionar una respuesta específica local y/o sistémica (Wataha y Hanks, 1998).

En las últimas décadas, se han desarrollado numerosas investigaciones permitiendo dilucidar mecanismos de desarrollo, reparación, origen y formación de diferentes tejidos y órganos. No obstante a pesar de los adelantos tecnológicos y los datos científicos relacionados con la Biología Celular y Molecular pocos trabajos se han dedicado a estudiar la biología del complejo o isosistema dentino pulpar y las posibles agresiones que pueden suceder antes, durante y después de los

tratamientos operatorios, especialmente en casos clínicos vinculados a la integración de la Odontología Restauradora y los Biomateriales (Costa y Hebling 2003).

Situaciones clínicas como caries, traumatismos, abfracciones, erosiones, y tallados cavitarios, exponen, al superar la conexión amelodentinaria, miles de prolongaciones odontoblásticas, produciendo la trasudación de fluido dentinario hacia el exterior y exponiendo el medio interno (Uribe Echevarría, 1997, 1999, 2003). La aplicación de estímulos como el frío, calor, estímulos osmóticos como la presión táctil, etc., sobre la dentina no sellada crea flujos de líquido (corriente hidrostática), que desplazan los cuerpos odontoblásticos dentro de la dentina, los despolariza y aspira, generando dolor o hipersensibilidad. Además, como no hay ningún material de obturación que por sí selle totalmente la brecha creada, se puede producir el pasaje de iones, bacterias o sus toxinas hacia el interior pulpar, generando microfiltraciones de colorantes o pigmentos o percolación de microorganismos y la reinstalación de caries o caries secundarias o hiperemias, pulpitis, necrosis o gangrenas pulpares, que destruirían el isosistema dentino pulpar. De allí la necesidad de sellar y/o proteger.

Cuando el profesional odontólogo selecciona un tratamiento restaurador los procedimientos y técnicas a aplicar deben orientarse a generar un beneficio y evitar iatrogenias. Para ello es necesario que conozca el sustrato sobre el que va a actuar como así también la composición y la reacción o comportamiento que van a tener los materiales adhesivos cuando se utilizan en un procedimiento restaurador.

En la presente introducción se expondrán las características generales de los cementos de ionómeros de vidrio, del complejo dentino pulpar que es el sustrato biológico a proteger con estos materiales adhesivos y se expondrán también las bases que sustentan el modelo de evaluación citotóxica de los materiales dentales a desarrollar en la presente tesis doctoral. En el último apartado se establecerán los objetivos fundamentales a alcanzar en este estudio.

1.1. Cementos de Ionómero de Vidrio

Los cementos de ionómero de vidrio son materiales de uso odontológico que se presentan comercialmente como polvo y líquido. El líquido está compuesto por ácidos polialquenoico, maleico, tartárico, itacónico, con sus sales y el polvo es un

vidrio amorfo de sílice y alúmina modificado con fluoruros y óxidos metálicos. Este vidrio es capaz de reaccionar con soluciones ácidas en virtud de la facilidad con la que el aluminio es desplazado y liberado de la estructura vítrea. Los ionómeros de vidrio tienen la propiedad de adherirse a las estructuras dentarias a través de una unión química entre los grupos carboxílicos y el calcio de la hidroxiapatita del esmalte y la dentina (Edelberg, 2003). Al ser moléculas polares, tienen la capacidad de intercambiar iones con la estructura dentaria, y así el esmalte toma fluoruros del material, remineralizando su estructura ayudando a prevenir la aparición de caries además de favorecer la remineralización de caries incipientes del esmalte dental. Por tanto este material con características adhesivas resulta ser muy útil para el profesional que debe resolver distintas situaciones clínicas.

Los ionómeros de vidrio se clasifican en dos grandes grupos:

- Ionómeros Vítreos Convencionales, (IVC) cuyo fenómeno de endurecimiento es químico por reacción ácido-base.
- Ionómeros Vítreos modificados con Resina, o Ionómeros Vítreos Híbridos, (IVH) endurecen por reacción ácido-base y por fotopolimerización de sus monómeros resinosos. Tienen como monómero resinoso principal al HEMA.

Ambos se preparan sobre un block de papel satinado con espátula de plástico y por lo general se mezcla una gota de líquido con una cucharada de polvo. Estos materiales pueden tener diferentes aplicaciones clínicas como:

- Sellado de fosas y fisuras oclusales.
- Cementado de prótesis fijas y bandas de ortodoncia.
- Liners o forros cavitarios.
- Bases protectoras dentino-pulpaes.
- Odontopediatría (obturaciones en dientes temporarios)
- Técnica de restauración atraumática.

1.2. Complejo Dentinopulpar

La dentina y la pulpa dental son considerados un complejo ya que ambos conforman en primer lugar, una unidad estructural, dado que las prolongaciones de

los odontoblastos transitan dentro de los túbulos de la dentina; en segundo lugar, una unidad funcional, ya que la pulpa mantiene la vitalidad de la dentina; y en tercer lugar ambos comparten un mismo origen embriológico, derivan del ectomesénquima que forma la papila del germen dentario (Ferraris y Campos 2009).

1.2.1. Dentina

La dentina por tener en su interior las prolongaciones citoplasmáticas de los odontoblastos y por la presencia de linfa o licor dentinario que la nutre, es considerada un tejido vivo (Ferraris y Campos Muñoz, 2009). Está compuesta por túbulos en medio de una matriz dentinaria parcialmente mineralizada. Alrededor de los túbulos hay una capa de dentina hipermineralizada denominada dentina peritubular. El número de túbulos varía según la profundidad oscilando entre 15.000 a 20.000 por mm² en la dentina superficial para llegar de 45.000 a 65.000 por mm² en la dentina profunda (Carda y Peydró, 2006). La luz de los túbulos es variable según la profundidad y alcanza su mayor valor en las proximidades de la pulpa, siendo tres veces mayor que en la dentina superficial, lo que aumenta la permeabilidad del tejido para disminuir considerablemente a medida que se acerca a la unión amelodentinaria. La continua formación de dentina durante toda la vida determina un aumento del grosor de la dentina peritubular, que en un diente joven es de 400nm en las proximidades de la pulpa y de 750nm cerca del esmalte, ocasionando la reducción del diámetro interno de estos túbulos, que es mayor en las proximidades de la pulpa (Costa CA, 1997). Esta dentina se caracteriza por su carencia en fibras colágenas. La aposición de dentina es un mecanismo protector natural para proteger la pulpa de las lesiones y es la respuesta normal a estímulos crónicos, como caries de avance lento, irritación leve por materiales dentales, atrición lenta y microfiltraciones. En cambio, las lesiones traumáticas, las preparaciones cavitarias que inducen cambios térmicos, las deshidrataciones o vibraciones y el uso imprudente de los materiales de restauración irritan en forma aguda a la pulpa, por lo tanto, la respuesta defensiva es distinta (Studervant et al., 1996).

La dirección de los túbulos también varía según la zona que se analice. La clásica dirección de S itálica desde las proximidades de la pulpa hacia la conexión

amelodentinaria descrita por todos los autores cuando se observan cortes longitudinales o transversales, determina que se los sorprenda en diferentes orientaciones según la dirección de la pared cavitaria, pudiendo observarlos seccionados transversal, longitudinalmente o en forma lanceolada. (Priotto et al., 1995). Entre los túbulos existe una matriz dentinaria compuesta por fibras colágenas, hidroxilapatita, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, proteínas osteogénicas, factores de crecimiento o TGF, heparina, condroitín sulfato etc. Esta zona juega un papel importante en los mecanismos de adhesión y varía según la profundidad del tejido que se analice. En las inmediaciones de la conexión amelodentinaria su valor es de aproximadamente el 96% para decrecer a un 12% en las proximidades de la pulpa. (Costa 1997, 2003).

La heterogeneidad estructural de este tejido y la presencia de fluido dentinario proveniente del interior de los túbulos determina un sustrato que ofrece particularidades especiales para los distintos mecanismos de adhesión. (Uribe Echevarría et al., 2003).

1.2.1.1. Capa Estirada, Deformada o Smear Layer

Es una capa de 1 a 5 micrometros de espesor, constituida por cristales submicroscópicos de hidroxilapatita, envueltos en restos orgánicos alterados, producidos durante el corte o desgaste de los tejidos dentarios que se deposita sobre las paredes de la preparación cavitaria a las que se adhiere mecánica y químicamente (Uribe Echevarría et al., 2003).

En un trabajo de microanálisis por energía dispersiva de Rayos X (EDAX) del balance fósforo-calcio de la dentina con smear layer, realizado por Uribe Echevarría et al. (1995) determinaron que el contenido de calcio de esa capa fue similar al de la dentina normal y que el contenido de fósforo de la dentina con smear layer fue ligeramente menor que la dentina normal. Estos resultados permitirían considerar a la capa profunda del smear layer como una zona de dentina normal estirada por la acción de los instrumentos rotatorios y cuyas características y espesor dependen de la profundidad de la dentina y del tipo de instrumental utilizado para el tallado cavitario.

Esta capa funciona como un tapón biológico ya que oblitera los túbulos disminuyendo la permeabilidad dentinaria, la humedad superficial y cumple con una función muy importante en la unión entre los adhesivos dentinarios y la dentina (Uribe Echevarría 1990,1996, 1997, 2003).

El smear layer y el smear plugs pueden reducir la permeabilidad dentinaria hasta en un 86% (Eick et al., 1993). La presencia o no de esta capa juega un papel importante en el grado de permeabilidad del sustrato dentinario y en los mecanismos de adhesión. Su eliminación con sustancias ácidas durante la aplicación de protocolos adhesivos no es aceptado totalmente. Se produce la ampliación de la luz de los túbulos por descalcificación, presencia de fibras de colágeno parcialmente desnaturalizadas, una intensa salida de fluido dentinario del interior del tejido pulpar y se favorece la difusión de los monómeros hidrófilos hacia el interior de los túbulos.

Al respecto Costa y Hebling (2003) expresan “cuando se trata de relacionar la adecuada propiedad física de los sistemas adhesivos con su biocompatibilidad, parece ser que cuando más pueda conservarse las características naturales del tejido dentario estos biomateriales podrían ser menos agresivos al complejo dentino-pulpar”.

1.2.1.2. Permeabilidad

Se denomina permeabilidad dentinaria al movimiento del fluido dentinario a través de los túbulos desde la pulpa dentaria hacia la unión amelodentinaria y viceversa (Uribe Echevarría et al., 2003) Este movimiento constante hace que el complejo dentino pulpar se comporte como una bomba aspirante- impelente y sea el responsable del estímulo hidrodinámico. (Pashley 1992, 1996; Uribe Echevarría 1997, 2003). Esta teoría hidrodinámica de Bränström es en la actualidad, la más aceptada para explicar el mecanismo de la sensibilidad dentinaria (Ferraris y Campos Muñoz 2002). La difusión intratubular e intertubular es el flujo de sustancias exógenas hacia el interior de la dentina (Pashley 1984, 1992).

El grado de permeabilidad y difusión dentinaria varía según la profundidad de las lesiones y/o preparaciones cavitarias, la dirección de las paredes y la edad del paciente. Es significativamente mayor en dentina profunda por el mayor número y diámetro de los túbulos por área y en las paredes pulpares, donde los túbulos están

seccionados transversalmente, mientras que en las paredes laterales donde los túbulos son sorprendidos longitudinalmente no influyen en el grado de permeabilidad. De ello resulta que este sustrato dentinario ofrece características muy diferentes para los mecanismos de adhesión, siendo la pared pulpar la que presenta mayores dificultades para lograr adhesión, además del riesgo que significa la posibilidad de difusión de sustancias, iones, bacterias, toxinas o sustancias citotóxicas, al estar en estrecha relación con el tejido pulpar.

La edad es también un factor importante por la influencia que la esclerosis fisiológica ejerce en el diámetro de los túbulos, siendo la dentina de pacientes jóvenes significativamente más permeable que la de pacientes de segunda y tercera edad.

Un párrafo aparte merece el análisis del efecto que sobre la permeabilidad produce la aplicación de los ácidos sobre la dentina, cuando se llevan a cabo algunos protocolos adhesivos.

1.2.1.3. Acción del acondicionamiento ácido sobre dentina

Cuando la dentina es acondicionada con ácido fosfórico, se produce la descalcificación de la dentina intertubular y peritubular, causando el aumento del diámetro interno de los túbulos dentinarios. El acondicionamiento de la dentina profunda determina una mayor permeabilidad, la que es exacerbada por la característica hipertónica del ácido. La salida del fluido dentinario del interior de la pulpa en dirección al piso cavitario puede causar desorganización de las capas superficiales de la pulpa hasta aspiración de odontoblastos hacia el interior de los túbulos dentinarios. Además, esto crea un ambiente en la región que puede interferir la polimerización del adhesivo, manteniendo monómeros libres en la zona. Éstos pueden difundir hacia el tejido pulpar, cuando el espesor del piso cavitario dentinario es inferior a 0,5 mm. La situación se agrava cuando existe una mayor permeabilidad natural de dentina en pacientes jóvenes. (Uribe Echevarría et al., 1997, 2003; Pashley 1992, 1997).

El acondicionamiento ácido no debe ser utilizado indiscriminadamente sin observar algunos principios básicos como concentración del ácido, tipo de ácido y su

capacidad de disociación iónica, que sería un factor de irritación pulpar en cavidades profundas o con pulpa expuesta .

Existen trabajos que demuestran que esta acción de los monómeros hidrófilos residuales ocasionan desorganización de las capas superficiales de la pulpa, reacción inflamatoria pulpar localizada, degeneración celular e hialinización de la matriz extracelular de la pulpa en la zona más próxima al piso cavitario. (Costa 1997, 2003).

1.2.2. Pulpa Dentaria

La pulpa dentaria forma parte del complejo dentino pulpar y tiene su origen embriológico en el ectomesénquima conocido como papila dental (Ferraris y Campos Muñoz 2009). Es un tejido altamente diferenciado y con definida capacidad de reparación.

La capa exterior de la pulpa que constituye la capa interior de la dentina, está formada por los cuerpos celulares de los odontoblastos, (células diferenciadas y terminales que no tiene mitosis). Inmediatamente por debajo de esta capa se encuentra una zona acelular, rica en terminaciones nerviosas sensitivas y capilares sanguíneos. La mayor parte del tejido pulpar está formado por células mesenquimatosas, células defensivas y fibroblastos, colágeno, sustancia fundamental, arteriolas, capilares y vénulas, linfáticos, troncos nerviosos sensitivos y terminaciones sensitivas libres. Este tejido brinda a los odontoblastos el aporte metabólico durante la formación inicial dentinaria como durante el desarrollo de la dentina de reacción. Si por alguna razón los odontoblastos mueren pero sobreviven los restantes tejidos de la pulpa, se pueden diferenciar nuevos odontoblastos a partir del ectomesénquima pulpar y depositar dentina reparadora irregular. (Avery 1994; Mount y Bryant 1999).

1.2.3. Zonas topográficas de la pulpa dental.

Zona Odontoblástica: Está conformada por células específicas llamadas odontoblastos que se disponen adyacente a la predentina, formando una sola capa en la periferia de la pulpa. Pertenecen tanto a la pulpa como a la dentina, porque si bien su cuerpo se localiza en la periferia pulpar, sus prolongaciones se alojan en los túbulos de la dentina. Ferraris y Campos Muñoz (2002).

Los odontoblastos aparecen dispuestos como en empalizada con características morfológicas variadas, columnares en la zona coronaria y cuboides en la raíz. Estas células se asocian unas a otras por los sistemas de unión lo que le permite entre sus variadas funciones, cambios metabólicos. Costa y Hebling (2003) En la parte coronaria el número de estas células y por lo tanto de túbulos es aproximadamente de 45.000 por mm² en la dentina coronaria. Su forma puede variar de acuerdo a la actividad funcional. Cuando se encuentra en estado de reposo se presenta achatada con escaso citoplasma, mientras que el odontoblasto activo se presenta como una célula grande con citoplasma basófilo. Ten Cate (1986). La prolongación odontoblástica comienza en el mismo cuello de la célula y se extiende dentro del túbulo dentinario emitiendo prolongaciones laterales que los conectan entre si. La longitud de su extensión es discutida, aunque existen trabajos con microscopía electrónica de barrido y de transmisión, que demuestran que pueden llegar hasta la conexión amelodentinaria.

Los odontoblastos se consideran células terminales ya que parecería que una vez diferenciadas no tienen capacidad mitótica.

Zona acelular: Esta zona esta ocupada parcialmente por el plexo de Rashkow, caracterizada por la presencia de numerosos filetes nerviosos que ingresan a la pulpa por el forámen apical, pudiendo algunos de ellos pasar a través de los odontoblastos y terminar en la predentina o dentina (Pashley 1996; Carda y Peydró 2006).

Zona rica en células: Junto a la zona acelular existe una capa rica en células denominadas mesenquimales indiferenciadas. Estas células embrionarias están relacionadas con el mantenimiento de la capa odontoblástica y la respuesta reparativa del tejido pulpar, de allí su nombre de células odontoblastoides (Fitzgerald 1979; Avery 1994).

Células ectomesenquimáticas: También llamadas indiferenciadas, constituyen la población de reserva por su capacidad de diferenciarse en nuevos odontoblastos productores de dentina o en fibroblastos productores de matriz pulpar, según el estímulo que actúe sobre ellos (Avery, 1994; Ferraris y Campos Muñoz, 2002).

Zona de la pulpa propiamente dicha **Fibroblastos:** Son las células más abundantes del tejido conectivo pulpar y forman una capa denominada zona rica en

células. Su función es la de formar y mantener la matriz de la pulpa. Secretan los precursores de las fibras colágenas, reticulares y elásticas y la sustancia fundamental de la pulpa. Son células multifuncionales pues tienen también la capacidad de degradar el colágeno, como respuesta ante distintos estímulos fisiológicos del medio interno. Se piensa también que estas células pueden tener la capacidad de originar nuevos odontoblastos en la periferia de la pulpa (Ten Cate 1986; Ferraris y Campos Muñoz, 2002; Avery, 1994).

1.3. Citotoxicidad de los biomateriales

Diversos autores a través de estudios “in vivo” e “in vitro”, han demostrado que en general los componentes que forman los adhesivos dentales son de naturaleza citotóxica. Así, componentes como el HEMA (hidroxietilmetacrilato), el BISGMA (bis-fenol A glicidil-metacrilato), el TEGDMA (trietilenglicoldimetacrilato), el UDMA (uretan-dimetacrilato), han sido analizados, en su actividad citotóxica, por separado o bien en forma combinada, en dosis y tiempos diferentes, sobre distintas líneas celulares (Costa et al., 1997; Hebling et al., 1999; Soheili et al., 2003; Rodríguez 2005). Ahora, si bien es conocido el efecto citotóxico de estos materiales cuando se ponen en contacto directo con la pulpa dental, estudios recientes afirman que los mecanismos específicos de muerte celular no son del todo claros. El efecto citotóxico de los adhesivos dentales constituye por ello, una limitación todavía no resuelta en este tipo de terapia odontológica (Bouilaguet et al., 1996; Kehe et al., 2001).

La mayoría de los adhesivos resinosos tienen como componente monomérico principal al HEMA, el cual posee un bajo peso molecular, que le permite una mayor capacidad de difusión por los túbulos dentinarios. Es por ello que “ningún prospecto comercial de los agentes adhesivos dentinarios, recomienda la utilización de los ácidos acondicionadores en alta concentración o de los agentes adhesivos sobre dentina profunda o sobre la pulpa misma, sino que se exalta el valor de la protección pulpar con los cementos de hidróxido de calcio o de ionómeros vítreos” (Uribe Echevarría, Priotto, Spadiliero 2003).

Los ionómeros vítreos modificados con resina, también tienen como monómero principal al HEMA y utilizados en dentina profunda, estos monómeros

parcialmente polimerizados, permanecen libres en el fluido dentinario pudiendo llegar a través de los túbulos dentinarios a la pulpa; comportándose como tóxico y agresivo para ésta. De esta forma, un material que es biocompatible cuando se aplica en dentina superficial y media perdería esa propiedad al usarlo en dentina profunda con elevada permeabilidad. Sin embargo los estudios de biocompatibilidad de los cementos de ionómeros vítreos presentes en la literatura son controversiales.

1.3.1. Métodos de evaluación de citotoxicidad de los biomateriales.

La capacidad de los diferentes tóxicos para ocasionar el daño celular, es decir, la citotoxicidad, va a depender de las propiedades físicas y químicas de éstos, si bien su accionar va a consistir en incidir sobre un sistema enzimático, dando lugar a una inhibición que será reversible o irreversible. Por otro lado, tal acción estará localizada de forma selectiva sobre sitios específicos de la célula. Tal es el caso de las lesiones sobre la membrana, en las que generalmente se ve alterada la estructura lipoproteica y con ello la permeabilidad de ésta, lo que conlleva a la salida de nutrientes o de iones. También puede actuar a nivel endocelular, donde a su vez los bloqueos pueden ocasionarse por diversos mecanismos (ciclo de Krebs, síntesis de ácidos grasos, etc.). Por último, la lesión ocasionada por estas sustancias puede tener también como objetivo a veces las organelas celulares, tales como las mitocondrias (responsables de los mecanismos de oxidación), el sistema microsómico, con los ribosomas (síntesis de proteínas) y el sistema retículo – endoplásmico (inducción enzimática y biodegradación) y las lesiones del núcleo (replicación del ADN y síntesis de proteínas nucleares) (Gisbert, 1998).

La forma de valorar la citotoxicidad puede llevarse a cabo en diferentes fases. Por una parte encontramos las pruebas iniciales, que más abajo desarrollaremos. Incluyen éstas modelos para la citotoxicidad in vitro, en la que los materiales han de ponerse en contacto directo con células cultivadas en laboratorio. A través de esta metodología se evalúa la morfología celular, las alteraciones en la síntesis de proteínas, la respiración mitocondrial, así como distintas actividades metabólicas y enzimáticas, por lo que son pruebas que se pueden estandarizar fácilmente. Además, en este tipo de investigaciones se evalúa la sensibilidad celular frente a los diferentes biomateriales y reduciendo por tanto la probabilidad de posteriores

fracasos de biocompatibilidad en pruebas in vivo, las cuales resultan ser más caras y demandan un tiempo más prolongado.

Por otro lado encontramos las llamadas pruebas secundarias. Éstas consisten en evaluar las reacciones inflamatorias y/o inmunes provocadas por biomateriales, usando para ello animales de experimentación. Dentro de éstas se destacan las de implantación, consistentes en poner el material en contacto con un tejido semejante al que va a aplicarse en la terapéutica clínica.

Por último, encontramos las pruebas de aplicación clínica, que tratan de evaluar los efectos de los biomateriales sobre el tejido específico objeto de la aplicación terapéutica. Para ello se utilizan preferentemente primates y seres humanos. Los resultados de las pruebas realizadas sobre animales no son directamente extrapolables a humanos. En definitiva, todo el desarrollo de estas pruebas de biocompatibilidad permiten evaluar con la máxima efectividad las propiedades de los materiales dentales con la única finalidad de evitar riesgos para la salud del paciente.

Como se indicó anteriormente, los métodos para evaluar la citotoxicidad o lesión celular inducida en modelos experimentales in vitro son múltiples y variados, y están basados esencialmente en criterios morfológicos, bioquímicos y metabólicos.

Los métodos basados en la perturbación de la permeabilidad de la membrana son los más numerosos y utilizados, pudiendo distinguir dentro de éstos fundamentalmente dos variantes:

- Métodos basados en el empleo de colorantes.
- Métodos basados en la determinación de la liberación de moléculas, fundamentalmente enzimas, en el medio extracelular.

El principio básico de los primeros consiste en la utilización de un colorante, que en función de sus características, penetra y colorea las células vivas o muertas. La proporción relativa de las células coloreadas o no, refleja el número exacto de las células vivas o muertas, y en consecuencia, la viabilidad del conjunto de la población celular. El conteo de las diferentes poblaciones celulares puede ser efectuado por métodos microscópicos, citometría de flujo, espectrofotometría y por espectrofluometría automatizada (Slater, 2001).

