

UNIVERSIDAD DE GRANADA

**COMPOSITES Y SELLADORES DENTALES:
ANALISIS CROMATOGRAFICO Y
DEMOSTRACION DE ACTIVIDAD ESTROGENICA**

ROSA M^º. PULGAR ENCINAS

UNIVERSIDAD DE GRANADA

**COMPOSITES Y SELLADORES DENTALES:
ANALISIS CROMATOGRAFICO Y
DEMOSTRACION DE ACTIVIDAD
ESTROGENICA**

Memoria que presenta para aspirar al grado de Doctora en
Medicina la Licenciada ROSA M^a. PULGAR ENCINAS

La memoria de Tesis Doctoral que lleva por título “COMPOSITES Y SELLADORES DENTALES: ANALISIS CROMATOGRAFICO Y DEMOSTRACION DE ACTIVIDAD ESTROGENICA”, ha sido presentada por la **Lda. Rosa M^a Pulgar Encinas** para aspirar al grado de Doctora en Medicina, habiendo sido dirigida por **Dña. Fátima Olea Serrano**, Catedrática del Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada y por **D. Nicolás Olea Serrano**, Catedrático del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

Fdo. Dña. Fátima Olea Serrano

Fdo. D. Nicolás Olea Serrano

Fdo. Rosa M^a. Pulgar Encinas

El trabajo experimental de esta Tesis Doctoral ha sido realizado en parte gracias al Proyecto n° 95/1959 del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) que lleva por título “FACTORES ETIOLOGICOS EN CANCER DE MAMA: XENOBIOTICOS ESTROGENICOS CONTENIDOS EN TEJIDO ADIPOSO”, y que en la actualidad se encuentra en curso de realización.

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

Dña. M^a del CARMEN LOPEZ MARTINEZ, Directora del Departamento de
Nutrición y Bromatología

CERTIFICA:

Que el presente trabajo ha sido realizado por la licenciada en Medicina D^a
ROSA M^a PULGAR ENCINAS en el laboratorio del Departamento de
Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de
Granada.

Granada, Mayo de 1996

Profa. Dra. Dña. M.C. Carmen López Martínez

DEPARTAMENTO DE RADIOLOGIA Y MEDICINA FISICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

D. VICENTE PEDRAZA MURIEL, Director del Departamento de Radiología y Medicina Física,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo ha sido realizado por la licenciada en Medicina Dña. ROSA M^a PULGAR ENCINAS en los laboratorios del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

Granada, Mayo de 1996

Prof. Dr. D. Vicente Pedraza Muriel

DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGIA
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

D. MIGUEL ANGEL GONZALEZ MOLES, Director del Departamento de Estomatología,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo ha sido realizado por la licenciada en Medicina Dña. ROSA M^a PULGAR ENCINAS, en los laboratorios del Departamento de Estomatología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada.

Granada, Mayo de 1996

Prof. Dr. D. Miguel A. González Moles

AGRADECIMIENTOS

Esta es una de las páginas más difíciles de escribir de esta Memoria porque probablemente no haga justicia con todos los que de una u otra manera han contribuído a que finalmente vea la luz.

No deseo caer en los tópicos. Sencillamente, dar las gracias a mi amiga Fátima Olea. Ella y yo sabemos todo lo que le debo (sobre todo las magníficas "comilonas" de los jueves).

A Nicolás le agradezco el que al final se haya salido con la suya y hayamos podido trabajar juntos en una Tesis a medio camino entre su campo y el mio. Es para mí un ejemplo de lo que es el verdadero universitario.

A mi familia en pleno. Siempre se afirma que por su apoyo, pero en este caso han ido mucho más lejos, teniendo en cuenta mis "tres circunstancias".

Gracias a Arancha, Ana y Pilar. Esta Tesis no se hubiera podido realizar sin su colaboración.

A todo el Departamento de Nutrición y Bromatología por haberme tratado con tanto cariño. Hicieron que me sintiera una más entre ellas (y ellos).

A mis compañeros del Departamento de Estomatología que han seguido con interés el desarrollo de este trabajo. Especialmente quisiera agradecer a Manolo Bravo su colaboración en el tratamiento estadístico de los resultados.