Por otra parte, el segundo tipo de métodos, basados en la medición de la liberación de moléculas intracelulares, están fundamentados en las alteraciones de la permeabilidad de la membrana celular bajo la acción de los tóxicos. Dichos métodos comprenden dos ensayos, uno enzimático y otro radiactivo. En este estudio se ha utilizado el método enzimático, el cual está basado en la medición de la enzima citosólico lactato deshidrogenasa (LDH), enzima que es liberada en el medio extracelular tras graves alteraciones de la membrana plasmática. Por otra parte, el método radioactivo se basa en la medida de la liberación del Cr51, isótopo radiactivo que se une de manera no covalente a los aminoácidos básicos de las proteínas intracelulares. Las células muertas liberan el Cr51, en el medio extracelular, el cual puede ser cuantificado por un contador gamma.

Un método que se está utilizando en la actualidad para evaluar la citotoxicidad de biomateriales es el microanálisis por energía dispersiva de rayos X (EPXMA). Ésta es una técnica que utilizando un haz de electrones permite estudiar la composición química de la muestra de forma simultánea a su observación microscópica (Carini et al., 1995; 1997; 2000).

La determinación analítica en EPXMA se lleva a cabo cuando un haz de electrones acelerados incide sobre la superficie de una muestra y se produce, entre otros fenómenos, la ionización de los átomos de la misma, esto es, la pérdida de los electrones de los orbitales internos. Cuando un átomo se encuentra en un estado ionizado, otro electrón de una capa más externa salta inmediatamente a la capa deficitaria, rellenando el hueco producido. Este salto implica una liberación de energía que se manifiesta en forma de radiación electromagnética (rayos X), que es dependiente del número atómico del elemento. Los rayos X generados se pueden clasificar en dos categorías: característicos y continuos. Los rayos X característicos son generados como resultado de la colisión entre los electrones del haz primario con los electrones de los orbitales que se encuentran alrededor del núcleo. Por el contrario, los rayos X continuos o radiación continua son producidos como consecuencia de la desaceleración que sufren los electrones del haz primario al interactuar con el núcleo atómico. La energía de los rayos X característicos depende del número atómico del elemento y puede ser utilizada para identificar un elemento químico presente en la muestra.

El análisis de los rayos X emitidos por la muestra va a permitir conocer la composición de la misma. Dicho análisis consiste en medir la energía de los fotones producidos, previa transformación de su energía electromagnética en señal eléctrica utilizando un espectrómetro de dispersión de energía. Posteriormente, los impulsos eléctricos son clasificados utilizando un analizador multicanal acoplado a dicho sistema, originando un espectro a partir del cual es posible derivar la composición química del espécimen visualizado en el microscopio electrónico. El espectro es un histograma de frecuencia que muestra el número de rayos X detectados para cada rango de energía y está constituido por una serie de picos, designados indistintamente como líneas, de intensidad variable – rayos X característicos –, los cuales están superpuestos a un fondo continuo de menor intensidad (rayos X continuos, radiación de fondo o radiación blanca) (Goldstein et al., 1992) (Roomans y Von Euler, 1996). El estudio de muestras biológicas con Microscopía Electrónica Analítica permite, asimismo, la cuantificación de los elementos objeto de estudio, lo cual exige el desarrollo de protocolos específicos (Campos et al., 1992) (Campos et al., 1994) (Crespo et al., 1993) (López – Escámez et al., 1992) (López – Escámez et al., 1993) (López – Escámez y Campos, 1994) (Warley et al., 1994a) (Warley, 1997).

La evaluación de citotoxicidad de los cementos de ionómeros vitreos ha sido estudiada por diferentes autores, con resultados diversos. Sin embargo, la implementación de EXPMA como recurso técnico para comprender mejor los cambios iónicos que se suceden en las células expuestas a estos productos y que puede permitir la comprensión en profundidad de su comportamiento a nivel celular, no ha sido aún utilizado. Es por ello que surge la necesidad de continuar con las investigaciones que ayuden a dilucidar el comportamiento in vitro de los cementos de ionómeros de vidrio convencionales y modificados con resina. Por todo lo expuesto, los objetivos de ésta tesis doctoral han sido los siguientes:

OBJETIVOS

Objetivo General:

Analizar citotoxicidad de dos tipos de cementos de ionómero vítreo–convencional y modificado con resina, utilizando para evaluar la viabilidad celular criterios morfológicos, bioquímicos y microanalíticos en un modelo experimental in vitro de fibroblastos gingivales humanos.

Objetivos Específicos:

- 1) Establecer el patrón morfológico de citotoxicidad de los dos tipos de ionómeros vítreos mediante la utilización de la microscopía invertida, fotovideomicroscopía y confocal laser scanning microscopy.
- 2) Establecer el patrón de citotoxicidad de los dos tipos de ionómeros vítreos mediante la cuantificación enzimática de LDH libre.
- 3) Establecer el patrón de citotoxicidad de los dos tipos de ionómeros vítreos mediante la cuantificación de ADN libre.
- 4) Establecer el patrón iónico intracelular de citotoxicidad de los dos tipos de ionómeros vítreos mediante microscopía electrónica analítica cuantitativa por energía dispersiva de rayos X.
- 5) Evaluar comparativamente ambos tipos de ionómeros en relación con los patrones de citotoxicidad establecidos para cada uno de ellos en el modelo experimental desarrollado en la presente tesis doctoral.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material y Reactivos

2.1.1. Material

Los tubos de centrífuga de policarbonato de 5, 15 y 25ml, micropipetas tipo Eppendorf de 1000 μ l (puntas azules) y 100 μ l (puntas amarillas) y microtubos tipo Eppendorf de polipropileno de 1,5ml de volumen fueron suministrados por Daslab (Labor Tecnic, Granada, España). Los frascos de cultivo de 25 y 75cm² de superficie de cultivo con filtro de ventilación fueron suministrados por Sarstedt (Labor Tecnic, Granada, España). Las unidades para cultivo en placa de 24 pocillos, de 6,5mm de diámetro, y con filtro de policarbonato con poros de 0,4 μ m fueron suministradas por Corning Incorporated (Corning, NY 14831. Made in USA. 3413). Cubetas especiales para espectrofotometría (Bio-Rad, ref. 170-2510, Hércules, California, EEUU)

puntas para

2.1.2. Reactivos

Los siguientes reactivos fueron suministrados por Sigma-Química:

- Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (D5796, Saint-Quentin).
- Antibióticos 500 U/ml de penicilina G y 500 α g/ μ l de estreptomicina (Ref. A5955).
- Antimicóticos (1.25 μ g/ml de anfotericina B) (Ref. A5955).
- Suero bovino fetal (FBS).
- Test de citotoxicidad LDH (Lactato Dehidrogenasa, de la casa Roche). (Citotoxicity Detection Kit)
- Test para cuantificar la liberación de ADN, Tritón X-100 al 2%.

2.2. Cementos de Ionómeros Vítreos

Para la realización de esta tesis se emplearon los siguientes biomateriales:

Ionómero de vidrio convencional, Ketac –Molar Easymix, (3M- ESPE, St Paul, MN, USA).

Ionómero vítreo modificado con resina, Vitrebond (3M- ESPE, St Paul, MN, USA).

2.3. Cultivo Celular. Obtención de la muestra

Se utilizaron como modelo experimental células fibroblásticas de tejido gingival humano. Las mismas fueron obtenidas de pacientes clínicamente sanos tratados en el Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, los cuales fueron intervenidos de terceros molares retenidos, de la zona retromolar. Previamente leído y aceptado el consentimiento informado, se obtuvo la muestra de tejido gingival humano que fue introducido inmediatamente en medio de transporte estéril constituido por medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich Ref. D5796, Saint- Quentin-Fallavier, Francia) suplementado con antibióticos (500 U/ml de penicilina G y 500 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de estreptomina) y antimicóticos (1.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de anfotericina B) (Sigma-Aldrich Ref. A5955) para evitar una eventual contaminación de la muestra.

2.4. Obtención de Cultivos Primarios de Fibroblastos de Mucosa Oral

Las muestras fueron lavadas dos veces en solución estéril de PBS con penicilina, estreptomina y anfotericina B (500U/ml, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente) para eliminar los restos de sangre, fibrina, grasas o materiales extraños que pudieran estar adheridos a las muestras.

Para llevar a cabo la digestión de la matriz extracelular del corion de la mucosa oral y lograr la separación de los fibroblastos estromales incluidos en dicha matriz, las muestras fueron incubadas a 37°Celsius en una solución estéril de colagenasa tipo I de Clostridium histolyticum (Gibco BRL Life Technologies Ref. 17100-017, Karlsruhe, Alemania) al 2% en medio de cultivo DMEM durante 10-12 horas. Esta solución es capaz de digerir el colágeno del corion y liberar los fibroblastos estromales. Para la obtención de cultivos primarios de fibroblastos, se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos la solución de digestión que contenía las células

estromales disgregadas del corion, recogiendo el pellet celular correspondiente a los fibroblastos en frascos de cultivo de 15 cm² de superficie.

Como medio de cultivo, se utilizó DMEM rico en glucosa (Sigma-Aldrich Ref. D5796) suplementado con antibióticos-antimicóticos (100 U/ml de penicilina G, 100µg/ml de estreptomina y 0.25µg/ml de anfotericina B; Sigma-Aldrich Ref. A5955) y suero bovino fetal (SBF) (Sigma-Aldrich Ref. F9665) al 10%. Los medios de cultivo fueron renovados cada tres días.

2.5. Subcultivo de Fibroblastos Procedentes de Cultivos Primarios de Mucosa Oral

Una vez alcanzada la confluencia celular, los fibroblastos se lavaron con PBS estéril y se incubaron en 1 ml de una solución de tripsina 0.5g/l y EDTA 0.2g/l (Sigma Aldrich Ref. T4799) a 37°C durante 5 minutos para disgregar los mecanismos de adhesión celular y obtener células individualizadas y no adheridas a la superficie del frasco de cultivo.

Cuando las células se desprendieron de la superficie de los frascos de cultivo, se procedió a inactivar la tripsina utilizada mediante adición de 1 ml de medio de cultivo DMEM. El medio de cultivo DMEM es capaz de inactivar la acción proteolítica de la tripsina. Posteriormente, la solución inactivada en la cual se localizaban las células desprendidas, se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos para obtener un pellet o botón celular con las células de interés. El pellet celular se resuspendió cuidadosamente en 5 ml de medio DMEM y parte de las células se cultivaron en:

- a) Placas de 24 pocillos, para el estudio de LDH, y liberación de ADN.
- b) Rejillas de oro, para su estudio mediante técnicas de microscopía electrónica analítica cuantitativa.

2.6. Tratamiento de las Muestras.

Para la realización de los ensayos experimentales con los diferentes cementos de ionómero vítreo se procedió del siguiente modo:

Las muestras fueron divididas en cuatro grupos experimentales:

Grupo 1: Control Tritón X al 2 % (CT) (grupo control positivo).

Grupo 2: Medio de Cultivo DMEM (CM) (grupo control negativo).

Grupo 3: Ketac-Molar Easy Mix (KM) (3M- ESPE, St Paul, MN, USA).

Grupo 4: Vitrebond (VT) (3M-ESPE, St Paul, MN,USA).

Los biomateriales, Vitrebond y Ketac-Molar Easy Mix, en su presentación comercial como polvo/líquido, se mezclaron de acuerdo con las indicaciones del fabricante y en su estado fluído y brillante se colocaron en moldes siliconados con apertura de 2 mm de diámetro por 1 mm de espesor para la confección de pastillas de estos biomateriales. El ionómero vítreo modificado con resina se fotopolimerizó durante 40 segundos con Lámpara Coltolux LED (Colténe/Whaledent, Suiza).

Los fibroblastos gingivales humanos se cultivaron en placas de 24 pocillos a una concentración de 20000 células/500µl de medio de cultivo DMEM, con 10% FBS y antibióticos. Las células fueron incubadas a 37°Celsius con un 5% de dióxido de carbono durante 24 horas. Cumplido este tiempo y obtenida la adhesión de las células a la base de cada uno de los pocillos, fueron lavadas y recibieron 500 µl de medio de cultivo DMEM (suplementado con glutamina) sin rojo fenol y en ausencia de antibióticos. Posteriormente se procedió a la colocación de un inserto en cada pocillo, el cual posee una membrana en su base y es donde se apoyaron cada una de las pastillas de los biomateriales objeto de estudio. Por último se añadió 1500µl de medio para que fluya por los insertos cubriendo también así las pastillas. Las células sometidas a la acción de los distintos biomateriales fueron analizadas a las 72 horas.

2.7. Estudio de la citotoxicidad mediante la Cuantificación de LDH libre

Para determinar el porcentaje de citotoxicidad mediante la liberación de la enzima citosólica Lactato Deshidrogenasa (LDH), en todos los casos anteriormente mencionados, se empleó un Kit de la casa Roche Cat. No. 1 644 793. Para ello se tomó 100µl de sobrenadante de cada grupo experimental y se añadió 100µl de la solución Kit en una placa de 96 pocillos. La medición de la enzima LDH liberada al medio, se realizó en un aparato lector de placas ELX – 800 de Biotek.

Como controles se realizaron mediciones de liberación de LDH, de fibroblastos cultivados con medio de cultivo DMEM (CM) y de fibroblastos con solución de Tritón X-100 (2% en medio de cultivo DMEM) (CT).

La fórmula empleada para determinar el porcentaje de citotoxicidad fue la siguiente:

$$\% = \frac{\text{Valor Exp.} - \text{CM}}{\text{CT} - \text{CM}} \times 100$$

2.8. Estudio de la citotoxicidad mediante la cuantificación de ADN libre

La identificación de fragmentos de ADN libre en el medio de cultivo celular se llevó a cabo mediante una técnica que cuantifica el ADN a través de espectrofotometría.

Para la determinación cuantitativa de ADN libre en el medio de cultivo, se tomaron alícuotas de 10 μ l de sobrenadante para cada una de las muestras a cuantificar. Luego se diluyó en agua bidestilada y autoclavada hasta un volumen de 100 μ l en cubetas especiales para espectrofotometría (Bio-Rad, ref. 170-2510, Hércules, California, EEUU), cuantificándose la concentración de ADN mediante un espectrofotómetro SmartSpec Plus de la casa comercial Bio-Rad (ref. 170-2525). Las condiciones en las que se cuantificó el ADN en el medio de cultivo fueron las siguientes:

- Longitud de onda para la detección de ADN: 260nm
- Factor de conversión: 1 = 50 μ g/ml
- Factor de dilución: 10 \times

2.9. Estudio Morfológico

Para la observación de las muestras se utilizó la metodología de Microscopía óptica, la fotovideomicroscopía y confocal laser scanning microscopy.

2.9.1. Microscopía Óptica

Realizadas las pruebas experimentales como se describe en el punto 2.6, se retiró el medio de cultivo. Se fijaron las muestras con formaldeído al 4% durante cuatro horas, luego se lavaron con agua destilada y se colorearon con Hematoxilina tres minutos. La observación se realizó en un microscopio óptico Nikon Japan Optifhot-2.

2.9.2. Fotovideomicroscopía

Las muestras coloreadas con Hematoxilina, se analizaron con Fotovideomicroscopio Invertido para cultivos celulares (Zeiss 35M y analizador de imágenes Metamorph).

2.9.3. Confocal Laser Scanning Microscope

Para observar las células con confocal laser scanning microscope, se fijaron con formaldeído al 4% durante cuatro horas, luego se lavaron con agua destilada y se colorearon con eosina se analizaron posteriormente con Confocal Laser Scanning Microscope (LSM 5 Pascal, Zeiss), utilizando un laser verde de 543nm de longitud de onda por transmisión, epifluorescencia, barrido o en mapa de gradientes (stacks) y procesados con analizador de imágenes Zeiss LSM Image Browser.

2.10. Estudio de la Citotoxicidad mediante Microanálisis por Energía Dispersiva de Rayos X

Con el objetivo de analizar las alteraciones en la composición elemental de los fibroblastos gingivales humanos expuestos a la acción de los diferentes cementos de ionómeros de vidrio se utilizó el Microanálisis por Energía Dispersiva de Rayos X. El procesamiento de las muestras a analizar ha sido el siguiente:

2.10.1. Adhesión de las Células al Soporte

Los fibroblastos gingivales humanos mantenidos en falcon con medio de cultivo DMEM se tripsinizaron y se cultivaron sobre rejillas de oro (Ref.G100 – G3)

especiales para microscopía electrónica. Con el objeto de eliminar restos de materia orgánica que se pudiera haber depositado sobre las mismas, las rejillas fueron lavadas con cloroformo, aclaradas con etanol absoluto y nuevamente lavadas en solución de ácido acético 2%, dejándose secar a continuación al aire. Para permitir el crecimiento de las células sobre las rejillas de oro, se aplicó una fina capa de Pioloformo (Fig. 1).

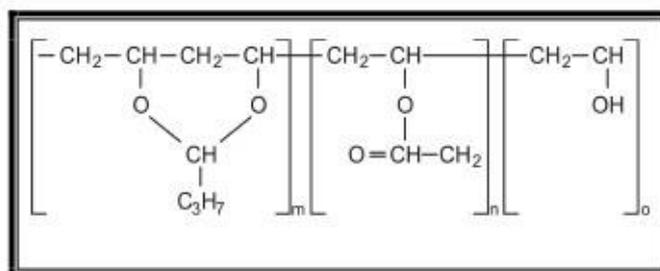


Figura 1. Estructura química del polivinil butiral (pioloformo).

Las células fueron expuestas a la acción de los Biomateriales, Ketac- Molar Easy Mix y Vitrebond en las condiciones experimentales desarrolladas en el punto 2.6.

2.10.2. Eliminación del Medio Extracelular

Con el objetivo de eliminar la contribución del medio extracelular al espectro de rayos X en los análisis de los fibroblastos, se procedió al lavado de las rejillas conteniendo las células de acuerdo con los criterios establecidos previamente por diferentes autores (Abraham et al., 1985) (Fernández-Segura et al., 1997a) (Lechne, 1989) (von Euler et al., 1993) (Warley, 1994a) (Wroblewski et al., 1983) (Wroblewski y Roomans, 1984) (Zierold y Schäfer, 1988), eligiendo como solución lavadora el agua destilada. Las muestras fueron lavadas mediante inmersión en agua destilada a una temperatura de 4°Celsius, durante 5 segundos. La solución lavadora se mantuvo en movimiento constante por agitación magnética.

2.10.3. Criofijación y Criodesecación de las Muestras

Las muestras lavadas se criofijaron mediante inmersión rápida de las mismas en nitrógeno líquido. Previamente se eliminó el exceso de agua con un papel de filtro. Las rejillas con las células criofijadas se introdujeron en un portamuestras de aluminio preenfriado a -196°C mediante inmersión en nitrógeno líquido.

Las células criofijadas y en el interior del portamuestras fueron transferidas de forma inmediata a un sistema de criodesecación de alto vacío Emitech K775 (Emitech, Watford, UK) con el objetivo de extraer el agua de las células por sublimación (Fig. 2). Las muestras fueron criodesecadas durante un total de 17 horas a una presión de vacío de 10⁻⁵ mbar siguiendo el perfil de temperaturas mostrado en la Tabla 2, y desarrollado de acuerdo con los criterios establecidos por Warley y Skepper (2000).



Figura 2. Preparación de células humanas mantenidas en cultivo para análisis mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X. Las células cultivadas sobre rejillas de oro cubiertas de polioformo son lavadas en agua destilada, criofijadas por inmersión en nitrógeno líquido, desecadas en frío y recubiertas con carbón.

Segmento	Temperatura Inicial	Temperatura Final	Tiempo
1	-100°C	-100°C	1 hora
2	-100°C	-70°C	1 hora
3	-70°C	-70°C	1 hora
4	-70°C	-50°C	1 hora
5	-50°C	-50°C	1 hora
6	-50°C	+25°C	12 horas

Tabla 1. Programa de intervalos de tiempo y temperaturas utilizadas para la criodeseccación de las muestras en un sistema de alto vacío.

2.10.4. Montaje y recubrimiento de las muestras

Tras la criodeseccación de las células, se recubrieron las muestras con una superficie conductora de electricidad, para facilitar el barrido del haz de electrones durante, su observación microscópica y detección analítica. Para ello las rejillas criodeseccadas y montadas sobre el portamuestras de aluminio fueron recubiertas con una capa de carbón mediante un evaporador (Emitech, Watford, UK) utilizando hilo de grafito.

2.10.5. Instrumentación

2.10.5.1. Parámetros analíticos y condiciones de observación

Para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se utilizó un microscopio electrónico de barrido Phillips XL 30 (Phillips, Eindhoven, Holanda), y un detector de energía dispersiva de rayos X con una ventana ultrafina CDU (EDAX, Eindhoven, Holanda). La configuración geométrica de este equipamiento posibilita la detección simultánea de electrones secundarios y rayos X.

2.10.5.2. Observación de las muestras

Para la visualización de las muestras mediante electrones secundarios en el microscopio electrónico de barrido Phillips XL30, los parámetros fijados fueron los siguientes:

Voltaje del microscopio:.....10 KV

Angulación de superficie:.....0°

Distancia de trabajo:.....10mm

Para la detección microanalítica, las condiciones instrumentales fueron las siguientes:

Voltaje del microscopio.....10 KV
 Aumentos.....10000
 Angulación de superficie (tilt).....0°
 Cuentas por segundo (CPS) registradas por el detector.....500
 Tiempo de adquisición.....200 s
 Tamaño del haz de electrones (spot size).....6
 Distancia de trabajo.....10
 Área de análisis.....puntiforme y estático

Para determinar cuantitativamente el contenido elemental de las células, se utilizó el método de la razón pico fondo -método P/B- con referencia a patrones de calibración de matriz orgánica (Boekestein et al., 1980 y 1984; Roomans, 1988; Statham y Pawley, 1978). La concentración de cada elemento se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$C_{spc} = C_{std} \frac{(P/B)_{spc} \cdot Z^2/A_{spc}}{(P/B)_{std} \cdot Z^2/A_{std}}$$

Donde:

C_{spc} es la concentración del elemento a cuantificar,

P corresponde a las cuentas netas de la señal característica del elemento,

B es la radiación continua medida debajo del pico, es decir, tomada entre los mismos niveles de energía de la señal característica,

Z^2/A es el valor medio del número atómico al cuadrado por el peso atómico, correspondiente un valor específico para el dextrano y las células (Warley, 1977).

La preparación de los patrones se realizó de acuerdo con las pautas establecidas en el laboratorio del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de Granada (Crespo et al., 1993) (López - Escámez y Campos, 1994) utilizando sales de NaHPO₄, MgCl₂, CaCl₂·H₂O y K₂SO₄ disueltas en una matriz orgánica. Para ello, se prepararon soluciones de cada sal a diferentes concentraciones en dextrano al 20% (300 kD). Los patrones se montaron sobre membranas microporosas de las unidades Millicell® y se criofijaron mediante inmersión en nitrógeno líquido. En esta fase del proceso, así como en la posterior criodeseccación, montaje y recubrimiento, se siguió el mismo procedimiento que se expuso para la preparación de células humanas para microanálisis. Los patrones se analizaron en el microscopio electrónico de barrido y se microanalizaron inmediatamente después de su preparación para evitar su contaminación o modificación química, adquiriéndose entre 15 y 20 espectros para cada concentración de patrón, utilizando las mismas condiciones de análisis que se utilizaron para las células cultivadas sobre rejillas de oro.

El análisis de los patrones de dextrano al 20% conteniendo concentraciones conocidas de sales de Na, Cl, Mg, P, S, K y Ca, permitió realizar la calibración de las concentraciones de los citados elementos frente a la señal P/B. La concentración de cada elemento en el estándar es directamente proporcional a la razón P/B de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$Cts = K \times (Pstd/Bstd)$$

Donde:

Cts es la concentración del elemento en el patrón, la cual es conocida,

(Pstd/Bstd) es la razón P/B, donde el fondo se ha medido entre el mismo rango de energía de la señal característica obtenida del análisis de los estándar.

K es la constante de calibración característica para cada elemento y configuración instrumental utilizada.

La relación entre Pstd/Bstd frente a la concentración de cada elemento se estudió mediante regresión lineal simple (Fig. 3).

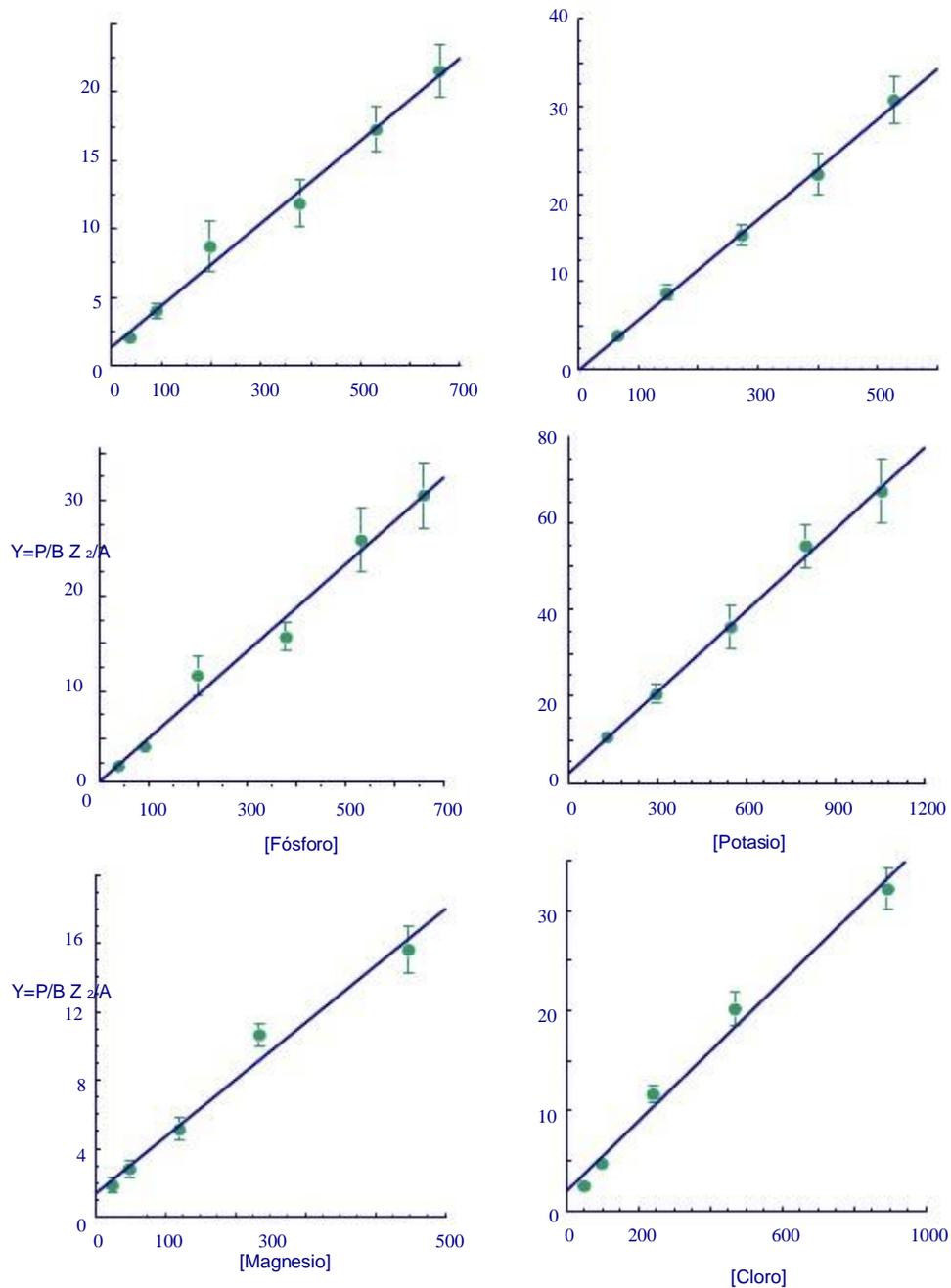


Fig. 3. Representación de la razón $Y = Pstd/Bstd. Z_2/A$ como una función de $Cstd$ para los patrones de P, Mg, K y Cl 10 kV. Cada valor representa la media \pm SD de 15- 20 análisis. Los patrones de calibración fueron preparados de forma idéntica a los fibroblastos gingivales humanos. Las soluciones en dextrano al 20% con las diferentes concentraciones de las sales inorgánicas empleadas fueron depositadas sobre filtros de policarbonato (tamaño de poro de $0.4 \mu m$) aislados de sus soportes de polistireno, criofijadas en nitrógeno líquido, criodesecadas y analizadas en un microscopio Philips XL30 utilizando idénticas condiciones instrumentales y analíticas a las indicadas en el apartado 2.9.5.2. del capítulo de Material y Métodos.

Puesto que la constante de calibración K depende de la diferencia en el Z2/A (factor G) entre el estándar y la célula, se empleó la siguiente ecuación para valorar la influencia de dicho factor en el ajuste de la curva:

$$Y = P_{std}/B_{std} \cdot (Z2/A)_{std}$$

Donde Z2/A es el promedio del valor de Z2/A para todos los elementos presentes en el volumen analizado de estándar:

$$Z2/A = \sum (\phi_i \cdot Z_i^2 / A_i)$$

Donde:

Z_i es el número atómico del elemento i,

A_i es el peso atómico de dicho elemento,

f_i es la fracción de masa del elemento i expresada como masa elemental/masa total (Hall y Gupta, 1986).

En la Tabla 2 se muestran las ecuaciones de regresión obtenidas para todos los elementos cuando Y = P_{std}/B_{std} · Z2/A se calibró frente a C_{std} para los elementos Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca analizados a 10 kV.

Na	Y = 3,75 + 0,032x	(r = 0,99 P < 0,001)
Mg	Y = 1,07 + 0,052x	(r = 0,98 P < 0,001)
P	Y = 0,64 + 0,042x	(r = 0,99 P < 0,001)
S	Y = 1,38 + 0,052x	(r = 0,97 P < 0,001)
Cl	Y = 1,42 + 0,036x	(r = 0,99 P < 0,001)
K	Y = 3,32 + 0,054x	(r = 0,99 P < 0,001)
Ca	Y = 0,60 + 0,063x	(r = 0,99 P < 0,001)

Tabla 2. Ecuaciones de regresión obtenidas cuando Y = P_{std}/B_{std} Z2/A se calibró frente a C_{std} analizados a 10 kV.

2.11. Estudio Estadístico

Para el estudio estadístico se empleó la Prueba de Kruskal-Wallis. Éste es un test que determina si existen o no diferencias globalmente entre todos los grupos de estudio, es decir, indica si los 3 ó 4 grupos comparados son iguales o si alguno es diferente del resto (aunque no indica cuál es mayor o menor, sólo indica si son

iguales o diferentes). Si el test es significativo (significación $p < 0.05$), entonces se puede sostener que los 3 ó 4 grupos son distintos entre sí. Si es mayor a 0,05 los grupos son idénticos.

También se empleó la Prueba de Mann-Whitney. Esta prueba sirve para comparar dos grupos concretos. Si es significativa (significación $p < 0.05$) indica que ambos grupos son diferentes, de lo contrario serían iguales. Esta prueba no sirve para determinar que grupo es mayor o menor, sólo indica si son iguales o diferentes.

3. RESULTADOS

RESULTADOS

A continuación se expresan los resultados del estudio de citotoxicidad mediante liberación de LDH, ADN y el análisis mediante Microanálisis por Energía Dispersiva de Rayos X.

3.1. Resultados del estudio de la citotoxicidad mediante la liberación de LDH

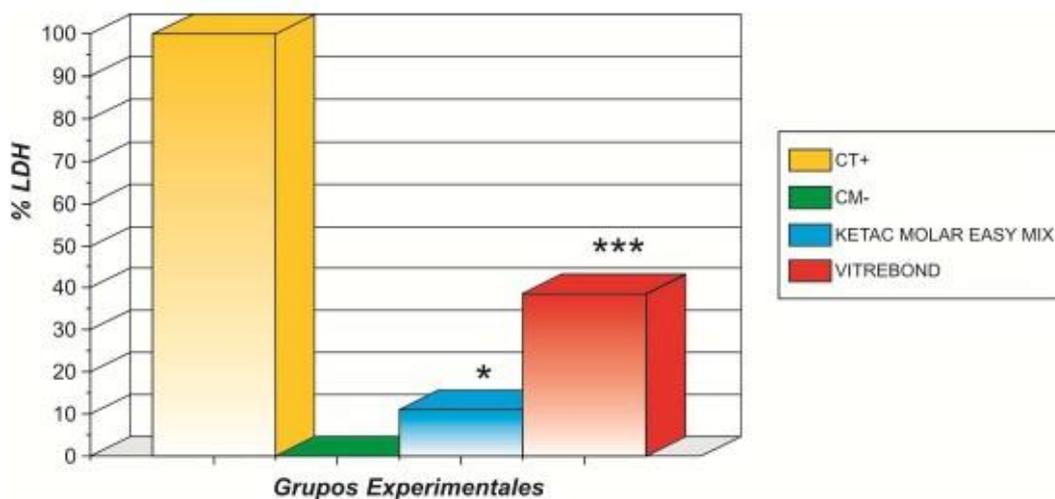
En la tabla 3 se exponen las concentraciones de la liberación de LDH y la expresión de estos valores en porcentajes de citotoxicidad a las 72 horas. Cada uno de los ensayos se presenta por triplicado. En la gráfica 1 se representan en forma comparativa los distintos materiales evaluados con respecto a los controles.

Para la comparación de valores medios de liberación de LDH entre los diferentes grupos de muestras (CT, CM, KM, VT) se utilizó la prueba de Kruskal Wallis para valorar diferencias globales entre todos los grupos de estudio. Para comparar dos grupos concretos se utilizó la prueba de Mann-Whitney. En la tabla 4 se especifican esos valores. Los valores estadísticamente significativos se señalan en color azul.

Tabla 3. Concentraciones de liberación de LDH, y porcentaje de citotoxicidad.

	>D, ^	<D	sd	D	d
E^ zK	>D, >D, >D,				
E^ zK	>D, >D, >D,				
E^ zK	>D, >D, >D,				
E^ zK	>D, >D, >D,				
E^ zK	>D, >D, >D,				
E^ zK	>D, >D, >D,				
E^ zK	>D, >D, >D,				
E^ zK	>D, >D, >D,				
E^ zK	>D, >D, >D,				
E^ zK	>D, >D, >D,				
E^ zK	>D, >D, >D,				
E^ zK	>D, >D, >D,				
E^ zK	>D, >D, >D,				

zK	>2, >2,				
zK	>2, >2, >2,				
zK	>2, >2, >2,				
zK	>2, >2, >2,				
zK	>2, >2, >2,				
zK	>2, >2, >2,				
D/					
WKZEd :					



Gráfica 1. Representación de los porcentajes de citotoxicidad mediante la cuantificación de liberación de LDH. (*)= $p < 0,05$; (***)= $p < 0,001$.

Tabla 4. Comparación de valores medios de liberación de LDH entre los diferentes grupos de muestras (CT, CM, KM, VT). Prueba de Kruskal Wallis para valorar diferencias globales entre todos los grupos de estudio. Para comparar dos grupos concretos se utilizó la Prueba de Mann-Whitney.

Prueba de Kruskal-Wallis

KM vs VT vs CM vs CTLDH	
Chi-cuadrado 120,135	
G13	
Sig. asintót. 7,21773E-26	
a. Prueba de Kruskal-Wallis	
b. Variable de agrupación: KM1VT2CM3CT4-LDH	

Prueba de Mann-Whitney

KM vs VTLDH	
U de Mann-Whitney 172,000	
W de Wilcoxon 992,000	
Z -6,043	
Sig. asintót. (bilateral) 1,51271E-09	
a. Variable de agrupación: KM1VT2CM3CT4-LDH	

KM vs CMLDH	
U de Mann-Whitney 562,000	
W de Wilcoxon 1.382,000	
Z -2,290	
Sig. asintót. (bilateral) 0,022002939	
a. Variable de agrupación: KM1VT2CM3CT4-LDH	

KM vs CTLDH	
U de Mann-Whitney 0,000	
W de Wilcoxon 820,000	
Z -7,698	
Sig. asintót. (bilateral) 1,38062E-14	
a. Variable de agrupación: KM1VT2CM3CT4-LDH	

VT vs CMLDH	
U de Mann-Whitney 63,000	
W de Wilcoxon 883,000	
Z -7,092	
Sig. asintót. (bilateral) 1,32075E-12	
a. Variable de agrupación: KM1VT2CM3CT4-LDH	

VT vs CTLDH	
U de Mann-Whitney95,000	
W de Wilcoxon915,000	
Z-6,784	
Sig. asintót. (bilateral)1,16906E-11	
a. Variable de agrupación: KM1VT2CM3CT4-LDH	

CM vs CTLDH	
U de Mann-Whitney0,000	
W de Wilcoxon820,000	
Z-7,698	
Sig. asintót. (bilateral)1,3777E-14	
a. Variable de agrupación: KM1VT2CM3CT4-LDH	

3.2. Resultados del estudio de la citotoxicidad de los cementos de ionómero de vidrio mediante la liberación de ADN

Los resultados correspondientes a la liberación de ADN a las 72 horas en los ionómeros de vidrio y sus controles se expresan en la tabla 5, y la liberación de ADN expresada en microgramos por ml se representa en la Gráfica 2.

Para la comparación de valores medios de liberación de ADN entre los diferentes grupos de muestras (CT, CM, KM, VT) se utilizó la prueba de Kruskal Wallis para valorar diferencias globales entre todos los grupos de estudio. Para comparar dos grupos concretos se utilizó la prueba de Mann-Whitney. En la tabla 6 se especifican esos valores. Los valores estadísticamente significativos se señalan en color azul.

Tabla 5. Valores de las diferentes mediciones de liberación de ADN se expresan en ug/ml, con sus correspondientes MEDIAS, DESVIACIÓN ESTANDAR, y ERROR ESTANDAR.

	CONTROL TRITÓN	CONTROL MEDIO	KETAC MOLAR KM	VITREBOND VT
	514,3972	79,7918	69,6988	101,3899
	459,6375	73,9863	75,8137	95,209
	510,9326	78,2743	71,9404	106,4959
	434,9055	81,1807	78,4806	103,4642
	498,7543	64,6088	82,3682	125,9887
	639,6559	79,3278	74,6275	116,5901
	508,7609	69,6424	78,2056	115,7716
	834,8229	59,6758	83,1401	142,9005
	801,2534	63,9161	77,9995	109,4117
	719,4709	54,1247	80,8326	114,445
	363,2496	58,1156	78,3653	98,5964
	215,2309	64,2792	68,3677	83,464
	243,0035	38,8996	63,3362	82,3885
	176,8496	92,7462	42,2016	81,3636
	311,2141	44,1365	40,9793	63,2639
	237,1951	69,7266	45,6881	83,6565
	165,8987	51,5728	50,4785	69,5031
	197,9066	42,2892	36,7543	59,3202
	143,9536	37,2673	60,0319	64,643
			73,562	55,6563
			65,9026	91,0197
			63,9647	888,6279
			72,8619	667,8837
			102,2218	98,4465
			89,645	109,502
			69,6424	106,4518
MEDIA	419,846989	63,3453526	69,1196269	147,51745
DESVEST	212,672757	15,359096	15,3075266	185,814456
ERROR ST	11,5000253	0,88034605	0,58925185	7,15536192



Gráfica 2. Representación de la liberación de ADN expresados en µgr/ml. ns= $p>0.05$; ***= <0.001 .

Tabla 6. Comparación de valores medios, Test No Paramétrico con signo de Wilcoxon

Prueba de Kruskal-Wallis

KM vs VT vs CM vs CTADN	
Chi-cuadrado 50,991	
GI3	
Sig. asintót. 4,9147E-11	

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: KM1VT2CM3CT4-ADH

Prueba de Mann-Whitney

KM vs VTADN	
U de Mann-Whitney 9,000	
W de Wilcoxon 129,000	
Z -4,293	
Sig. asintót. (bilateral) 0,000	
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)] 1,76291E-05	

a. No corregidos para los empates.

b. Variable de agrupación: KM1VT2CM3CT4-ADH

KM vs CMADN	
U de Mann-Whitney 25,500	
W de Wilcoxon 145,500	
Z -3,609	
Sig. asintót. (bilateral) 0,000	
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)] 0,000307387	

a. No corregidos para los empates.

b. Variable de agrupación: KM1VT2CM3CT4-ADH

KM vs CTADN	
U de Mann-Whitney 0,000	
W de Wilcoxon 120,000	
Z -4,666	
Sig. asintót. (bilateral) 0,000	
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)] 3,06698E-06	

a. No corregidos para los empates.

b. Variable de agrupación: KM1VT2CM3CT4-ADH

VT vs CMADN	
U de Mann-Whitney 0,000	
W de Wilcoxon 120,000	
Z -4,666	
Sig. asintót. (bilateral) 0,000	
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)] 3,06698E-06	

a. No corregidos para los empates.

b. Variable de agrupación: KM1VT2CM3CT4-ADH

VT vs CTADN	
U de Mann-Whitney12,000	
W de Wilcoxon132,000	
Z-4,169	
Sig. asintót. (bilateral)0,000	
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]3,06549E-05	
a. No corregidos para los empates.	

b. Variable de agrupación: KM1VT2CM3CT4-ADH

CM vs CTADN	
U de Mann-Whitney0,000	
W de Wilcoxon120,000	
Z-4,666	
Sig. asintót. (bilateral)0,000	
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]3,06698E-06	
a. No corregidos para los empates.	

b. Variable de agrupación: KM1VT2CM3CT4-ADH

3.3 Resultados del estudio de la citotoxicidad de los ionómeros de vidrio mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X

3.3.1 Análisis Cualitativo

En las tablas 7 a 12 se expresan los análisis cualitativos de las 30 células expuestas a VT (Vitrebond).

En las tablas 13 a 18 aparecen los análisis cualitativos de las células expuestas a KM (Ketac-Molar) 29 células, mientras que en las tablas 19 a 24 se muestra el análisis cualitativo de las células expuestas al control, 30 células.

3.3.2 Análisis Cuantitativo

En el gráfico 3 y 4 se expresa el perfil iónico de las muestras.

Para la comparación de valores medios entre los diferentes grupos de muestras (CM, KM, VT) se utilizó la prueba de Kruskal Wallis para valorar diferencias globales entre todos los grupos de estudio. Para comparar dos grupos concretos se utilizó la prueba de Mann-Whitney. En las tablas 29 y 30 se especifican esos valores. Los valores estadísticamente significativos se señalan en color azul.

Tabla 7

VITREBOND	VT			
NRO DE CÉLULA	ELEMENTO	CPS	BACKGROUND	P/B
CÉLULA 1	Na	15,04	4,81	3,13
	Mg	10,77	4,91	2,19
	P	8,36	4,55	1,84
	S	4,96	4,22	1,17
	Cl	6,14	3,38	1,82
	K	1,72	1,7	1,01
	Ca	7,3	1,32	5,55
CÉLULA 2	Na	2,77	3,13	0,88
	Mg	4,42	3,41	1,3
	P	7,61	3,37	2,26
	S	2,63	2,64	0,99
	Cl	3,26	2,12	1,53
	K	7,71	1,25	6,17
	Ca	2,85	1,19	2,39
CÉLULA 3	Na	9,36	8,14	1,15
	Mg	11,47	8,89	1,29
	P	30,27	7,36	4,11
	S	4,18	5,83	0,72
	Cl	8,07	4,74	1,7
	K	22,57	3,34	6,77
	Ca	3,46	3,19	1,08
CÉLULA 4	Na	4,24	4,44	0,95
	Mg	7,03	5,27	1,33
	P	9,61	4,82	1,99
	S	4,16	3,97	1,05
	Cl	1,5	3,41	0,44
	K	0,19	2,32	0,08
	Ca	7,14	2,02	3,54
CÉLULA 5	Na	9,92	9,57	1,04
	Mg	10,12	10,05	1,01
	P	33,6	10,88	3,09
	S	1,77	8,27	0,21
	Cl	7,64	6,3	1,21
	K	25,69	3,85	6,68
	Ca	2,54	3,65	0,69

Tabla 8

CÉLULA 6	Na	24,28	10,81	2,25
	Mg	6,03	11,78	0,51
	P	37,46	9,32	4,02
	S	2,52	7,48	0,34
	Cl	9,23	6,2	1,49
	K	15,05	4,32	3,48
	Ca	0,32	4,07	0,08
CÉLULA 7	Na	67,41	12,16	5,54
	Mg	9,1	12,69	0,72
	P	27,74	11,2	2,38
	S	0,99	9,84	0,1
	Cl	21,74	9,2	2,36
	K	0	8,1	0
	Ca	0	7,69	0
CÉLULA 8	Na	18,14	12,28	1,48
	Mg	5,18	13,14	0,39
	P	37,33	10,62	3,52
	S	5,18	8,35	0,62
	Cl	12,62	6,71	1,88
	K	18,49	4,22	4,38
	Ca	0,28	4,03	0,07
CÉLULA 9	Na	39,04	11,16	3,5
	Mg	7,01	11,93	0,59
	P	35,69	9,67	3,69
	S	5,4	7,66	0,7
	Cl	14,6	6,22	2,35
	K	6,08	4,13	1,47
	Ca	2,24	3,93	0,57
CÉLULA 10	Na	9,92	7,93	1,25
	Mg	5,28	9,34	0,57
	P	33,73	9,07	3,72
	S	4,49	7,22	0,62
	Cl	12,36	5,89	2,1
	K	24,46	4,18	5,84
	Ca	0,25	3,94	0,06

Tabla 9

CÉLULA 11	Na	3,46	6,26	0,55
	Mg	6,87	6,75	1,02
	P	8,61	5,93	1,45
	S	2,67	4,82	0,56
	Cl	1,17	4,05	0,29
	K	0,97	2,56	0,38
	Ca	5,73	2,27	2,52
CÉLULA 12	Na	40,28	10,02	4,02
	Mg	9,7	11,1	0,87
	P	32,2	11,38	2,83
	S	2,85	9,69	0,29
	Cl	16,66	7,74	2,15
	K	10,35	4,8	2,16
	Ca	3,42	4,55	0,75
CÉLULA 13	Na	34,33	10,81	3,17
	Mg	5,81	11,1	0,51
	P	23,92	11,38	2,69
	S	3,06	9,69	0,4
	Cl	10,48	7,74	1,48
	K	0	4,8	0
	Ca	3,78	4,55	0,64
CÉLULA 14	Na	43,34	10,45	4,15
	Mg	8,14	10,74	0,76
	P	32,17	9,26	3,48
	S	3,42	8,11	0,42
	Cl	13,31	7,57	1,76
	K	0	6,61	0
	Ca	2,04	6,25	0,33
CÉLULA 15	Na	22,05	10,41	2,12
	Mg	5,36	11,09	0,48
	P	31,76	10,18	3,12
	S	2,83	8,69	0,32
	Cl	9,64	6,94	1,39
	K	15,57	4,22	3,69
	Ca	0,55	4,01	0,14

Tabla 10

CÉLULA 16	Na	9,39	9,02	1,04
	Mg	3,26	9,46	0,34
	P	21,17	8,9	2,38
	S	2,99	7,62	0,39
	Cl	6,88	6,02	1,14
	K	17,57	3,38	5,2
	Ca	0,31	3,21	0,1
CÉLULA 17	Na	6,94	5,47	1,27
	Mg	3,6	6,53	0,55
	P	21,91	6,39	3,43
	S	5,26	5,2	1,01
	Cl	7,3	4,4	1,66
	K	17,17	3,41	5,03
	Ca	0	3,24	0
CÉLULA 18	Na	7,98	6,78	1,18
	Mg	3,36	7,85	0,43
	P	23,35	6,1	3,83
	S	3,31	4,95	0,67
	Cl	9,29	4,19	2,22
	K	19,05	2,98	6,38
	Ca	0	2,84	0
CÉLULA 19	Na	33,14	8,39	3,95
	Mg	4,75	8,75	0,54
	P	23,05	6,82	3,38
	S	5,38	5,45	0,99
	Cl	16,38	4,46	3,67
	K	9,9	2,98	3,32
	Ca	0,68	2,82	0,24
CÉLULA 20	Na	14,22	8,52	1,67
	Mg	5,93	8,98	0,66
	P	29,26	7,35	3,98
	S	4,79	5,91	0,81
	Cl	10,59	4,91	2,16
	K	21,35	3,34	6,39
	Ca	1,29	3,13	0,41

Tabla 11

CÉLULA 21	Na	29,74	9,1	3,27
	Mg	4,19	9,3	0,45
	P	18,45	7,84	2,35
	S	2,24	6,82	0,33
	Cl	10,66	6,31	1,69
	K	0,25	5,36	0,05
	Ca	0	4,99	0
CÉLULA 22	Na	9,92	7,93	1,25
	Mg	5,28	9,34	0,57
	P	33,73	9,07	3,72
	S	4,49	7,22	0,62
	Cl	12,36	5,89	2,1
	K	24,46	4,18	5,84
	Ca	0,25	3,94	0,06
CÉLULA 23	Na	30,56	7,47	4,09
	Mg	5,43	7,94	0,68
	P	24,71	5,99	4,13
	S	6,44	4,74	1,36
	Cl	11,95	3,84	3,11
	K	7,58	2,59	2,93
	Ca	0,75	2,44	0,31
CÉLULA 24	Na	28,89	8,29	3,49
	Mg	5,47	8,65	0,63
	P	27,42	6,66	4,11
	S	6,05	5,24	1,15
	Cl	14,39	4,21	3,42
	K	9,38	2,82	3,33
	Ca	0,9	2,67	0,34
CÉLULA 25	Na	6,58	8,39	0,76
	Mg	3,34	9,22	0,36
	P	22,56	8,56	2,64
	S	2,96	6,66	0,44
	Cl	9,07	5,3	1,71
	K	20,72	3,45	6
	Ca	0	3,28	0

Tabla 12

CÉLULA 26	Na	8,18	8,68	0,94
	Mg	4,18	8,9	0,47
	P	22,6	7,25	3,12
	S	2,62	5,53	0,47
	Cl	9,16	4,24	2,16
	K	18,09	2,79	6,49
	Ca	1,44	2,63	0,55
CÉLULA 27	Na	7,69	7,03	1,09
	Mg	6,41	7,51	0,85
	P	26,93	5,64	4,77
	S	4,61	4,55	1,01
	Cl	9,76	3,79	2,58
	K	22,81	2,84	8,04
	Ca	1,59	2,66	0,59
CÉLULA 28	Na	13,93	7,7	1,81
	Mg	3,1	8,93	0,35
	P	22,62	8,74	2,59
	S	2,8	7,35	0,38
	Cl	11,91	5,53	2,16
	K	14,46	3,34	4,34
	Ca	0,14	3,15	0,05
CÉLULA 29	Na	7,2	2,23	3,22
	Mg	3,71	2,26	1,64
	P	1,75	1,82	0,96
	S	2,26	1,58	1,43
	Cl	2,86	1,46	1,96
	K	0	1,22	0
	Ca	2,23	1,12	1,99
CÉLULA 30	Na	13,46	6,86	1,96
	Mg	4,27	7,55	0,57
	P	29,92	5,91	5,07
	S	4,71	4,79	0,98
	Cl	7,61	4,05	1,88
	K	11,36	2,97	3,82
	Ca	0,28	2,79	0,1

Tabla 13

KETAC MOLAR	KM			
NRO DE CÉLULA	ELEMENTO	CPS	BACKGROUND	P/B
CÉLULA 1	Na	5,01	5,39	0,93
	Mg	16,7	5,76	2,9
	P	10,48	4,89	2,14
	S	9,24	4,02	2,3
	Cl	6,73	3,45	1,95
	K	12,85	2,58	4,98
	Ca	11,85	2,45	4,83
CÉLULA 2	Na	7,01	6,48	1,08
	Mg	24,74	6,84	3,61
	P	9,61	5,53	1,74
	S	11,06	4,42	2,5
	Cl	7,24	3,65	1,98
	K	12,42	2,53	4,91
	Ca	16,88	2,4	7,02
CÉLULA 3	Na	3,2	3,63	0,88
	Mg	5,76	4,3	1,34
	P	9,79	3,51	2,79
	S	5,52	2,79	1,98
	Cl	4,28	2,27	1,89
	K	10,1	1,68	5,99
	Ca	4,26	1,58	2,7
CÉLULA 4	Na	5,34	7,01	0,76
	Mg	13	7,36	1,77
	P	12,15	6,46	1,88
	S	9,73	5,13	1,9
	Cl	6,95	4,2	1,66
	K	14,76	2,84	5,2
	Ca	8,19	2,7	3,04
CÉLULA 5	Na	3,64	4,57	0,8
	Mg	6,45	5,26	1,22
	P	13,34	4,3	3,1
	S	6,01	3,59	1,68
	Cl	3,65	3,13	1,17
	K	12,56	2,46	5,1
	Ca	3,16	2,35	1,35

Tabla 14

CÉLULA 6	Na	3,79	5,38	0,7
	Mg	7,28	6,25	1,16
	P	14,11	5,26	2,68
	S	6,28	4,28	1,47
	Cl	5,11	3,59	1,42
	K	15,39	2,47	6,22
	Ca	3,6	2,36	1,52
CÉLULA 7	Na	4,41	5,34	0,83
	Mg	10,67	6,11	1,75
	P	15,92	5,03	3,17
	S	8,32	4,14	2,01
	Cl	3,65	3,56	1,03
	K	12,77	2,83	4,52
	Ca	6,11	2,66	2,3
CÉLULA 8	Na	2,34	3,49	0,67
	Mg	4,07	3,85	1,06
	P	8,47	3,83	2,21
	S	3,63	3,03	1,2
	Cl	3,22	2,44	1,32
	K	8,93	1,61	5,56
	Ca	2,46	1,51	1,62
CÉLULA 9	Na	5,03	6,8	0,74
	Mg	5,16	7,56	0,68
	P	25,02	6,66	3,76
	S	6,83	5,43	1,26
	Cl	5,1	4,6	1,11
	K	20,26	3,23	6,26
	Ca	0,69	3,07	0,22
CÉLULA 10	Na	5,39	6,08	0,89
	Mg	4,38	6,8	0,64
	P	18,89	5,82	3,24
	S	5,02	4,59	1,09
	Cl	4,44	3,7	1,2
	K	16,2	2,74	5,9
	Ca	0,28	2,6	0,11

Tabla 15

CÉLULA 11	Na	4,89	6	0,82
	Mg	4,64	6,45	0,72
	P	13,66	6,41	2,13
	S	4,53	5,46	0,83
	Cl	4,88	4,49	1,08
	K	15,54	2,93	5,29
	Ca	1,01	2,76	0,37
CÉLULA 12	Na	5,96	6,32	0,94
	Mg	19,12	7,27	2,63
	P	8,11	7,97	1,02
	S	9,3	6,24	1,49
	Cl	5,34	4,97	1,07
	K	11,03	3,13	3,52
	Ca	13,28	2,96	4,49
CÉLULA 13	Na	11,95	5,14	2,33
	Mg	3,47	5,49	0,63
	P	10,89	4,97	2,19
	S	2,48	4,32	0,57
	Cl	2,59	3,99	0,65
	K	0,56	3,39	0,16
	Ca	0,36	3,16	0,11
CÉLULA 14	Na	4	6,79	0,59
	Mg	4,3	7,34	0,58
	P	16,64	7,16	2,32
	S	3,25	5,58	0,58
	Cl	3,82	4,18	0,91
	K	15,47	2,78	5,56
	Ca	0,57	2,64	0,22
CÉLULA 15	Na	4,32	5,43	0,8
	Mg	5,99	6,32	0,95
	P	13,6	5,28	2,58
	S	6,24	4,34	1,44
	Cl	4,45	3,71	1,2
	K	12,51	2,81	4,46
	Ca	2,16	2,65	0,82

Tabla 16

CÉLULA 16	Na	23,41	8,38	2,79
	Mg	5,61	9,2	0,61
	P	25,97	7,03	3,69
	S	6,89	5,61	1,23
	Cl	13,62	4,59	2,96
	K	13,68	3,39	4,03
	Ca	1,72	3,24	0,53
CÉLULA 17	Na	18,53	5,78	3,2
	Mg	5,89	5,78	1,02
	P	13,86	6,22	2,23
	S	3,07	4,9	0,63
	Cl	6,66	3,94	1,69
	K	6,79	2,58	2,64
	Ca	1,91	2,42	0,79
CÉLULA 18	Na	14,05	7,09	1,98
	Mg	7,05	7,11	0,99
	P	20,63	5,41	3,81
	S	5,38	4,49	1,2
	Cl	9,47	3,92	2,42
	K	14,7	3,08	4,78
	Ca	2,83	2,91	0,97
CÉLULA 19	Na	14,56	10,39	1,4
	Mg	9,22	10,45	0,88
	P	30,56	7,46	4,1
	S	4,64	5,92	0,78
	Cl	9,79	4,8	2,04
	K	17,98	3,22	5,58
	Ca	4,47	3,05	1,46
CÉLULA 20	Na	2,72	5,49	0,5
	Mg	5,45	5,59	0,98
	P	15,38	4,32	3,56
	S	4,75	3,59	1,32
	Cl	3,93	3,12	1,26
	K	13,72	2,38	5,76
	Ca	1,96	2,23	0,88

Tabla 17

CÉLULA 21	Na	3,06	5,05	0,61
	Mg	3,49	5,38	0,65
	P	16,66	5,24	3,18
	S	3,11	4,36	0,71
	Cl	4,09	3,46	1,18
	K	15,23	2,42	6,28
	Ca	0	2,3	0
CÉLULA 22	Na	4,4	9,89	0,45
	Mg	3,82	9,81	0,39
	P	25,63	7,08	3,62
	S	4,33	5,72	0,76
	Cl	6,26	4,79	1,31
	K	19,22	3,32	5,8
	Ca	0	3,12	0
CÉLULA 23	Na	3,01	5,61	0,54
	Mg	4,53	5,78	0,78
	P	13,9	4,22	3,29
	S	4,74	3,4	1,39
	Cl	4,53	2,85	1,59
	K	14,85	2,1	7,07
	Ca	1,59	2	0,79
CÉLULA 24	Na	3,65	5,55	0,66
	Mg	5,54	5,84	0,95
	P	17,82	4,74	3,76
	S	4,71	3,87	1,22
	Cl	5,8	3,26	1,78
	K	18,35	2,34	7,86
	Ca	1,45	2,2	0,66
CÉLULA 25	Na	2,56	3,81	0,67
	Mg	4,15	3,88	1,07
	P	7,89	2,89	2,73
	S	3,08	2,31	1,33
	Cl	3,2	1,9	1,69
	K	8,66	1,42	6,08
	Ca	2,12	1,36	1,56

Tabla 18

CÉLULA 26	Na	5,79	8,4	0,69
	Mg	5,22	9,11	0,57
	P	30,96	7,7	4,02
	S	3,64	6,19	0,59
	Cl	5,01	5,13	0,98
	K	22,77	3,85	5,91
	Ca	0,88	3,67	0,24
CÉLULA 27	Na	6,18	8,55	0,72
	Mg	5,03	8,77	0,57
	P	28,26	5,49	4,18
	S	2,65	4,62	0,48
	Cl	6,72	3,21	1,45
	K	24,38	3,08	7,59
	Ca	1,23		0,4
CÉLULA 28	Na	7,34	9,61	0,76
	Mg	6,2	9,53	0,65
	P	28,55	6,84	4,17
	S	6,84	5,47	1,25
	Cl	5,57	4,51	1,24
	K	21,37	3,48	6,13
	Ca	1,91	3,34	0,57
CÉLULA 29	Na	5,16	8,38	0,62
	Mg	4,55	8,53	0,53
	P	30	6,56	4,57
	S	2,71	5,45	0,5
	Cl	4,2	4,74	0,89
	K	19,48	3,81	5,12
	Ca	0,16	3,64	0,04

Tabla 19

CONTROL MEDIO	CM			
NRO DE CÉLULA	ELEMENTO CPS	BACKGROUND P/B		
CÉLULA 1	Na	2,98	3,25	0,92
	Mg	6,07	3,25	1,87
	P	8,58	3,94	2,17
	S	3,36	3,18	1,06
	Cl	2,89	2,41	1,2
	K	9,76	1,49	6,57
	Ca	2,4	1,39	1,73
CÉLULA 2	Na	3,4	5,16	0,66
	Mg	5,57	5,76	0,97
	P	17,69	6,07	2,91
	S	4,15	4,96	0,84
	Cl	5,84	4,03	1,45
	K	18,1	2,92	6,2
	Ca	0,93	2,77	0,34
CÉLULA 3	Na	2,23	4,43	0,5
	Mg	2,3	4,64	0,5
	P	13,74	3,56	3,87
	S	2,99	2,78	1,08
	Cl	3,97	2,2	1,8
	K	13,35	1,42	9,36
	Ca	0,88	1,36	0,64
CÉLULA 4	Na	4,83	6,64	0,73
	Mg	16,93	6,94	2,44
	P	16,04	6,93	2,31
	S	7,7	5,44	1,42
	Cl	5,77	4,34	1,33
	K	14,96	2,81	5,33
	Ca	9,96	2,67	3,73
CÉLULA 5	Na	2,02	3,2	0,63
	Mg	1,75	3,47	0,5
	P	10,34	2,77	3,74
	S	3,4	2,21	1,54
	Cl	3,35	1,83	1,83
	K	10,51	1,27	8,24
	Ca	0,5	1,21	0,41

Tabla 20

CÉLULA 6	Na	2,41	3,52	0,69
	Mg	5,78	3,58	1,62
	P	10,73	2,81	3,82
	S	4,59	2,34	1,96
	Cl	3,12	2,05	1,52
	K	10,22	1,6	6,41
	Ca	2,98	1,52	1,96
CÉLULA 7	Na	3,74	5,9	0,63
	Mg	9,21	6,47	1,42
	P	17,12	5,36	3,19
	S	6,03	4,2	1,44
	Cl	5,74	3,35	1,71
	K	15,62	2,37	6,6
	Ca	4,57	2,27	2,02
CÉLULA 8	Na	3,34	5,42	0,62
	Mg	9,09	5,37	1,69
	P	16,92	4,07	4,16
	S	5,66	3,38	1,67
	Cl	5,68	2,96	1,92
	K	14,94	2,27	6,6
	Ca	4,58	2,17	2,11
CÉLULA 9	Na	2,01	2,6	0,77
	Mg	3,47	2,91	1,19
	P	8,66	2,3	3,77
	S	3,03	1,83	1,66
	Cl	2,99	1,48	2,02
	K	8,1	1,02	7,94
	Ca	1,5	0,96	1,56
CÉLULA 10	Na	5,9	6,86	0,86
	Mg	14,88	7,53	1,97
	P	16,55	7,45	2,22
	S	7,16	6,08	1,18
	Cl	6,76	4,82	1,4
	K	17,04	2,95	5,77
	Ca	7,28	2,82	2,58

Tabla 21

CÉLULA 11	Na	3,16	3,96	0,8
	Mg	3,66	4,2	0,87
	P	14,92	3,14	4,74
	S	4,24	2,43	1,74
	Cl	4,73	1,91	2,48
	K	14,31	1,35	10,6
	Ca	2,07	1,28	1,61
CÉLULA 12	Na	3,91	6,44	0,61
	Mg	11,23	6,79	1,65
	P	19,24	5,07	3,8
	S	5,47	4,05	1,35
	Cl	6,05	3,34	1,81
	K	19,21	2,3	8,35
	Ca	6,01	2,19	2,74
CÉLULA 13	Na	2,63	3,66	0,72
	Mg	4,01	3,93	1,02
	P	9,59	3,99	2,4
	S	2,98	3,37	0,89
	Cl	3,54	2,51	1,41
	K	11,24	1,54	7,3
	Ca	1,71	1,43	1,19
CÉLULA 14	Na	2,12	3,22	0,66
	Mg	2,05	3,44	0,6
	P	9,4	2,61	3,61
	S	3,14	1,99	1,58
	Cl	2,6	1,68	1,54
	K	8,26	1,5	5,53
	Ca	0,41	1,41	0,29
CÉLULA 15	Na	5,04	7,46	0,68
	Mg	6,83	8,07	0,85
	P	22,29	8,06	2,77
	S	3,21	6,52	0,49
	Cl	7,23	4,78	1,51
	K	21,8	2,6	8,4
	Ca	1,88	2,46	0,76

Tabla 22

CÉLULA 16	Na	6,23	10,92	0,57
	Mg	5,48	11,61	0,47
	P	35,02	9,73	3,6
	S	1,6	7,71	0,21
	Cl	5,26	6,26	0,84
	K	25,27	4,14	6,11
	Ca	1,17	3,92	0,3
CÉLULA 17	Na	2,67	4,29	0,62
	Mg	2,6	4,89	0,53
	P	16,4	5,55	2,95
	S	2,17	4,67	0,46
	Cl	3,22	3,54	0,91
	K	17,06	1,79	9,53
	Ca	1,32	1,72	0,63
CÉLULA 18	Na	7,01	1,11	0,58
	Mg	7,3	12,69	4,39
	P	49,97	11,4	0,07
	S	0,68	9,01	0,07
	Cl	4,36	7,3	0,6
	K	28,44	4,89	5,81
	Ca	0,25	4,64	0,05
CÉLULA 19	Na	9,91	11,97	0,83
	Mg	5,99	13,05	0,46
	P	41,42	12,84	3,23
	S	0	10,03	0
	Cl	7,28	7,99	0,91
	K	30,24	4,88	6,2
	Ca	0,39	4,62	0,08
CÉLULA 20	Na	12,65	5,86	2,16
	Mg	8,78	5,98	1,47
	P	15,34	4,59	3,34
	S	5,61	3,69	1,52
	Cl	5,24	3,07	1,71
	K	7,97	2,29	3,48
	Ca	5,47	2,19	2,5

Tabla 23

CÉLULA 21	Na	5,2	3,92	1,33
	Mg	3,39	4,89	0,69
	P	22,1	4,62	4,78
	S	3,35	4,05	0,83
	Cl	4,9	3,77	1,3
	K	17,27	3,28	5,27
	Ca	0,28	3,14	0,09
CÉLULA 22	Na	5,72	5,53	1,33
	Mg	5,06	6,72	0,69
	P	25,08	5,78	4,78
	S	4,99	4,91	0,83
	Cl	6,41	4,39	1,3
	K	18,78	3,56	5,27
	Ca	2,48	3,39	0,09
CÉLULA 23	Na	7,58	10,35	0,73
	Mg	7,76	11,76	0,66
	P	51,29	9,27	5,54
	S	1,8	7,52	0,24
	Cl	5,12	6,32	0,81
	K	27,64	4,64	5,96
	Ca	1,08	4,41	0,24
CÉLULA 24	Na	6,37	6,3	1,01
	Mg	7,1	6,3	1,13
	P	23,98	4,91	4,88
	S	4	4,07	0,98
	Cl	5,63	3,53	1,6
	K	19,34	2,79	6,95
	Ca	2,32	2,67	0,87
CÉLULA 25	Na	4,44	6,54	0,68
	Mg	3,6	7,09	0,51
	P	21,84	6,65	3,28
	S	2,66	5,23	0,51
	Cl	5,82	4,18	1,39
	K	19,4	2,58	7,52
	Ca	0,68	2,46	0,28

Tabla 24

CÉLULA 26	Na	5,57	10,25	0,54
	Mg	5,27	10,53	0,5
	P	36,96	7,74	4,78
	S	1,87	6,05	0,31
	Cl	5,62	4,81	1,17
	K	25,44	3,16	8,04
	Ca	1,8	3,03	0,6
CÉLULA 27	Na	4,37	4,93	0,89
	Mg	6,1	5,29	1,15
	P	17,93	4,96	3,62
	S	4,23	3,99	1,06
	Cl	5,84	3,33	1,75
	K	18,69	2,29	8,16
	Ca	3,36	2,2	1,53
CÉLULA 28	Na	9,76	8,12	1,2
	Mg	7,69	8,32	0,92
	P	38,26	7,23	5,29
	S	3,94	6,42	0,61
	Cl	9,52	6,05	1,58
	K	29,62	5,32	5,56
	Ca	0	5,09	0
CÉLULA 29	Na	4,84	7,43	0,65
	Mg	4,7	7,95	0,59
	P	24,12	7,88	3,06
	S	1,65	6,79	0,24
	Cl	5,66	5,06	1,12
	K	23,61	3,35	7,05
	Ca	0,85	3,19	0,26
CÉLULA 30	Na	5,9	8,06	0,73
	Mg	4,61	8,99	0,51
	P	24	7,05	3,4
	S	9,27	5,72	1,62
	Cl	6,3	4,8	1,31
	K	19,09	3,56	5,37
	Ca	0,22	3,36	0,07

Tabla 25

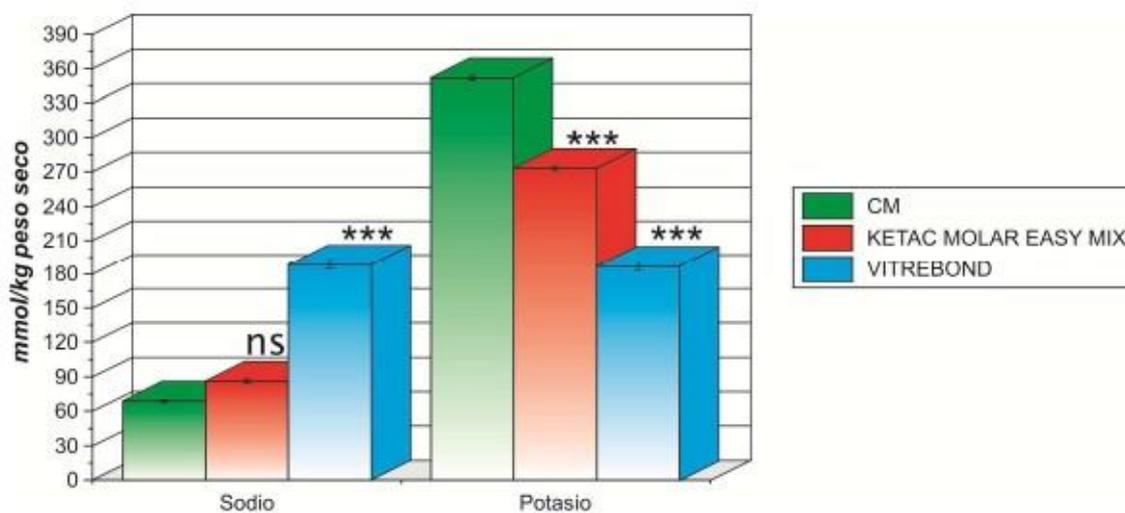
KM	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]
CÉLULA 1	78,83703	153,3549	148,0773	125,235	155,59635	255,32958	235,37073
CÉLULA 2	91,55268	190,90041	120,3993	136,125	157,99014	251,74061	342,09162
CÉLULA 3	74,59848	70,86054	193,05405	107,811	150,80877	307,11329	131,5737
CÉLULA 4	64,42596	93,59937	130,0866	103,45	132,45638	266,6092	148,14224
CÉLULA 5	67,8168	64,51482	214,5045	91,476	93,35781	261,4821	65,78685
CÉLULA 6	59,3397	61,34196	185,4426	80,0415	113,30606	318,90562	74,07112
CÉLULA 7	70,35993	92,54175	219,34815	109,4445	82,18679	231,74492	112,0813
CÉLULA 8	56,79657	56,05386	152,92095	65,34	105,32676	285,06676	78,94422
CÉLULA 9	62,73054	35,95908	260,1732	68,607	88,57023	320,95646	10,72082
CÉLULA 10	75,44619	33,84384	224,1918	59,3505	95,7516	302,4989	5,36041
CÉLULA 11	69,51222	38,07432	147,38535	45,1935	86,17644	271,22359	18,03047
CÉLULA 12	79,68474	139,07703	70,5789	81,1305	87,37851	180,47392	218,80219
CÉLULA 13	197,51643	33,31503	151,53705	31,0365	51,86545	8,20336	5,36041
CÉLULA 14	50,01489	30,67098	160,5324	31,581	72,61163	285,06676	10,72082
CÉLULA 15	67,8168	50,23695	178,5231	78,408	95,7516	228,66866	39,95942
CÉLULA 16	236,51109	32,25741	255,32955	66,9735	236,18728	206,62213	25,82743
CÉLULA 17	271,2672	53,93862	154,30485	34,3035	134,85017	135,35544	38,49749
CÉLULA 18	167,84658	52,35219	263,63295	65,34	193,09906	245,07538	47,26907
CÉLULA 19	118,6794	46,53528	283,6995	42,471	162,77772	286,09218	71,14726
CÉLULA 20	42,3855	51,82338	246,3342	71,874	100,53918	295,32096	42,88328
CÉLULA 21	51,71031	34,37265	220,0401	38,6595	94,15574	321,98188	0
CÉLULA 22	38,14695	20,62359	250,4859	41,382	104,52883	297,3718	0
CÉLULA 23	45,77634	41,24718	227,65155	75,6855	126,87087	362,48597	38,49749
CÉLULA 24	55,94886	50,23695	260,1732	66,429	142,03154	402,99006	32,16246
CÉLULA 25	56,79657	56,58267	188,90235	72,4185	134,85017	311,72768	76,02036
CÉLULA 26	58,49199	30,14217	278,1639	32,1255	78,19714	303,01161	11,6954
CÉLULA 27	61,03512	30,14217	289,2351	26,136	115,69985	389,14689	19,4924
CÉLULA 28	64,42596	34,37265	288,54315	68,0625	98,94332	314,29321	27,77667
CÉLULA 29	52,55802	28,02693	316,22115	27,225	71,01577	262,50752	1,94924

Tabla 28

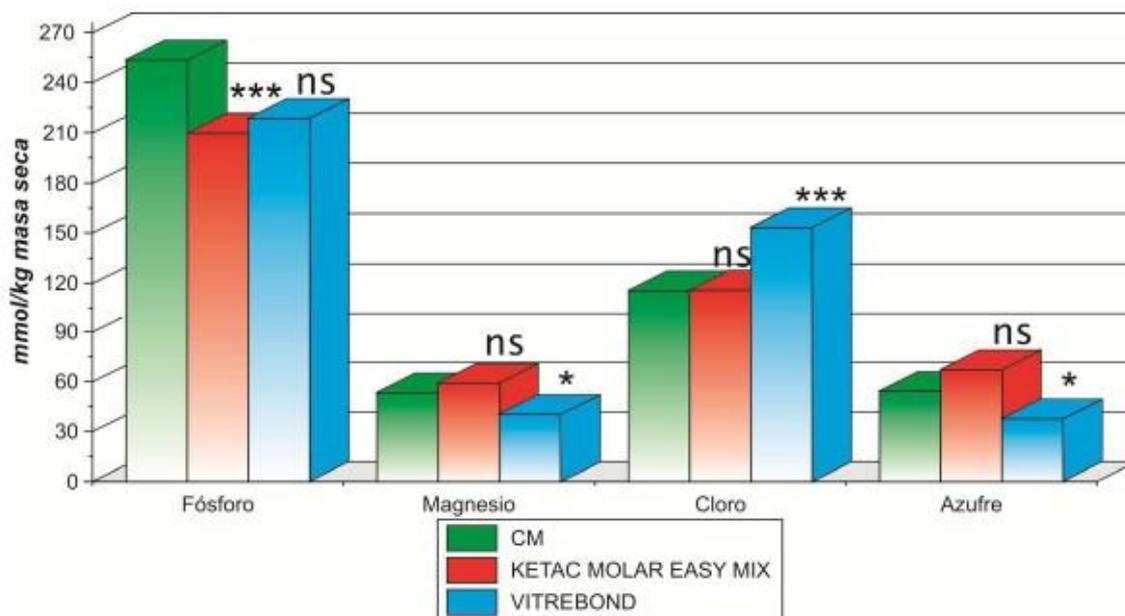
KM	MEDIA	DES	ESTÁNDAR	ERROR ESTÁNDAR
[Na]	85,794098358	0,3050151	6,5801433	
[Mg]	58,862023440	1,162111	1,4617746	
[P]	209,6369960	83048531	73801387	
[S]	67,011051729	810684520	85173384	
[Cl]	115,89245439	937888351	14108252	
[K]	272,72636175	692530112	16264372	
[Ca]	66,559824580	793432222	30838378	

VT	MEDIA	DES	ESTÁNDAR	ERROR ESTÁNDAR
[Na]	187,0330831	13,11450033	23184287	
[Mg]	39,88990122	531014010	64374326	
[P]	218,54087566	087585371	88821672	
[S]	37,2982519	357299150	55306569	
[Cl]	153,12276757	286917041	63676906	
[K]	186,746072132	06525343	77329295	
[Ca]	37,604088361	16670441	74762013	

CM	MEDIA	DES	ESTÁNDAR	ERROR ESTÁNDAR
[Na]	68,071113	26,9986675		0,7713905
[Mg]	53,022016	28,42032361		0,81200925
[P]	253,62274	62,099675		1,77427643
[S]	53,6877	30,83593845		0,88102681
[Cl]	115,407276	32,0732974		0,91637993
[K]	351,18926	78,62952656		2,2465579
[Ca]	52,190901	48,1820112		1,37662889



Gráfica 3. Perfil iónico de fibroblastos gingivales humanos expuestos IVC y a IVH. Las células fueron criofijadas con nitrógeno líquido y criodeseccadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. (ns= $p>0,05$; $\square\square\square=p<0,001$).



Gráfica 4. Perfil iónico de fibroblastos gingivales humanos expuestos IVC y a IVH. Las células fueron criofijadas con nitrógeno líquido y criodeseccadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. (ns= $p>0,05$; $\square\square\square=p<0,001$; $*=p<0,05$).

Tabla 29

Prueba de Kruskal-Wallis

KM vs VT vs CM vs CT	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]
Chi-cuadrado	37,5368	0,2346	7016,393		14,260	25,475	7,419
GI	2222				2	2	2
Sig. asintót.	7,06726E-09	0,018107311	0,096822917	0,000275574	0,00080071	2,9382E-06	0,0244956

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: KM1VT2CM3

Tabla 30

Prueba de Mann-Whitney

KM vs VT[Na]		[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]
128,000U de Mann-Whitney		256,500	401,000	166,000	221,500	285,500	288,000
563,000W de Wilcoxon		721,500	836,000	631,000	656,500	750,500	753,000
-4,655Z		-2,708	-0,516	-4,079	-3,238	-2,267	-2,231
Sig. asintót. (bilateral)	3,23669E-06						
a. Variable de agrupación: KM1VT2CM3		0,006778841	0,606167434	4,52328E-05	0,0012052	0,02338144	0,025690

KM vs CM[Na]		[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]
326,500U de Mann-Whitney		399,500	294,000	377,000	399,500	195,000	432,000
791,500W de Wilcoxon		864,500	729,000	842,000	834,500	630,000	867,000
-1,646Z		-0,538	-2,138	-0,879	-0,538	-3,639	-0,045
Sig. asintót. (bilateral)	0,099766454						
a. Variable de agrupación: KM1VT2CM3		0,590339573	0,032524945	0,379166936	0,59033414	0,00027367	0,9637168

VT vs CM[Na]		[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]
70,000U de Mann-Whitney		309,000	351,000	269,000	230,500	146,000	283,500
535,000W de Wilcoxon		774,000	816,000	734,000	695,500	611,000	748,500
-5,620Z		-2,085	-1,464	-2,676	-3,246	-4,495	-2,463
Sig. asintót. (bilateral)	1,01099E-08						
a. Variable de agrupación: KM1VT2CM3		0,037036873	0,143265149	0,007444476	0,00117097	6,9439E-06	0,0137934

3.4. Resultados del estudio de la citotoxicidad mediante el análisis morfológico utilizando microscopía invertida, fotovideomicroscopía y confocal laser scanning microscopy.

Con el objetivo de evaluar el efecto de los cementos de ionómeros vitreos KM y VT, sobre la morfología de los fibroblastos gingivales humanos, las muestras fueron examinadas mediante la utilización de microscopía invertida, fotovideomicroscopía y confocal laser scanning microscopy, a las 72 horas de exponer las células a los distintos materiales.

3.4.1. Microscopía Invertida.

En la Figura 4 se muestra en un análisis de campo la población de fibroblastos gingivales humanos control. Las células controles, no tratadas, se caracterizan por mostrar una morfología de células como finas prolongaciones aplanadas. Cuando las células son sometidas a la acción de KM se observa en la Figura 5 que en el análisis de campo se evidencian dos poblaciones celulares, una que mantiene las características de las células control, es decir, finas prolongaciones aplanadas, y un segundo grupo celular, que se caracteriza por mostrar una morfología totalmente esférica. Por otra parte, cuando se evaluó la acción de VT sobre los fibroblastos gingivales humanos, en el análisis de campo se observa que la única población celular presente se caracteriza por formas esféricas (Figura 6).

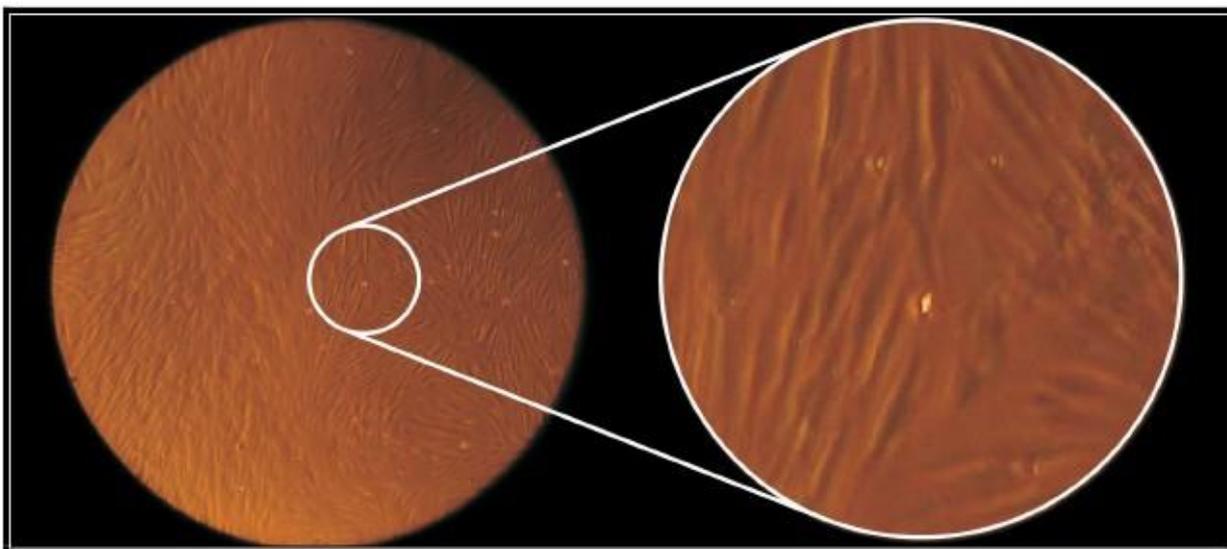


Figura 4. Células del Grupo Control: Se observa células fibroblásticas como finas prolongaciones aplanadas.

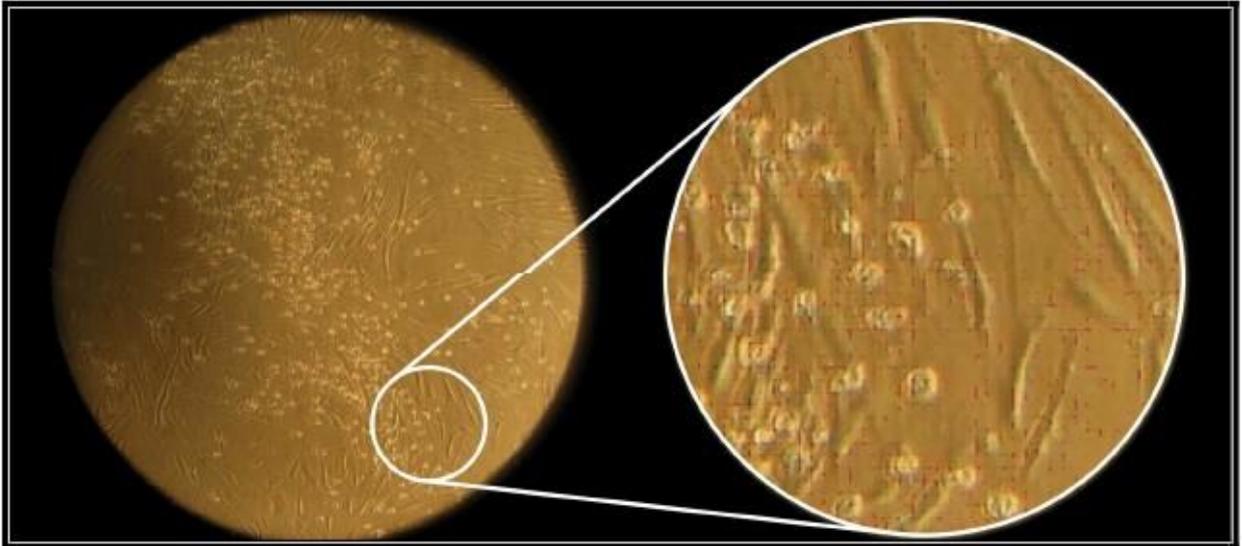


Figura 5. Ketac Molar. Se observa la presencia de dos poblaciones celulares, una en forma de finas prolongaciones aplanadas y un segundo grupo con morfología esférica.

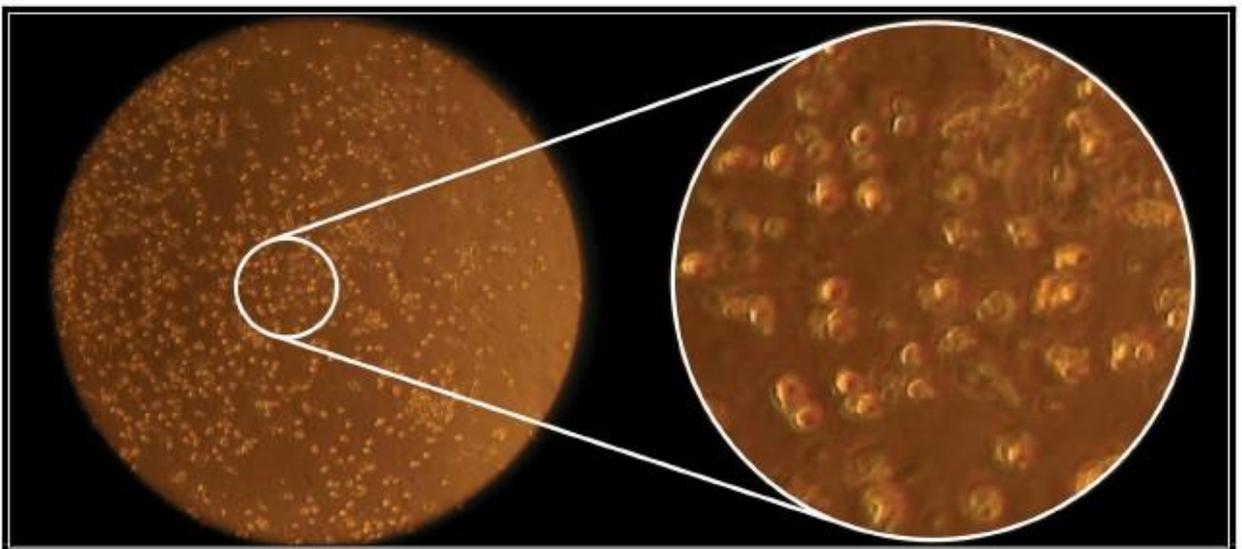


Figura 6. Vitrebond. Se observa una única población celular que se caracteriza por formas esféricas.

3.4.2. Fotovideomicroscopía

La evaluación de las células fibroblásticas con fotovideomicroscopía, no genera imágenes de la producción de fibras colágenas, sin embargo se pudieron observar cambios estructurales en la histomorfología de las células sometidas a la acción de los diferentes ionómeros vítreos, (IVC, IVH).

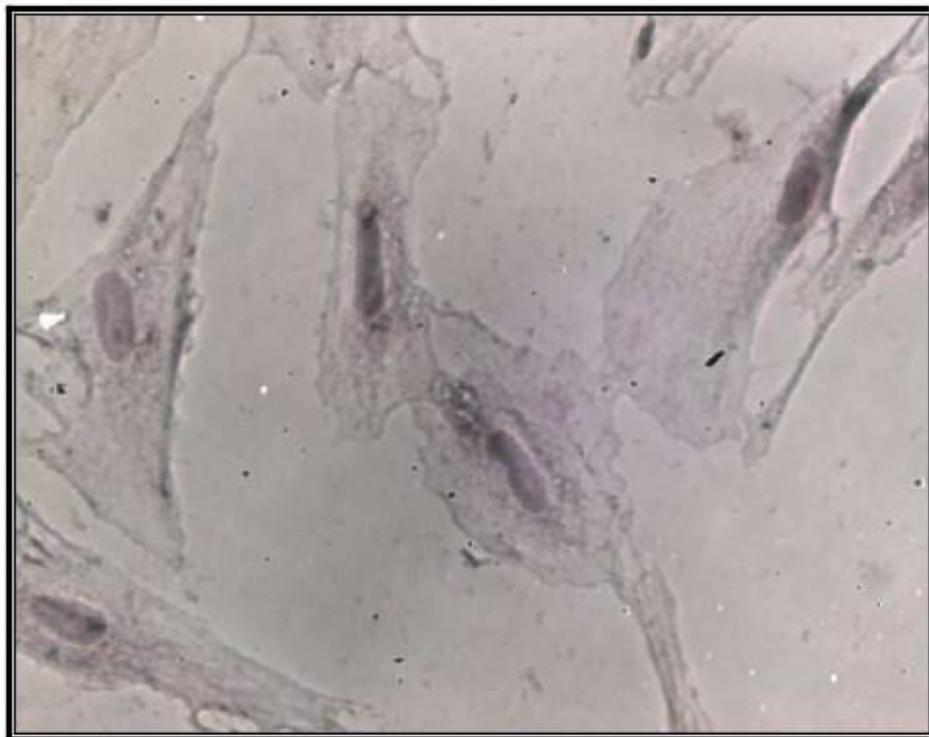


Figura 7. Células fibroblásticas normales expuestas al medio de cultivo, donde se observa la morfología alargada, o triangular con su núcleo y citoplasma, con continuidad de su membrana celular.

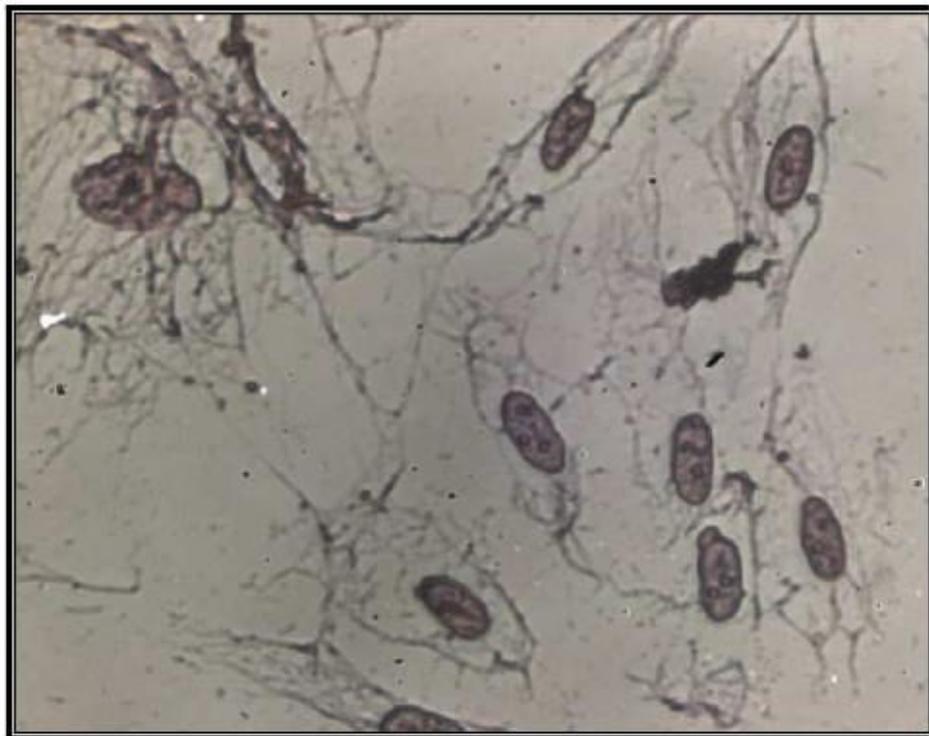


Figura 8. Fibroblastos expuestos al control positivo Tritón X. Se observan las células con su núcleo y alteraciones citoplasmáticas. Nótese la discontinuidad en la membrana celular.



Figura 9. Célula fibroblástica de forma alargada con núcleo exéntrico y nucléolo visible, con continuidad en su membrana celular, expuesta a Ketac Molar (IVC).



Figura 10. Fibroblastos sometidos a la acción de Vitrebond (IVH). Las células son alteradas en su histomorfología, con cambios en su composición electrolítica, ruptura de la membrana plasmática y muerte celular.

3.4.3 Confocal Laser Scanning Microscopy

Al evaluar las células controles con confocal laser scanning microscope, se observa en las Figuras 11 a 15 que las células presentan un núcleo que aparece como una estructura discoide o alargada que a veces contiene un nucléolo evidente. El citoplasma por su parte permite describir células con formas alargadas, triangulares ligeramente estrelladas.

3.4.3.a) Control Medio

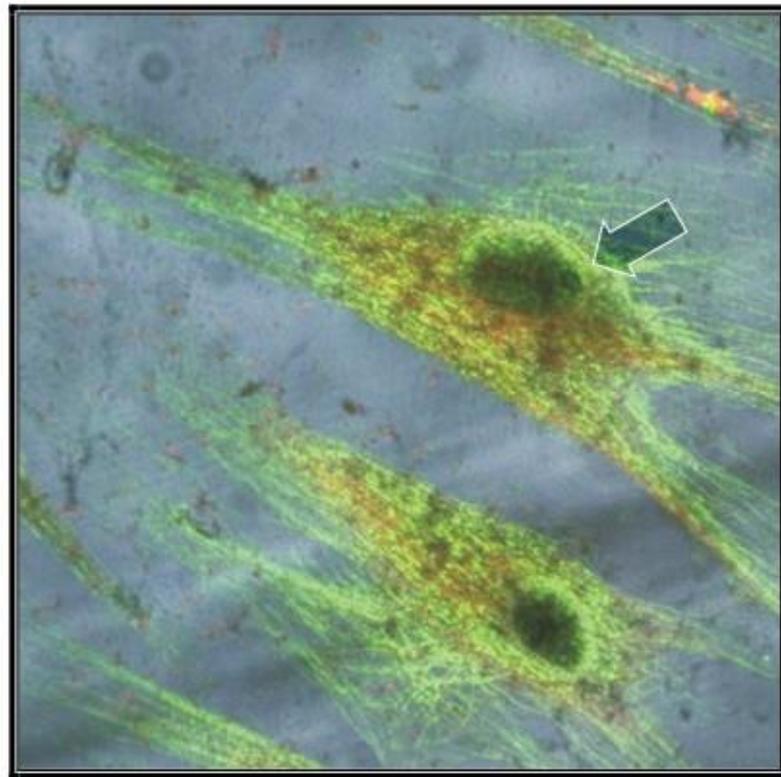
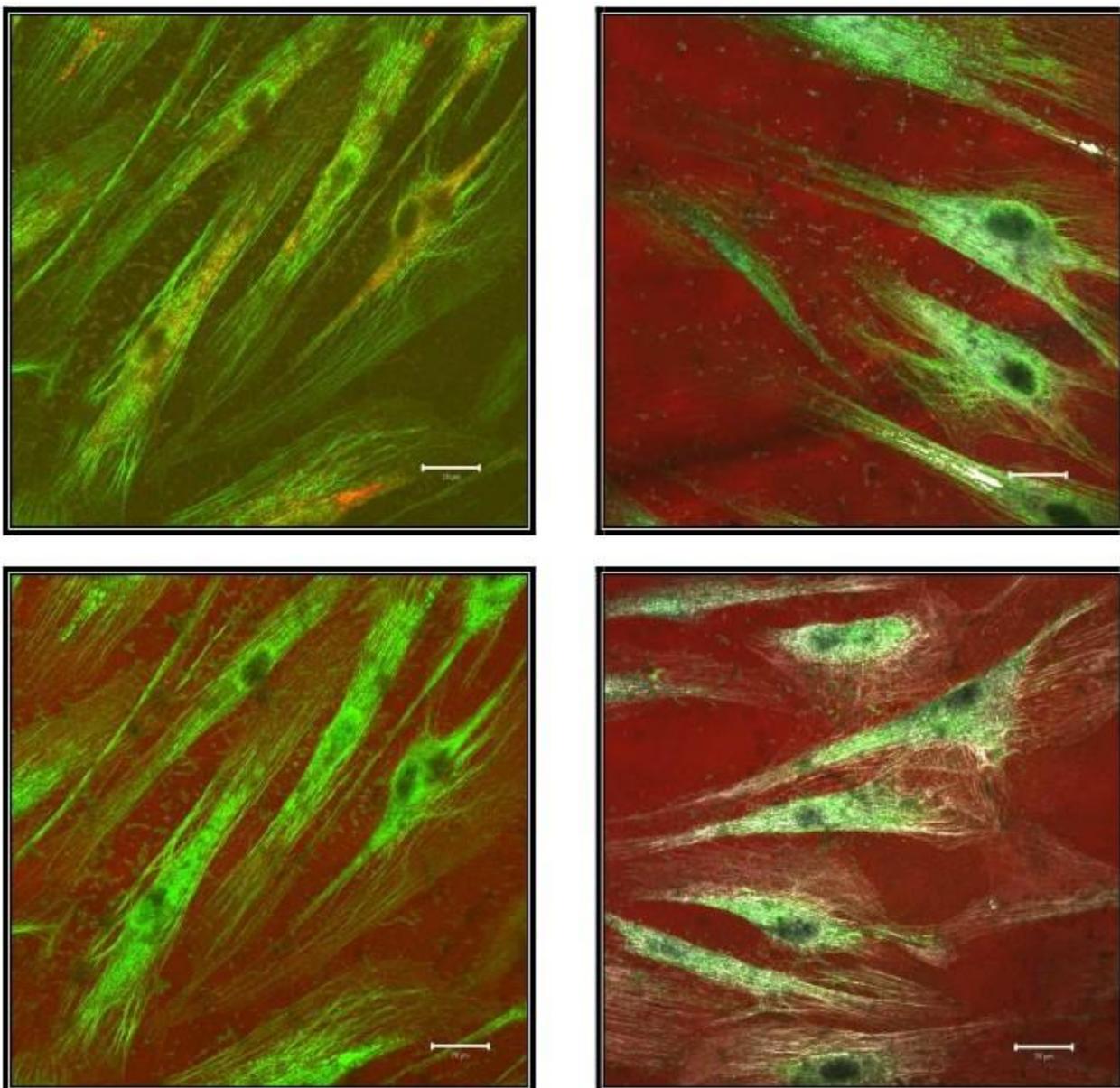


Figura 11. Célula fibroblástica de forma estrellada con el nucleolo evidente.



Figuras 12, 13, 14 y 15. Células fibroblásticas normales con su citoplasma en forma alargada, triangular y ligeramente estrelladas, donde pueden observarse la producción de numerosas fibras colágenas.

Por otra parte las células expuestas a KM en las Figuras 16 a 23 muestran la presencia de dos tipos celulares, observándose en ambos la presencia de núcleos de forma discoide o alargados, mientras que a nivel citoplasmático un grupo se caracteriza por describir células con formas alargadas (Figura 21) y en ocasiones ligeramente estrelladas, y el otro se caracteriza por presentar citoplasmas que refieren formas ovoidales (Figura 22). También se evidencian en algunas células, a este nivel, la presencia de vacuolas citoplasmáticas.

3.4.3.b) IVC

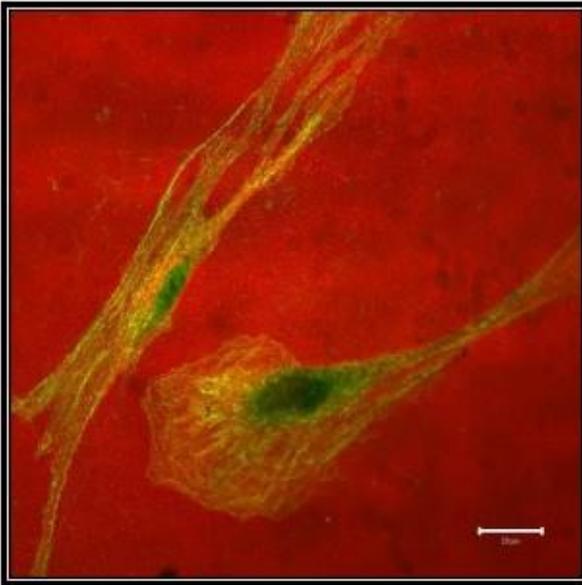


Figura 16. Se observa en algunas células fibroblásticas una disminución en la producción de fibras colágenas.

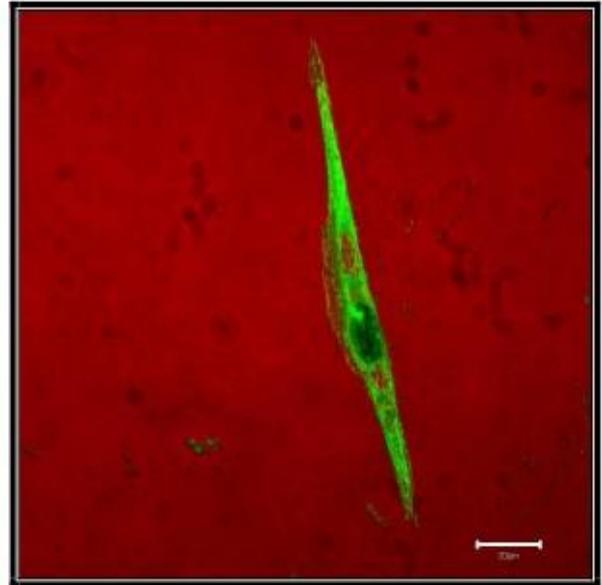


Figura 17. Se observan varias vacuolas en el citoplasma con disminución de fibras colágenas.

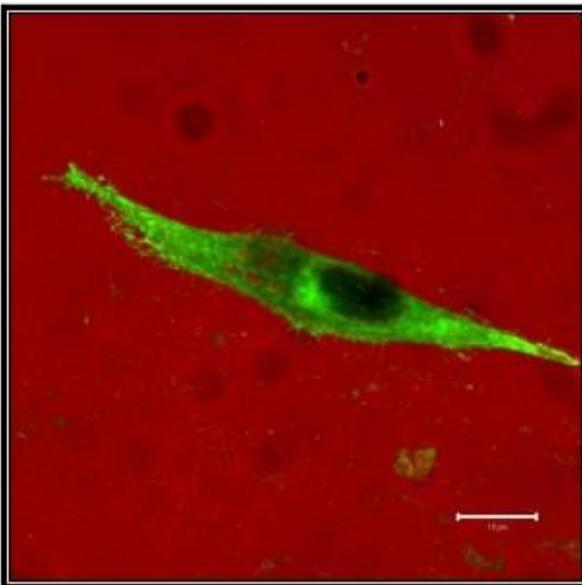


Figura 18. Fibroblastos gingivales sometidos a ionómero vítreo convencional, donde se observa la presencia de vacuolas con disminución de fibras.

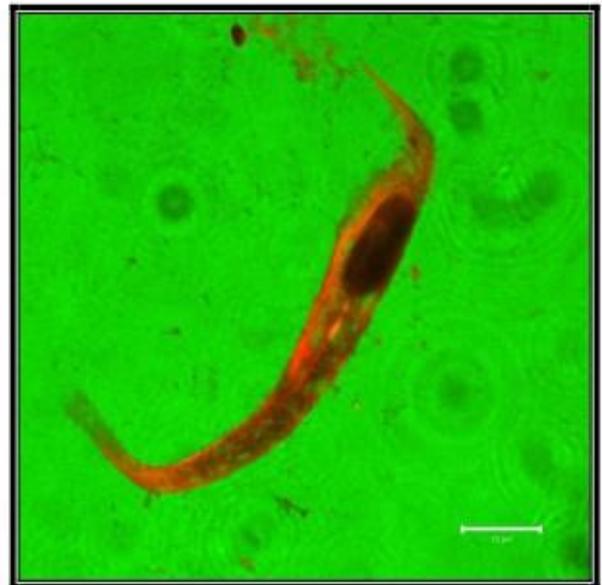


Figura 19. Fibroblasto con presencia de numerosas vacuolas citoplasmáticas. No se evidencia ruptura de la membrana celular.

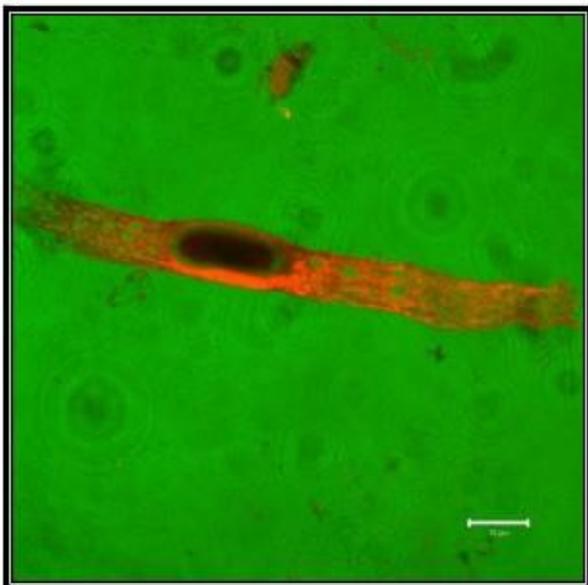


Figura 20. Célula fibroblástica alargada con núcleo exéntrico y vacuolas citoplasmáticas. Nótese la continuidad de la membrana celular.

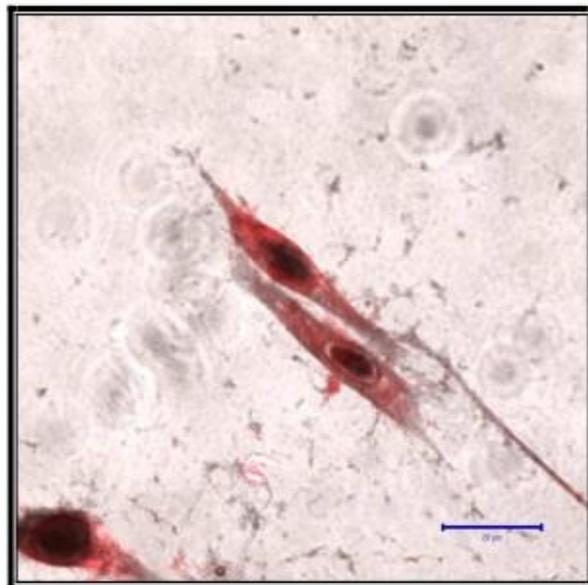


Figura 21. Células fibroblásticas alargadas con vacuolas citoplasmáticas y continuidad en la membrana celular.

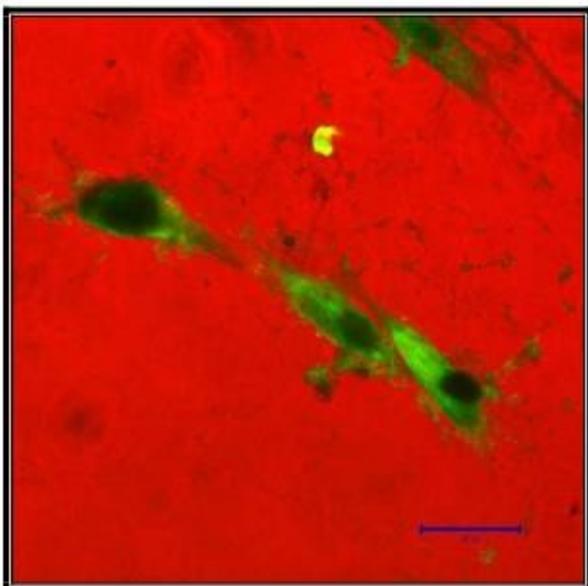


Figura 22. Células fibroblásticas de forma ovoidal.

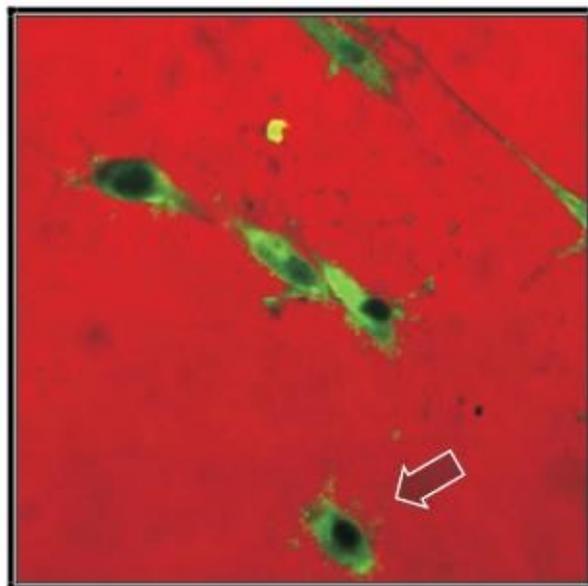


Figura 23. Célula fibroblástica de forma esférica.

Cuando se valoran las células expuestas a VT se observa que los cambios más representativos con respecto a las células control se ponen de manifiesto a nivel citoplasmático, cambios en la forma y evidenciando un marcado detrimento en el volumen del citoplasma celular, adquiriendo formas esféricas, ovoidales con una importante cantidad de vacuolas (Figuras 24 a 28).

3.4.3.c) IVH



Figura 24. Acción de Vitrebond sobre las células fibroblásticas. Desintegración del citoplasma con escasa producción de fibras colágenas.



Figura 25. Acción de Vitrebond sobre el citoplasma, nótese la desintegración del núcleo y del citoplasma con escasa producción de fibras.

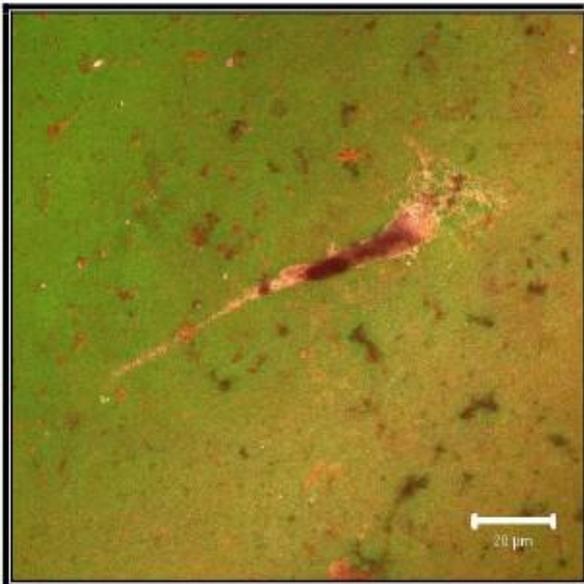


Figura 26. Destrucción del citoplasma con ruptura de la membrana celular.

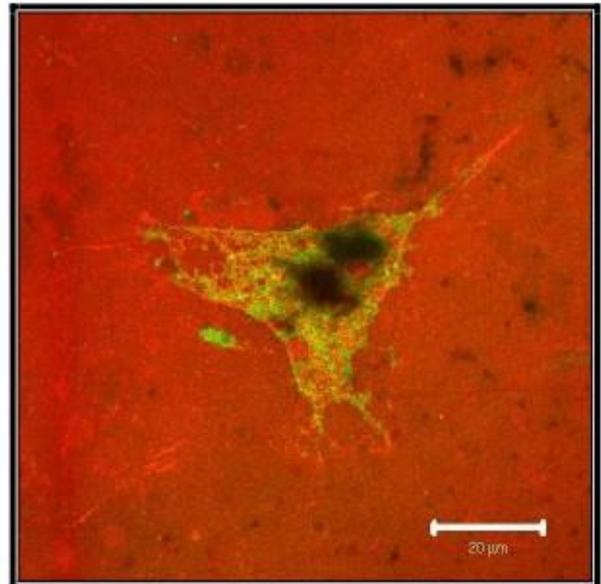


Figura 27. Daño en las células fibroblásticas evidenciado por la ruptura de las membranas nuclear y citoplasmática, presencia de vacuolas y muerte celular.

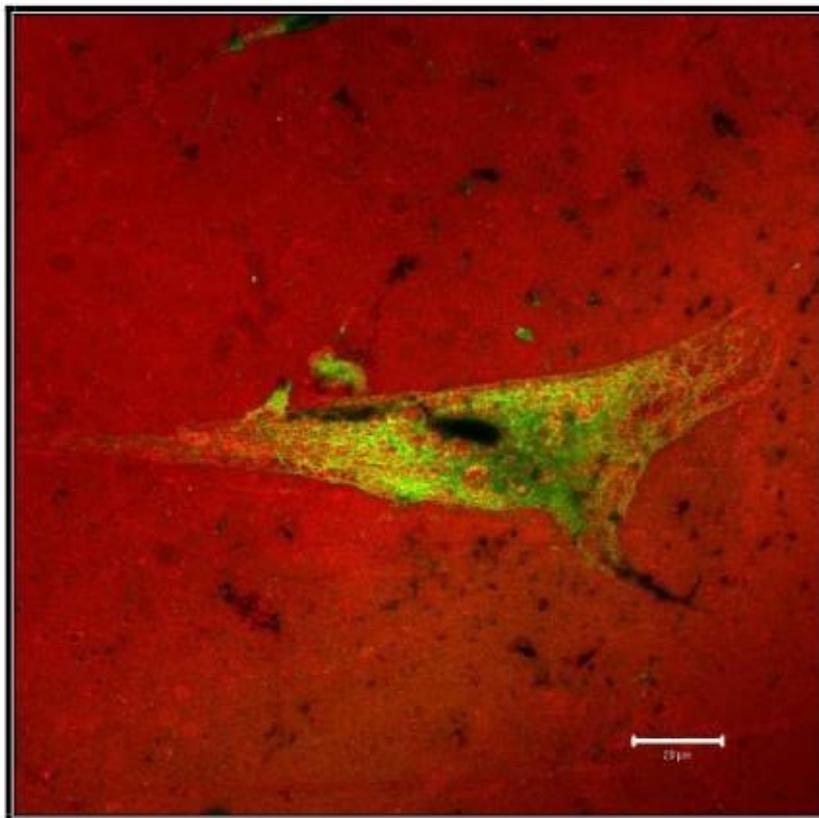


Figura 28. Muerte celular por modificación de la bomba de Na-K y otros electrolitos que se evidencia en la histomorfología, presencia de vacuolas intracelulares, ruptura de la membrana plasmática y deterioro de la membrana nuclear. Nótese la ausencia en la producción de fibras colágenas .

4. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los cementos de ionómero de vidrio, tanto convencionales (IVC) como los modificados con resinas (IVH), son materiales muy utilizados en la clínica odontológica ya que tienen la propiedad de adherirse a las estructuras dentarias (Edelberg 2003). Sin embargo, la lenta reacción de endurecimiento ácido-base y la sensibilidad a la humedad de los ionómeros convencionales, estimuló a los investigadores a mejorarlos, y así surgen los ionómeros vítreos modificados con resinas, mejorando sus propiedades y logrando el endurecimiento por reacción ácido-base y por polimerización. Los ionómeros vítreos modificados con resina tienen en su composición distintos monómeros hidrófilos e hidrófugos entre los que destaca el 2-Hidroxietilmetacrilato (HEMA), que parecería ser uno de los responsables de distintas reacciones adversas a nivel de la biocompatibilidad pulpar.

En este sentido, los estudios existentes en relación a la compatibilidad biológica de los cementos de ionómero vítreo en general, son controversiales (Oilo, 1991). Se destacó en el capítulo de introducción la valoración de la biocompatibilidad de estos materiales dependía de si la metodología utilizada era “in vivo” o “in vitro”.

Holland et al. (1978) en una experiencia realizada en perros, al estudiar el ionómero convencional ASPA, demostró que la mayoría de las muestras presentaban una reacción inflamatoria pulpar leve en un período experimental de 180 días. Por su parte, Tobías et al. (1978) utilizando el mismo producto en una experiencia realizada en ferrets observó una reacción pulpar inflamatoria en la mayoría de los especímenes en un período corto (14 días), pero a los 28 días en la mayoría de los especímenes fue camino a la resolución, y en 1 año el proceso volvió a la normalidad. Continuando con la investigación, en la utilización de este material se le adicionó el acondicionamiento dentinario con ácido cítrico al 30% durante 30 segundos y las reacciones inflamatorias fueron mayores. Según los autores (Tobías et al. 1978), ésto se debería a una mayor penetración de los productos tóxicos del material debido al aumento de la permeabilidad dentinaria o a la irritación adicional causada por el ácido. En trabajos de experimentación sobre dientes de ratas utilizando Fuji IX (IVC), Six et al. (2000) hallaron que en un periodo corto de 8 días se produjo una reacción inflamatoria moderada, y al final de los 30 días el proceso

fue a la resolución. Costa et al. (1996) demostraron que los ionómeros vítreos modificados con resina (IVH) y colocados en cavidades profundas de clase 5 en ratas en períodos de experimentación cortos (3 a 7 días) originaban una reacción inflamatoria leve, proceso que fue a la resolución entre los 14 y 30 días, razón por la cual afirmaba que estos materiales tienen una aceptable compatibilidad biológica siendo irritantes discretos para el complejo dentinopulpar. Souza et al. (2006) cuando valoró diferentes IVH (Rely X Luting cement, Vitremer y Vitrebond) sobre tejido celular subcutáneo de ratas, observó que a los 7 días aparecía una moderada a intensa reacción inflamatoria que disminuía con el tiempo llegando a los 90 días a encontrarse un tejido conectivo sin signos inflamatorios. En este caso el autor justifica el proceso inflamatorio inicial a diferentes factores irritantes. En primer lugar destaca como responsable de dicha inflamación al trauma quirúrgico que supone la implantación de los ionómeros en el tejido celular subcutáneo. En segundo lugar que esta situación de inflamación se mantiene por la lenta reacción de endurecimiento ácido-base de los ionómeros utilizados, lo cuales generan un bajo pH en la zona. Y por último considera al monómero resinoso HEMA como responsable de la respuesta inflamatoria a distancia del sitio de implantación del material. En esta investigación el autor destaca que la intensidad y el área de inflamación inicial disminuyen a los 90 días, y esto lo justifica en que el edema adyacente a los materiales neutraliza la toxicidad del bajo pH. Por otro lado, en el caso del monómero HEMA, al ser éste de bajo peso molecular, puede ser removido fácilmente por el drenaje linfático existente en el tejido. Todo ello entonces permitiría obtener a los 90 días un tejido conectivo saludable.

Costa et al. (2003) realizó un ensayo “in vitro” para evaluar la citotoxicidad de 3 cementos de ionómeros vítreos modificados con resinas (IVH) (Vitrebond, Vitremer y Fuji II LC) y 2 ionómeros vítreos convencionales (IVC) (Fuji IX GP y Ketac Molar) sobre células odontoblastoides (MDPC-23). El autor demostró que a las 72 horas de realizada la evaluación con el método de MTT todos los materiales fueron citotóxicos, aunque los IVC fueron los menos citotóxicos. En sentido, Costa acuerda con Oliva et al (1996) al demostrar este que los IVC son menos citotóxicos para las células osteoblásticas que los IVH.

Estos datos científicos son explicados por Soheili et al. (2003) al demostrar que la citotoxicidad de algunos ionómeros vítreos convencionales es atribuible a las

pequeñas cantidades de aluminio y a otros iones metálicos presentes en su composición. Ésto, explica el autor, causaría los efectos citotóxicos, en las células cultivadas, por stress oxidativo. Stanislawski et al. (1999) identificó la liberación de iones flúor, aluminio y estroncio en baja concentración en los IVC. Además destaca que el zinc fue encontrado en alta concentración y por tanto lo considera el responsable máximo de la citotoxicidad. Por otro lado, Chan y Chou (2001) mostraron que en un ambiente húmedo aumenta la presencia del flúor, el cual alteraría el metabolismo celular interfiriendo con la síntesis de ADN.

Palmer et al. (1999) destaca que los responsables de la citotoxicidad de los IVH serían el monómero HEMA y los productos de descomposición del iniciador (DPICI). En este sentido el autor evaluó el porcentaje de liberación de HEMA de los ionómeros Vitrebond y Vitremer encontrando mayor liberación en el caso de éste último. El autor considera que esto sucede porque el fabricante exige menos cantidad de polvo en su preparación. Leyhausen et al. (1998) destaca que Vitrebond es extremadamente citotóxico y lo atribuye a los productos de descomposición del iniciador (DPICI).

En esta línea, Souza et al. (2006) evaluaron los efectos de Rely X, Vitremer y Vitrebond (IVH) sobre células odontoblastoides a las 24, 48 y 72 horas. Observaron que a mayor tiempo mayor toxicidad porque a las 48 horas se produce la mayor liberación de los productos tóxicos. Sin embargo, destaca que a las 72 horas Rely X fue el menos citotóxico debido a el papel que juega el persulfato de potasio (iniciador químico de la reacción redox), presente en su formulación, y por tanto ayuda a disminuir la cantidad de monómeros residuales en el producto de polimerización final que son los responsables de la toxicidad. Melo de Mendonça et al. (2007) cuando estudió al Rely X Unicem destacó que a las 24 horas sobre las células odontoblastoides no se observaron efectos citotóxicos, sin embargo se incrementaron notablemente a los 7 días. Los monómeros presentes en su composición como el BisGma y TEGDMA han sido considerados por distintos autores (Ratanasathien et al., 1995; Hanks et al., 1991) más citotóxicos que HEMA. La demora en la citotóxicidad se fundamenta, según el autor, por la presencia del persulfato de potasio en su composición.

Se ha descrito que los monómeros metacrílicos presentes en materiales basados en resinas como Vitrebond, Vitremer, y Z100 son incorporados, y

solubilizados en la bicapa lipídica de la membrana celular (Fujisawa et al., 2003). Este fenómeno es causa de alteración celular y consecuentemente muerte celular y el responsable del alto efecto citotóxico demostrado por los materiales basados en resina cuando se compararon con Ionómeros Vítreos Convencionales. (Lan et al., 2003; Lonroth y Dahl, 2001).

Si bien los efectos citotóxicos “in vitro” no son extrapolables a la clínica (Costa et al., 1999, 2000), Craig (1997) informa que los test iniciales son recomendados por ANSI/ADA para evaluar correctamente muerte celular, inhibición del desarrollo celular y otros efectos causados sobre los cultivos celulares por materiales experimentales. En este sentido, Becher et al. (2006) recomienda que establecer el patrón de muerte celular sería importante para evaluar la biocompatibilidad de los materiales dentales. De los trabajos expuestos con anterioridad, y de los resultados obtenidos por los diferentes autores al investigar con distintos protocolos la acción citotóxica de los cementos de ionómeros de vidrio convencionales y modificados con resina, no se evidencia con claridad cual es el mecanismo de muerte celular inducida por estos materiales, es por ello que surge la necesidad de seguir con las investigaciones en este campo.

En este trabajo y con el objeto de evaluar la citotoxicidad de los ionómeros de vidrio hemos utilizado como modelo experimental los fibroblastos gingivales humanos extraídos mediante biopsia. Las líneas celulares que se han utilizado en estudios experimentales de citotoxicidad de sistemas adhesivos dentales han sido de distinta naturaleza y origen, destacando entre ellas a los fibroblastos de ratón 3T3 (Ratanasathien et al., 1995), las células odontoblastoides MDPC-23 (Costa et al., 1999), L929 (Kanga et al., 2001), células pulmonares A549 y L2 (Kehe et al., 2001), células de pulpa humana (Spagnuolo et al., 2004a) y la línea celular monoblástica humana U937 (Cimpan et al., 2000; Rodríguez, 2005). En este trabajo se seleccionaron a los fibroblastos gingivales humanos porque constituyen un modelo experimental idóneo para evaluar citotoxicidad de distintos sistemas adhesivos dentales ya que permite, tal como lo ha demostrado Issa (2004) y López González (2006), realizar determinaciones morfológicas y bioquímicas con un importante grado de fiabilidad. Por otra parte, otras dos razones justifican el uso de los fibroblastos gingivales humanos. Por un lado la singularidad de dichas células, caracterizadas por su alta sensibilidad en la respuesta a fármacos y otras sustancias

(Ferraris y Campos, 2002; Geurtsen et al., 1998; Lekic et al., 1997; Ratanasathien et al., 1995) y por otro lado, por la posibilidad de comparar los ensayos bioquímicos de citotoxicidad efectuados en dicho modelo (Issa et al., 2004) con los datos microanalíticos que resultan de aplicar la metodología microscópica microanalítica cuantitativa desarrollada en el grupo de investigación en ingeniería tisular del departamento de Histología de Medicina de Granada (Arrebola et al., 2005; 2006; Fernández et al., 1997b; 1999a; 1999b).

Con la finalidad de evaluar la citotoxicidad de los cementos de ionómeros de vidrio en fibroblastos gingivales humanos, en el presente trabajo se ha desarrollado un protocolo que consiste en determinar 4 tipos de indicadores:

El primer indicador utilizado para evaluar la citotoxicidad de ionómeros de vidrio en los fibroblastos gingivales humanos ha sido el análisis morfológico mediante la utilización de la microscopía óptica invertida y confocal laser scanning microscope. En este estudio se pudo observar que la población de células controles se caracterizaba por mostrar una morfología de células que presentan un núcleo que aparece como una estructura discoide o alargada que a veces contiene un nucléolo evidente. El citoplasma por su parte permite describir células con formas alargadas y en ocasiones ligeramente estrelladas. Cuando las células eran sometidas a la acción de KM se observaba dos poblaciones celulares, una que mantenía las características de las células control, es decir, finas prolongaciones aplanadas, y un segundo grupo celular, que se caracterizaba por mostrar una morfología totalmente esférica y la presencia de vacuolas citoplasmáticas. Por otra parte, cuando se evaluó la acción de VT se evidenciaba una única población celular presente que se caracterizaba por células con formas esféricas y a su vez una importante cantidad de vacuolas citoplasmáticas.

Nuestras observaciones coinciden con Costa et al. (2003) quienes observaron con microscopía electrónica de barrido alteraciones que se caracterizaban por la presencia de células odontoblastoides con formas redondeadas y con ruptura de las membranas plasmáticas, cuando eran sometidas a la acción de IVH (Vitremmer, Vitrebond y Fuji II LC). Sin embargo, cuando analizaron IVC (Fuji IX y Ketac Molar) observaron un grupo de células de formas similares a las controles aunque con un menor número de células adheridas al soporte. Rodríguez (2005) mostró con microscopía electrónica de transmisión en células tratadas con el sistema adhesivo

Single Bond (3M) que en el transcurso de 2 horas las células U937 mostraban un incremento rápido y notable de volumen, configurando una imagen esferoideal que finalmente desaparecía tras la desintegración de la membrana plasmática. Las mitocondrias comenzaban a mostrar desde las primeras fases, signos de tumefacción y progresivamente dilataciones y ruptura de sus crestas. Asimismo se observaban dilataciones a nivel del retículo endoplásmico. La presencia de “blebs” era ocasional y poseían muy escaso volumen. Todo lo descrito, según el autor, permitía indicar la existencia de un mecanismo de muerte celular por necrosis oncótica. El autor también valoró las alteraciones ultraestructurales de las células tratadas con HEMA mostrando un significativo desarrollo de los “blebs”, sin que se modifique el tamaño celular en relación con los controles. No existían alteraciones significativas de las organelas celulares hasta la última fase del proceso de muerte celular. La fase final era semejante a la de Single Bond (3M). Todas las alteraciones evidenciadas permitieron mostrar la existencia de un mecanismo de muerte celular híbrido que el autor lo definía como un proceso de muerte celular de necrosis por oncoapoptosis.

El segundo indicador utilizado para evaluar la citotoxicidad de los ionómeros de vidrio en los fibroblastos gingivales humanos ha sido la liberación de LDH en el medio de cultivo. La Lactato Deshidrogenasa es una enzima citoplasmática estable que se almacena en células viables. Un aumento en los niveles de LDH en el medio de cultivo indica que la estabilidad de las membranas se ha visto dañada posiblemente por alteraciones oxidativas (Thomas et al., 1993; Yildiz et al., 1999). Es importante señalar que, como ha demostrado Marc (1991), para un determinado tipo celular en determinadas condiciones de cultivo, los niveles de LDH son constantes. En el presente trabajo se observa que la liberación de LDH, cuando se evalúa VT, fue significativamente mayor con respecto al control y a KM. Cuando se valoró KM, se observó que también se produce liberación de LDH que fue mayor y estadísticamente significativa con respecto al control. Estos resultados estarían indicando que VT a las 72 horas sería el producto más tóxico para los fibroblastos gingivales humanos. Este comportamiento de mayor toxicidad se fundamentaría en la presencia del monómero HEMA en la composición de VT. En este sentido, López González (2006) valoró la liberación de LDH al medio de cultivo cuando fibroblastos gingivales humanos eran sometidos a la acción de HEMA y demostró que existe una

liberación progresiva de esta enzima que estaría vinculada significativamente al incremento en las concentraciones de HEMA. En relación a la liberación de LDH vinculada a la acción de KM, los resultados del presente trabajo acordarían con Soheili ME et al. (2003) quien indica que pequeñas cantidades de partículas de aluminio y otros iones metálicos presentes en estos materiales serían los responsables de la citotoxicidad. Los resultados reflejan que los ensayos de LDH son, en general, un buen indicador de toxicidad celular.

El tercer indicador utilizado para evaluar la citotoxicidad de los cementos de ionómero de vidrio en fibroblastos gingivales humanos ha sido la liberación de ADN al medio de cultivo. Resulta evidente que la liberación de ADN es un indicador que exige la destrucción de la envoltura nuclear y por tanto la alteración no sólo del citoplasma sino del núcleo celular. Las determinaciones obtenidas en el presente trabajo ponen de relieve que existe una mayor liberación de ADN en las células expuestas a VT, que es estadísticamente significativa, con respecto al control y a KM. En el caso de KM se observó que también los niveles de ADN en el medio de cultivo son mayores que en los casos controles. Siguiendo con el razonamiento que expuesto en las pruebas de LDH, la liberación de ADN estaría vinculada significativamente a la presencia de HEMA en los materiales utilizados en los ensayos. Asimismo López González (2006) destaca que existe una liberación progresiva de ADN vinculada al incremento de las concentraciones de HEMA.

El cuarto indicador utilizado para evaluar la toxicidad de los cementos de ionómero de vidrio en fibroblastos gingivales humanos ha sido la microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X. Esta técnica permite el análisis cualitativo y cuantitativo del perfil iónico de una muestra biológica de forma simultánea a su observación. A este respecto, existe un amplio número de técnicas analíticas para estimar el contenido de los elementos inorgánicos en los especímenes biológicos como la espectrografía por absorción atómica y la fotometría de llama. Estas técnicas, además de requerir un número elevado de células, tan sólo consideran uno o dos cationes simultáneamente. Asimismo, el empleo de métodos electrofisiológicos o fluorimétricos mediante el uso de indicadores fluorescentes específicos para iones (Fura – 2, Fluo – 3, SBFI) a fin de evaluar las actividades de los diferentes iones, no proporciona información sobre la localización subcelular debido a su baja resolución microscópica. El microanálisis

por energía dispersiva de rayos X permite sin embargo el análisis simultáneo de todos los cationes y aniones ($Z \delta 11$) presentes en el espécimen irradiado por el haz de electrones y requiere tan solo un número de células pequeño. En los últimos años el grupo de investigación en Ingeniería Tisular de Granada, desarrolló un procedimiento técnico para analizar células completas en cultivo, de crecimiento en monocapa y en suspensión, para microanálisis por energía dispersiva de rayos X mediante microscopía electrónica de barrido, con el objetivo de examinar el papel de los diferentes elementos (Na, Mg, P, S, Cl y K) en distintas condiciones experimentales (Fernández-Segura et al., 1997a; 1997b; 1999a). Este procedimiento consta básicamente de tres fases: 1) adaptación de las células sobre un soporte sólido, 2) eliminación del medio extracelular que puede interferir con el espectro de rayos X procedente de la célula y 3) criopreparación de los especímenes. La principal ventaja de adaptar y/o cultivar las células directamente sobre un soporte sólido radica en la posibilidad de analizar las células tras diferentes condiciones experimentales, sin la intervención de procedimientos intermedios (tratamientos enzimáticos), que pueden ocasionar daños en la membrana celular causando alteraciones en su permeabilidad y originando cambios en la composición elemental de las mismas (Warley et al., 1994a). Los soportes utilizados, hasta el momento presente, han sido muy diversos – cubreobjetos de vidrio y plástico, discos de grafito y rejillas (Au, Ti) de microscopía electrónica recubiertas con películas plásticas (fomvar, pioloform)-, para favorecer la adhesión celular (Von Euler et al., 1993; Warley et al., 1994b). Por otro lado, la eliminación del medio extracelular es fundamental para evitar que interfiera en el microanálisis de las células. Esta eliminación debe realizarse previamente al proceso de criopreparación mediante el lavado de las células con soluciones lavadoras, las cuales deben eliminar de una forma efectiva el medio de cultivo, no deben interferir con el análisis y no deben alterar la permeabilidad de la membrana plasmática o causar alteración y redistribución de la composición iónica intracelular (Warley et al., 1997; Zierold et al., 1988). Diferentes grupos de investigación han demostrado, que el agua destilada a 4°C constituye, desde el punto de vista morfológico y microanalítico, la solución lavadora más efectiva (Fernandez-Segura et al., 1997a) ; Roomans, 1991 ; Warley et al., 1994b) solución ésta que fue utilizada en el presente trabajo. La aplicación del microanálisis por energía dispersiva de rayos X requiere que el material biológico sea tratado de manera que se reduzca o se evite la pérdida y/o redistribución de los

diferentes elementos iónicos. A este respecto, los métodos convencionales de preparación de muestras biológicas para microscopía electrónica y que tiene por base la utilización de fijadores químicos, la deshidratación, la inclusión en material plástico, la polimerización a temperaturas altas y el ultracorte, no constituyen un procedimiento adecuado para preservar la integridad del contenido de los elementos a analizar. Por el contrario, las técnicas de criopreparación constituyen, en la actualidad, los métodos ideales para el estudio de la composición elemental, y muy especialmente de los elementos difusibles, de células y tejidos, mediante técnicas microanalíticas (Fernandez Segura, 1999b; Warley, 1997 ; Warley y Skepper, 2000 ; Zierold et al., 1988). Las células aisladas y en cultivo, constituyen los especímenes biológicos mas adecuados para llevar a cabo los procedimientos de criopreparación. Esta característica radica en el pequeño tamaño de las muestras, que permite un procesamiento con escaso número de artefactos analíticos debido sobre todo a la escasa aparición y grado de extensión de los cristales de hielo.

En esta tesis doctoral se utilizó el método de la razón pico/fondo (P/B) (Staham et al., 1978; Boekstein et al., 1984) para cuantificar microanalíticamente las muestras biológicas. El fundamento de la razón P/B es que la concentración de un elemento en el área de análisis en la muestra es proporcional al número de cuentas netas de la señal característica de ese elemento dividido por el fondo existente debajo del pico. El interés del método P/B es que resulta independiente de las variaciones en la intensidad de corriente, así como de la absorción debida a las irregularidades de la superficie de la muestra siendo, por tanto, el método de elección para el análisis cuantitativo de la composición elemental de especímenes biológicos gruesos examinados en un microscopio electrónico de barrido. Los datos cuantitativos cuando se analizan muestras criodesecadas son obtenidos en mmol/kg de masa seca, por el contrario cuando el material es analizado en estado congelado e hidratado los datos obtenidos se expresan en mmol/kg de masa húmeda.

El microanálisis por energía dispersiva de rayos X ha sido utilizado hasta el momento para evaluar alteraciones en el transporte iónico tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Hongpaisan y Roomans 1999; Roomans, 1999; 2002a; 2002b); Roomans y Von Euler 1996 ; Zhang y Roomans, 1998). Esta metodología ha comenzado también a utilizarse para evaluar más correctamente los procesos de muerte celular denominados por necrosis y por apoptosis a través de

las alteraciones iónicas que acontecen en estos fenómenos. Fernandez Segura et al. (1999b) estudiaron el comportamiento iónico en la células apoptóticas y su alteración tras ser inducidas por la irradiación con luz ultravioleta. Estas células se caracterizan por mostrar un incremento en el contenido de Na y un descenso en el contenido de Cl y K. Asimismo Skepper et al., (1999) describen resultados microanalíticos similares en un modelo de apoptosis en macrófagos.

En este estudio cuando se aplicó la microscopía electrónica analítica se comprobó que a las 72 horas de expuestos los fibroblastos gingivales humanos a los distintos ionómeros de vidrio utilizados se producen distintas alteraciones del perfil iónico.

Cuando se valoró VT, los resultados microanalíticos indicaron que se produce un aumento intracelular del Na y Cl y una disminución simultánea del K siendo estas variaciones iónicas estadísticamente significativas con respecto al control y a KM. Se sabe que los canales catiónicos y aniónicos, esto es los canales que conducen a incrementar el Na y el Cl y disminuir el K intracelular, estarían relacionado con procesos de muerte celular del tipo de la necrosis (Maeno et al., 2000; Szab et al., 1998; Rodríguez, 2005). Por otra parte Reeves y Shah (1994) muestran que durante la fase tardía de la lesión necrótica es cuando ocurre la entrada de cloro y una vez que ha ocurrido una deplección significativa en el contenido de ATP intracelular y tras una profunda alteración de la homeostasis intracelular de los cationes.

En relación al Mg en este estudio se observó que existe un descenso estadísticamente significativo con respecto al control y a KM. Estudios previos han demostrado que una disminución del Mg intracelular estaría relacionado con un descenso en los niveles de ATP; situación ésta, que se vincularía con procesos de muerte celular por necrosis (Rodríguez, 2005).

Roomans (2001) indica que la concentración de P permanece constante en células que no muestran daño estructural. En el presente estudio existe una disminución del P con respecto al control aunque la misma no llega a ser estadísticamente significativa. En principio estos resultados no tendrían una fácil explicación en virtud de las alteraciones iónicas expuestas anteriormente que indican la presencia de células con alteraciones típicas de un proceso de muerte por

necrosis. Creemos que la disminución del P en los resultados estaría indicando el camino hacia las primeras alteraciones estructurales de las células expuestas a VT.

Por otra parte cuando se evaluó S pudo observarse que existe una disminución de este elemento que es estadísticamente significativo con respecto al control y a KM. Sánchez Quevedo et al., (1989) y Roomans (2002a,b) han descrito que los valores de S se relacionan con las proteínas y proteoglicanos y que una disminución en la concentración del mismo, estaría evidenciando la progresiva lisis de las organelas celulares.

En esta investigación se observó que existen aumentos en el contenido intracelular de Na, Cl, Mg y S aunque en ningún caso estas variaciones fueron estadísticamente significativas con respecto al control. Sin embargo el K y P mostraron una disminución significativa lo que podría estar indicando el comienzo de algunas alteraciones que estarían relacionadas a las evidencias mostradas en el análisis morfológico.

De los resultados obtenidos en esta tesis doctoral se pudo observar que a partir de la valoración de los 4 indicadores de toxicidad celular, VT generaría mayores alteraciones sobre los fibroblastos gingivales humanos a las 72 horas que KM y que dichas alteraciones permitirían determinar que VT induciría sobre estas células un proceso de muerte celular del tipo de la necrosis. Es de destacar también que se pudo establecer un modelo válido y predictivo para el estudio de citotoxicidad de distintos cementos de ionómero de vidrio. Estos resultados llevan a la reflexión sobre algunas limitaciones biológicas de estos materiales y deberían hacernos replantear sobre el tipo de ionómero vítreo más conveniente para la protección del complejo dentino pulpar en situaciones que esté indicado su uso.

5. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El método “in vitro” propuesto, basado en fibroblastos gingivales humanos, constituye un sistema experimental idóneo para evaluar la citotoxicidad por ionómeros vítreos mediante la utilización de indicadores morfológicos, bioquímicos y microanalíticos.

2. La evaluación morfológica, mediante la microscopía óptica invertida, fotovideomicroscopía y confocal laser scanning microscope, en los fibroblastos gingivales humanos tras la aplicación del ionómero vítreo VT, pone en evidencia un patrón microscópico que se caracteriza por la presencia de una población de células de formas esféricas y a su vez una importante cantidad de vacuolas citoplasmáticas.

3. La evaluación morfológica, mediante la microscopía óptica invertida, fotovideomicroscopía y confocal laser scanning microscope, en los fibroblastos gingivales humanos tras la aplicación del ionómero vítreo KM, pone en evidencia un patrón microscópico que se caracteriza por la presencia de dos poblaciones celulares. Una población se caracteriza por presentar formas de finas prolongaciones aplanadas, y un segundo grupo celular, que se caracteriza por mostrar una morfología totalmente esférica y la presencia de vacuolas citoplasmáticas.

4. La evaluación de la citotoxicidad de VT en fibroblastos gingivales humanos, mediante la cuantificación enzimática de LDH libre, pone en evidencia que la liberación de LDH al medio fue significativamente mayor con respecto al control y a KM. Este comportamiento de mayor toxicidad se fundamentaría en la presencia del monómero HEMA en la composición de los IVH. Permite establecer el efecto citotóxico de VT por ruptura de la membrana citoplasmática

5. La evaluación de la citotoxicidad de KM en fibroblastos gingivales humanos, mediante la cuantificación enzimática de LDH libre, pone en evidencia que la liberación de LDH al medio fue significativamente mayor con respecto al control. Este comportamiento se explicaría por la presencia de pequeñas cantidades de partículas de aluminio y otros iones metálicos presentes en estos materiales. Sin embargo, la menor toxicidad con respecto a VT se fundamentaría en la ausencia del monómero HEMA.

6. La evaluación de la citotoxicidad de VT en fibroblastos gingivales humanos, mediante la cuantificación de ADN libre, evidencia que la liberación de ADN al medio fue significativamente mayor con respecto a KM y el control. Este comportamiento de mayor toxicidad se fundamenta en la presencia del monómero HEMA en la composición de los IVH y permite establecer el efecto citotóxico de VT a nivel nuclear.

7. La evaluación de la citotoxicidad de KM en fibroblastos gingivales humanos, mediante la cuantificación de ADN libre, reveló que la liberación de ADN al medio fue significativamente mayor con respecto al control. Este comportamiento se explicaría por la presencia de pequeñas cantidades de partículas de aluminio y otros iones metálicos presentes en estos materiales. Sin embargo, la menor toxicidad con respecto a VT se fundamentaría en la ausencia del monómero HEMA.

8. La evaluación de la citotoxicidad de VT en fibroblastos gingivales humanos mediante microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X pone de relieve la existencia de un patrón microanalítico en los niveles intracelulares de Na, Cl, K, Mg, P, y S que permiten identificar un mecanismo de muerte celular como un proceso de naturaleza necrótica.

9. La evaluación de la citotoxicidad de KM en fibroblastos gingivales humanos mediante microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X determina la existencia de un patrón microanalítico en los niveles intracelulares de K y P que mostraron una disminución significativa lo que podría estar indicando el comienzo de algunas alteraciones relacionadas a las evidencias mostradas en el análisis morfológico. Sin embargo no ha sido posible establecer ningún mecanismo de muerte celular.

10. La evaluación comparativa de ambos tipos de ionómeros vítreos en relación con los patrones de citotoxicidad establecidos en el modelo experimental desarrollado en esta tesis doctoral permitió determinar que VT se comporta con mayores índices de citotoxicidad que KM, lo que podría relacionarse con el contenido de HEMA presente en su composición al ser compatibles los índices citotóxicos del ionómero vítreo modificado con resinas con los postulados para la citotoxicidad del HEMA. Estos resultados advierten sobre algunas limitaciones biológicas de estos materiales y por tanto se sugiere que los ionómeros vítreos

convencionales serían los materiales de elección en la protección del complejo dentino pulpar en preparaciones cavitarias profundas con alta permeabilidad.

6. RESUMEN

RESUMEN

El objetivo de esta tesis doctoral fue evaluar la biocompatibilidad de dos cementos de ionómeros vítreos en un modelo experimental *in vitro*, utilizando criterios morfológicos, bioquímicos y microanalíticos. El método “*in vitro*” propuesto, basado en fibroblastos gingivales humanos, es un sistema experimental idóneo para evaluar la citotoxicidad por ionómeros vítreos

La evaluación morfológica, mediante la microscopía óptica invertida y confocal laser scanning microscope, en los fibroblastos gingivales humanos tras la aplicación del ionómero vítreo VT, evidencia un patrón microscópico que se caracteriza por la presencia de una población de células de formas esféricas y a su vez una importante cantidad de vacuolas citoplasmáticas. Cuando se utiliza un IVC (ionómero vítreo convencional) KM se caracteriza por la presencia de dos poblaciones celulares. Una población presenta formas de finas prolongaciones aplanadas, y un segundo grupo se caracteriza por mostrar una morfología totalmente esférica y la presencia de vacuolas citoplasmáticas.

La evaluación de la citotoxicidad de VT en fibroblastos gingivales humanos, mediante la cuantificación enzimática de LDH libre, revela que la liberación de LDH al medio fue significativamente mayor con respecto al control y a KM. Este comportamiento de mayor toxicidad se fundamentaría en la presencia del monómero HEMA en la composición de los IVH. Permite establecer el efecto citotóxico de VT por ruptura de la membrana citoplasmática. En KM la liberación de LDH al medio fue significativamente mayor con respecto al control. Este comportamiento se explicaría por la presencia de pequeñas cantidades de partículas de aluminio y otros iones metálicos presentes en estos materiales. Sin embargo, la menor toxicidad con respecto a VT se fundamentaría en la ausencia del monómero HEMA.

La evaluación de la citotoxicidad de VT en fibroblastos gingivales humanos, mediante la cuantificación de ADN libre, pone en evidencia que la liberación de ADN al medio fue significativamente mayor con respecto a KM y el control. Este comportamiento de mayor toxicidad se fundamenta en la presencia del monómero HEMA en la composición de los IVH y permite establecer el efecto citotóxico de VT a nivel nuclear. En KM la cuantificación de ADN libre, pone en evidencia que la liberación de ADN al medio fue significativamente mayor con respecto al control.

Esto se explicaría por la presencia de pequeñas cantidades de partículas de aluminio y otros iones metálicos presentes en estos materiales. Sin embargo, la menor toxicidad con respecto a VT se fundamentaría en la ausencia del monómero HEMA.

La evaluación de la citotoxicidad de VT en fibroblastos gingivales humanos mediante microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X indica la existencia de un patrón microanalítico en los niveles intracelulares de Na, Cl, K, Mg, P, y S que permiten identificar un mecanismo de muerte celular como un proceso de naturaleza necrótica.

La evaluación de la citotoxicidad de KM en fibroblastos gingivales humanos mediante microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X muestra la existencia de un patrón microanalítico en los niveles intracelulares de K y P que mostraron una disminución significativa lo que podría estar indicando el comienzo de algunas alteraciones relacionadas a las evidencias mostradas en el análisis morfológico. Sin embargo no ha sido posible establecer ningún mecanismo de muerte celular.

La evaluación comparativa de ambos tipos de ionómeros vítreos en relación con los patrones de citotoxicidad establecidos en el modelo experimental desarrollado en la presente tesis doctoral permitió determinar que VT se comporta con mayores índices de citotoxicidad que KM. Estos resultados advierten sobre algunas limitaciones biológicas de estos materiales y por tanto se sugiere que los IVC serían los materiales de elección en la protección del complejo dentino pulpar en preparaciones cavitarias profundas con alta permeabilidad.

Palabras claves:

Ionómeros vítreos, necrosis, microanálisis, fibroblastos gingivales humanos.

7. SUMMARY

SUMMARY

The aim of the current project was to evaluate the biocompatibility of two glass ionomer cements in an *in Vitro* experimental model, using morphological, biochemical and microanalytical criteria. The *in vitro* method proposed, based on human gingival fibroblast, is a suitable experimental system to evaluate the cytotoxicity caused by glass ionomer.

The morphological evaluation, through the inverted microscopy optic and laser confocal microscope, in the human gingival fibroblasts after the application of glass ionomer VT shows a microscopic pattern which is characterized by the presence of a population of spherical shaped cells and in turn an important quantity of cytoplasmatic vacuoles. When an CIC (conventional ionomer cement) is used KM is characterized by the presence of two cells population. One population shows thin flat shapes, and a second group shows a totally spheric morphology and the presence of cytoplasmatic vacuoles.

The evaluation of the cytotoxicity of VT in human gingival fibroblasts, through the enzymatic qualification of free LDH, shows that the release of the LDH into the environment was significantly higher in respect to control and to KM. This higher toxicity behaviour would be based in the presence of the HEMA monomer in the composition of the IVH. It can establish the VT cytotoxic effect by breaking the cytoplasmatic membrane. In KM the release of LDH into the environment was significantly higher in respect to control. This behaviour would be explained by the presence of small quantities of aluminium particles and other metallic ions in these materials. However, the lower toxicity in respect to a VT would be based in the absence of the HEMA monomer.

The evaluation of the cytotoxicity of VT in human gingival fibroblasts, through the quantification of free ADN shows that the release of ADN into the environment was significantly higher in respect to a KM and the control. This higher toxicity behaviour would be based in the presence of the HEMA monomer in the composition of the IVH and it can establish the VT cytotoxic effect in a nuclear level. In KM the quantification of free ADN shows that the release of ADN into the environment was significantly higher in respect to control. This would be explained by the small quantities of aluminium particles and other metallic ions in these materials. However,

the lower toxicity in respect to a VT would be based in the absence of the HEMA monomer.

The evaluation of the citotoxicity of VT in human gingival fibroblasts through analytic electronic microscopy by X ray dispersive energy shows the existence of a microanalytical pattern in the intracellular levels of Na, Cl, K, Mg, P and S that allow to identify a mechanism of cellular death like a process of necrosis nature.

The evaluation of the citotoxicity of KM in human gingival fibroblasts through analytic electronic microscopy by X ray dispersive energy shows the existence of a microanalytical pattern in the intracellular levels of K and P which showed a significant decrease which could be indicating the beginning of some alterations related to the evidences shown in the morphological analysis. However, any mechanism of intracellular death was not possibly established.

The comparative evaluation of both types of glass ionomers in relation to the citotoxicity patterns established in the experimental model developed in the current project can determine that VT acts with higher citotoxicity rates than KM. These results warn us about some biological limitations of these materials and so suggest us that the IVC would be the materials to be chosen for the protection of the dental pulp complex in deep cavity preparations with high permeability.

Key words:

Glass ionomers, necrosis, microanalysis, human gingival fibroblasts.

8. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Abraham EH, Breslow JL, Epstein J, Chang-Sing P, Lechene C (1985) Preparation of individual human diploid fibroblasts and study of ion transport. *Am J Physiol* 248:154– 164.
2. Avery J (1994) *Oral Development and Histology*. 2nd Edition. Thieme Medical publishers Inc. New York.
3. Becher R, Kopperud H, Al R, Samuelsen J, Morisbak E, Dahlman H, Lilleaas E, Dahl J (2006) Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts *Dental Materials*, Volume 22, Issue 7, Pages 630-640.
4. Blottiere HM, Daculsi G, Anegon I, Pouezat JA, Nelson PN, Passuti N (1995) Utilization of activated U937 monocytic cells as a model to evaluate biocompatibility and biodegradation of synthetic calcium phosphote. *Biomaterials* 16:497–503.
5. Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Cincchi B, Holz J (1996) In vitro citotoxicity and dentin permeability of HEMA. *Journal of endodontics* 22(5):244–288.
6. Boekestein A, Thiel F, Stols ALH, Bouw E, Stadhouders A (1984) Surfaces roughness and the use of peak to background in the X-ray microanalysis of bulk bio-organic sample. *J Microsc* 134:327-334.
7. Buja LM, Eigenbrodt MD, Eigenbrodt EH (1993) Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med* 117:1208–1214.
8. Campos A, López – Escámez JA, Cañizares FJ, Crespo PV (1992) Electron probe X – ray microanalysis of Ca and K distributions in the otolithihic membrane. *Micron and Microscopia Acta* 23:349 – 350.
9. Campos A, López – Escámez JA, Cañizares FJ, Crespo PV, Baeyens JM (1994) Gentamicin ototoxicity in otoconia: quantitative electron probe x – ray microanalysis. *Acta Otolaryngol (stockh)*114:18–23.
10. Carda C, Peydro A (2006) Ultrastructural Patterns of Human Dentinal Tubules, Odontoblast Processes and Nerves Fibres. *Tissues and Cell* 435:1-10.
11. Carini R, Autelli R, Bellomo G, Dianzani MU, Albano E (1995) Sodium-mediated cell swelling is associated with irreversible damage in isolated hepatocytes

exposed to hypoxia or mitochondrial toxins. *Biochim Biophys Res Commun* 206:180-185.

12. Carini R, Bellomo G, De Cesaris MG, Albano E (1997) Glycine protect against hepatocyte killing by KCN or hypoxia by preventing intracellular Na⁺ overload in the rat. *Hepatology* 26:107-112.

13. Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Bagnati M, Bellomo G, Albano E (2000) Alterations of Na⁺ homeostasis in hepatocyte reoxygenation injury. *Biochim Biophys Acta* 1500:297-305.

14. Cimpan MR, Cressey LI, Skang N, Halstensen A, Lie SA, Gjertsen BT, Matre R (2000) Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U937 human monoblastoid cells. *Eur J Oral Sci* 108:59-69.

15. Costa CAS, Benatti Neto C, Vargas PA; Villalba H; Hebling J. (1996) Compatibilidade biológica do ionómero de vidro fotopolimerizável (Vitremer). Avaliação histológica dos seus efeitos sobre dentina e tecido pulpa rem dentes de rato. *Rev. Odontol. Univ Sao Paulo*; 10(4):257-63.

16. Costa CA (1997). Compatibilidad Dentino-Pulpar de los Sistemas Adhesivos. *Odontología Clínica a Fines del Milenio. Jornadas Aniversario de la Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba. Editorial Kent-von Düring. Capítulo 28.221-228.*

17. Costa CAS, Vaerten MA, Edwards CA, Hanks CT (1999) Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. *Dent Mater*; 15:434-441.

18. Costa CA, (2000). Pulp response to direct capping with an adhesive system. *Am. J Dent* 13 81-7.

19. Costa CA, Hebling J, García-Godoy F, Hanks CT. (2003). In Vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. *Biomaterials*. Sep 24(21):3853-8.

20. Costa CAS, Hebling J.(2003) Biología del Complejo Dentino-Pulpar en relación a su protección mediante Adhesivos. *Adhesión En Odontología Restauradora*. Editora MAIO Curitiba, Paraná Brasil. Primera Edición. Editor Gilberto Henostroza H. 162-193.

21. Craig RG, (1997) Restorative dental materials. St. Louis: Mosby, Year Book Inc., p. 146–52.
22. Crespo PV, López Escámez JA, Cañizares FJ, Campos A (1993) X-ray microanalytical determination of P, S and K concentration in the gelatinous membrane of the utricle. *Acta otolaryngol* 113:176–180.
23. Chang YC, Chou MY. 2001 Cytotoxicity of fluoride on human pulp cell cultures in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*;91:230-4.
24. Edelberg M (2003) Adhesión con Ionómeros Vítreos. Adhesión en Odontología Restauradora. Editora MAIO Curitiba, Paraná Brasil Primera Edición. Editor Gilberto Henostroza H 139-162.
25. Eick et al (1993) The dentinal surface: its influence on dentinal adhesión Part III *Quintessence Int* 24 571-82.
26. Fernandez-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Revelles F, Campos A (1997a) Electron probe x-ray microanalysis of cultured epithelial tumour cells with scanning electron microscopy. *Cell Biol Int* 21:665–669.
27. Fernandez-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Revelles F, Campos A (1997b) Backscattered electron imaging of cultured cells: Application to electron probe X-ray microanalysis using a scanning electron microscope. *J Microsc* 188:72–78.
28. Fernandez-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Warley a, Campos A (1999a) A procedure to prepare cultured cells in suspension for electron probe X – ray microanalysis: application to scanning and transmission electron microscope. *Exp Cell Res* 253:454–462.
29. Fernandez-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Warley a, Campos A (1999b) Changes in elemental content during apoptotic cell death studied by electron Probe X-ray microanalysis. *Exp Cell Res* 253:454–462.
30. Fitzgerald M 1979. Cellular mechanisms of dentinal bridge repair using 3H-Thymidine. *J Dent Res* 58 2198-2206.
31. Fujisawa S, Kadoma Y , Kadoma Y.(2003) H and C NMR studies of the interation of eugenol phenol and triethylene glycol dimethacrylate with phospholipid liposome as a model system for odontoblast membrane. *J Dent Res* 67 1438-41.

-
32. Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G (1998) Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res* 41:474–80.
33. Gisbert Calabuig JA (1998) *Medicina legal y toxicología*. Masson S.A, Barcelona.
34. Goldstein JI, Roming AD, Newbury DE, Lyman CE, Echlin P, Fioro C, Joy DC, Lifshin E (1992) *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. Plenum Press, New York.
35. Gómez de Ferrari M. E, Campos Muñoz A (2002) *Histología y embriología bucodental*. 2ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid España
36. Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG (1991) Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res* 70:1450-5.
37. Hebling J, Giro EM, Costa CA (1999) Biocompatibility of an adhesive system applied on exposed human pulp. *J Endod* 25:676–682.
38. Holland Jr. C, Takayama S, Russo M, Komatsu J, Sasaki T, Quintella L. (1978) Pulpal response to a glass ionomer cement histological study in a dog. *Rev. Fac. Odontol. Aracatuba* 7(2):133-37.
39. Hongpaisan J, Roomans GM (1999) Retaining ionic concentrations during in vitro storage of tissue for microanalytical studies. *J Microsc* 193:257–267.
40. Issa Y, Watts DC, Brunton PA, Waters CM, Duxbury AJ (2004) Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblast in vitro. *Dental Materials* 20:12–20.
41. Kanga M, Noda M, Ferracane JL, Nakamura W, Oguchi H, Sano H (2001) The in vitro cytotoxicity of eluates from dentin bonding resins and their effect on tyrosine phosphorylation of L929 cells. *Dent Mater* 17:333–339.
42. Kehe K, Reichl FX, Durner J, Walther U, HICKEL R, Forth W (2001) Cytotoxicity of dental composite components and mercury compounds in pulmonary cells. *Biomaterials* 22:317 –322.

-
43. Lan WH, Lan WC, Wang TM, Lee YL, Tseng WY, Lin CP, Jeng JH, Chang MC. (2003) Citotoxicity of conventional and modified glass ionomer cements. *Oper Dent* 28(3):251-9.
 44. Lechne C (1989) Electron probe analysis of transport properties of cultured cells. In: Zierold K, Hagler HK (Eds) Springer-Verlag, Berlin 236–247.
 45. Lekic PC, Pender N, Mc Culloch CAG (1997) Is Fibroblast heterogeneity relevant to health, diseases and treatments of periodontal tissues *Crit. Rev. Oral Biol. Med* 8(3): 253–268.
 46. Leyhausen G; Abtahi M, Karbakhsh M, Sapotnick A, Geurtsen W. (1998) The biocompatibility of various resins-modified and one conventional glass-ionomer cement. *Biomaterials* 19:559-64.
 47. Leyhausen G, Abtahi M, Karbakhsh M, Sapotnick A, Geurtsen W. (2003) The biocompatibility of various resin-modified and one conventional glass-ionomer cement. *Biomaterials* 24:3-9.
 48. Lonroth EC, Dahl JE. (2001) Citotoxicity of dental glass ionomers evaluated using dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests. *Acta Odontol Scand.* feb 59(1):34-9.
 49. López Escámez JA, Cañizares FJ, Crespo PV, Campos A (1992) Electron probe microanalysis of the otolithic membrane. A methodological and quantitative study. *Scanning Microsc* 6:765–772.
 50. López Escámez JA, Cañizares FJ, Crespo PV, Campos A (1993) Standards for quantification of element in the otolithic membrane by electron probe x – ray microanalysis: calibration curves and electron beam sensitivity. *Journal of Microscopy* 171:215–222.
 51. López Escámez JA, Campos A (1994) Standards for X-ray microanalysis of calcified structures. *Scanning Microsc* 8:171–185.
 52. López González G Evaluación biológica de la toxicidad por 2-Hidroxiethylmetacrilato (HEMA) en fibroblastos gingivales humanos. Tesis Doctoral (2006).

-
53. Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazama A, Okada Y (2000) Normotic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:9487-9492.
54. Marc A, Wanger A, Martial A, Goergen JL, Engasser JM, Geugey Y, Pinton H (1991) Potential a pitfalls of using LDH release for the evaluation of animal cell death kinetics. In: Spier RE, Griffiths JB, Meigner B, editors. *Productions of biologicals form animal cells in culture*. London: Butterworth – Heinemann; 569 – 574.
55. Mc Laughlin CW, Zellhuber-Mc Millan S, Macknight ADC, Civan MM (2004) Electron microprobe analysis of ouabain-exposed ciliary epithelium: PE-NPE cell couplets form the functional units. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:1376–1389.
56. Melo de Mendonça , Chaves Souza P, Hebling J, DDS, Souza Costa CA (2007) Cytotoxic effects of hard-setting cements applied on the odontoblast cell line MDPC-23 *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 104:e102-e108
57. Mondelli J et al. (1979). *Dentística Operatoria*. São Paulo, Servier, 67-88.
58. Mount GJ, Bryant RW (1999). *Materiales de Ionómeros de Vidrio en Mount GJ y Hume WR Conservación y Restauración de la Estructura Dental*. Editora Harcourt Brace de España. Madrid España 1ª Edición. 8- 69-90.
59. Oilo G (1991) Luting cements: a review and comparison. In *Dent J* 41(2):81-88.
60. Oliva A, Ragione D, Salerno A, Riccio V, Tartaro G, Gozzolino A. (1996) Biocompatibility studies on glass ionomer cements by primary cultures of human osteoblasts. *Biomaterials*;17:1351–6.
61. Palmer G, Anstice HM, Pearson GJ (1999) The effect of curing regime on the release of hydroxyethyl methacrylate (HEMA) from resin-modified glass-ionomer cements. *J Dent* 27:303–11.
62. Pashley DH (1984) Smear Layer physiological considerations. *Operative Dentistry Supplement* 3 13-29.
63. Pashley DH (1992) The effects of acid etching on the pulpodentin complex. *Oper Dent* 20-18.
-

-
64. Pashley DH (1996) Dynamics of the pulp-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med* 7 104-33.
65. Pashley DH (1997) The influence of dentin permeability and pulp blood flow on pulpar solute concentrations. *Journal of Endodontics* 5 355-361.
66. Priotto EG, Uribe Echevarría J y Uribe Echevarría D (1995). Morphological and numerical characteristics of dentine tubule destined to adhesion. *Divisional Abstracts: Journal of Dental Research* 74(3):734-738.
67. Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB (1995) Citotoxic interactive effects of dentin bonding components in mouse fibroblast. *J Dent Res* 74:1602–1606.
68. Reeves WB, Shah S (1994) Activation of potassium channels contributes to hypoxic injury in proximal tubules. *J Clin Invest* 94:2289-2294.
69. Rodríguez IA (2005) Efecto Citotóxico de los Sistemas Adhesivos Dentales. Estudio “in vitro” Estructural, Ultraestructural y Microanalítico. Tesis Doctoral. Facultad de Odontología Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Medicina y Facultad de Odontología Universidad de Granada.
70. Roomans GM (1991) Cryopreparation of tissue for clinical applications of X-ray microanalysis. *Scanning Microsc* 5:95–106.
71. Roomans GM, Von Euler A (1996) X-ray microanalysis in cell biology and cell pathology. *Cell Biol IOt* 20:103–109.
72. Roomans GM (1999) X-ray microanalysis of cultured cells in the scanning electron microscope and the scanning transmission electron microscope: a comparison. *Scanning Microsc* 13:159–165.
73. Roomans GM (2002a) Application of X-ray microanalysis to the study of cell physiology in cell attached to biomaterials. *Eur Cell Mater* 18:1–8.
74. Roomans GM (2002b) X-ray microanalysis of epithelial cells in culture. *Methods Mol Biol* 188:273–289.
75. Sanchez Quevedo MC, Crespo PV, García JM, Campos A (1989) X ray microanalytical histochemistry of human circumpulpar and mantle dentine. *Bone Miner* 6:323-329.

-
76. Six N, Lasfargues JJ, Goldberg M (2000) In vivo study of the pulp reaction to Fuji IX, a glass ionomer cement. *J Dent* 28(6):413-22.
77. Skepper JN, Karydis I, Garnett MR, Hegyi L, Hardwick SJ, Warley A, Mitchinson MJ, Cary NR (1999) Changes in elemental concentrations are associated with early stages of apoptosis in human monocyte-macrophages exposed to oxidized low-density lipoprotein: an X-ray microanalytical study. *J Pathol* 188:100–106.
78. Slater K (2001) Cytotoxicity test for high-throughput drug discovery. *Curr Opin Biotechnol* 12:70–74. .
79. Souza Costa CA, Souza P, Aranha A, Hebling J, Giro E (2006) In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements *Dental Materials*, Volume 22, Issue 9, Pages 838-844.
80. Soheili ME, Golberg M, Stanislawski L (2003) In vitro effects of ascorbate and Trolox on the biocompatibility of dental restorative materials. *Biomater* 24 3-9.
81. Spagnuolo G, Galler K, Schmalz G, Cosentino C, Rengo S, Schweikl H (2004a) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase amplifies TEGDMA-induced apoptosis in primary human pulp cells. *J Dent Res* 83:703–704.
82. Stanislawski L, Daniau X, Lauti A, Goldberg M.(1999) Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements. *J Biomed Mater Res* 48(3):277-88.
83. Statham PJ, Pawley JB (1978) A new method of particle X-ray microanalysis on peak to background measurements. *Scanning Electron Microsc I*:469-478
84. Studervant C (1996) *Operatoria Dental. Arte y Ciencia. Tercera Edición.* España. Editorial Mosby. Capítulo 2.18-28.
85. Ten Cate AR (1986) *El Complejo Pulpodentinario.* Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina.191-235.
86. Thomas JP, Geiger PG, Girotti AW (1993) Lethal damage to endothelial cells by oxidized low density lipoprotein: role of selenoperoxidases in cytoprotection against lipid peroxide – and iron – mediated reactions. *J Lipid Res* 34:434-439.
87. Tobías J (1978) Pulpal response to a glass ionomer cement. *Br Dent J* 144:345-50.
-

-
88. Uribe Echevarría J (1990) *Operatoria Dental Ciencia y Práctica*. Ediciones Avances Médico-Dentales. Madrid, España.
89. Uribe Echevarría J, Uribe Echevarría D y Priotto EG (1995). Microanálisis por dispersión de energía Edax del balance fósforo-calcio de la dentina con smear layer. *Actas de la XVIII Reunión Anual de la División Argentina. I. A.D.R.* 8.
90. Uribe Echevarría J (1999) The influence of cavity configuration resin layer thickness and dentin treatment on resin adaptation. *J. Dent Res* 78:477.
91. Uribe Echevarría J, Priotto EG, Spadiliero de Lutri M (2003) Adhesión a Esmalte y Dentina con Adhesivos Poliméricos en Adhesión En Odontología Restauradora. Editora MAIO Curitiba, Paraná Brasil Primera Edición. Editor Gilberto Henostroza H. 71-111.
92. Uribe Echevarría J, Uribe Echevarría L, Uribe Echevarría DI y Priotto EG (1997) Dentin action and penetration of dentin conditioners. *Divisional Abstracts: Journal of Dental Research* 76(5):918.
93. Von Euler A, Palsgard E, Vult Von Steyern C, Roomans GM(1993) X-ray microanalysis of epithelial and secretory cells in culture. *Scanning Microsc* 7:191–202.
94. Warley A (1994) The preparation of cultured cells for X-ray microanalysis. *Scanning Microsc* VIII:129–138.
95. Warley A, Cracknell KPB, Cammish HB, Twort CHC, Ward JPT, Hisrt SJ (1994a) Preparation of cultured airway smooth muscle for study of intracellular element concentration by X-ray microanalysis: comparison of whole cells with cryosections. *J Microsc* 175:143–153.
96. Warley A, Fernández – Segura E, López – Escámez J, Campos A (1994b) Changes in elemental concentrations in k562 target cells after conjugation with human lymphocytes studied by X – ray microanalysis. *Cell Biol Int* 18:915–916.
97. Warley A (1997) *X-ray microanalysis for biologists*. Portland Press, London, UK.
98. Warley A, Skepper JN (2000) Long freeze-drying times are not necessary during the preparation of thin sections for X-ray microanalysis. *J Microsc* 198:116–123.

-
99. Wataha JC y Hanks CT (1996); Sun Z “in vitro” models of biocompatibility A review Dent Mater 12 186-93.
 100. Wroblewski J, Muller RM, Wroblewski R, Roomans GM(1983) Quantitative X-ray microanalysis of semi-thick cryosections. Histochem 77:447–463.
 101. Wroblewski J, Roomans GM (1984) X-ray microanalysis of single and cultured cells. Scanning Electron Microsc IV:1875–1882.
 102. Yildiz D, Llu YS, Ercal N, Armstrong DW (1999) Comparison of pure nicotine – and smokeless tobacco extract – induced toxicities and oxidative stress. Arch Environ Contam Toxicol 37:434–439.
 103. Zierold K, Schafer D (1988) Preparation of cultured and isolated cells for X-ray microanalysis. Scanning Microsc 2:1775–1790.
 104. Zhang W, Roomans GM (1998) Volume-induced chloride transport in HT29 cells studied by X-raymicroanalysis. Microsc Res Tech 40:72–78.