A ANTONIO LUIS
A ANTONIO L. Jr
CRISTINA
y PABLO, mi virus informático

INDICE

I. INTRODUCCION	11
1. Resinas compuestas. Composites dentales	18
2. Selladores	27
3. Uso clínico de las resinas BisGMA.....	29
4. Reacción de polimerización de las resinas composite fotopolimerizables	30
5. Antecedentes en el uso de técnicas cromatográficas	39
6. Biocompatibilidad de los materiales dentales	44
7. Evaluación de la actividad estrogénica	54
II. OBJETIVOS	61
III. MATERIAL Y METODOS	63
MATERIAL	64
1. Material utilizado en cromatografía	64
2. Material odontológico	66
3. Material utilizado en cultivos celulares	69
4. Línea celular	76
5. Material de uso general	77
6. Descripción de la población	80
METODOS	81
1. Metodología cromatográfica	
* Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	81
* Cromatografía de gases (CG) - Espectrometría de masas (EM)	82
* Análisis cualitativo del BFA y oligómeros	82
* Análisis cuantitativo por HPLC del BFA y oligómeros...	94
2. Metodología odontológica	
* Composites y selladores. Preparación de las muestras...	112
* Estudio de presencia de monómeros en saliva. Recogida y preparación de las muestras	113
3. Metodología biológica	
* Método SRB: evaluación del número de células	117

* Experimentos de proliferación celular: Test E-SCREEN.	120
* Cuantificación de los receptores de estrógenos y progesterona	122
* Cuantificación de pS2	126
* Estudios de enlace al receptor estrogénico (RBA)	128
IV. RESULTADOS	131
1. Análisis cromatográfico de composites y selladores	132
2. Tratamiento estadístico de los resultados obtenidos por cromatografía	160
3. Análisis cromatográfico de las muestras de saliva	190
4. Resultados del test E-SCREEN	207
5. Procesamiento del receptor de estrógenos	217
6. Inducción del receptor de progesterona	220
7. Secreción de pS2	223
8. Resultados del estudio de enlace al receptor estrogénico	226
9. Efecto biológico de composites y selladores	228
10. Efecto sobre la proliferación de MCF7 de las muestras de saliva	232
V. DISCUSION	234
VI. CONCLUSIONES	263
VII. ANEXOS	266
1. Fórmulas químicas	267
2. Abreviaturas	271
VIII. BIBLIOGRAFIA	273

INTRODUCCION

INTRODUCCION

Los polímeros sintéticos presentan múltiples aplicaciones en el mundo actual. Entre ellos destacan las resinas que pueden fabricarse a partir de diversos monómeros que les imprimen características físicoquímicas y toxicológicas dispares y que condicionan su utilización. Hasta el momento las que parecen presentar cualidades de biocompatibilidad adecuadas para ser aceptadas en usos en contacto con seres humanos no son muy numerosas y pertenecen a las siguientes familias químicas (Yufera, 1979):

a) Oleo-resinas: obtenidas por calefacción de resinas naturales con aceites secantes. Endurecen por calefacción y polimerización.

b) Resinas fenólicas: fabricadas por condensación de fenoles sustituidos por formaldehído.

c) Resinas epoxifenólicas: Combinación de bisfenoles con epóxidos. La mezcla precondensada de una resina epoxi con una resina fenólica da lugar a una resina epoxifenólica.

d) Resinas acrílicas: Ésteres del ácido poliacrílico.

e) Resinas vinílicas: Copolímeros de compuestos vinílicos .

Las primeras epoxiresinas se obtuvieron por condensación entre epíclorhidrina y 4-4' isopropilideno difenilo o bisfenol-A (BFA). Esta reacción conduce mayoritariamente a la formación de diglicidileter de bisfenol-A (BADGE) y otros productos de diferentes pesos moleculares y grados de condensación, dependiendo de la proporción molar de los reactantes así como de las condiciones de reacción.

Las epoxiresinas se utilizan en gran número de aplicaciones debido a que son muy transparentes, presentan buena resistencia mecánica y conservan su forma en un amplio margen de temperaturas, entre los $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y los $150\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se emplean en la elaboración de bolsas esterilizables, barnices en latas de conserva, finalizadores de material en albañilería, material marino, envoltura de acero para estructuras, cobertura de tanques etc. Las epoxiresinas se emplean también como aditivos de otros materiales plásticos, como resinas vinílicas y acrílicas y en gomas naturales y sintéticas (Kroschwitz, 1987). Finalmente, son especialmente interesantes sus aplicaciones en el campo de la biomedicina: se han utilizado como cementos en cirugía ortopédica (Vuillemin y col, 1987; Kawanabe y col, 1993) y para la fabricación de lentes intraoculares (Yalon y col, 1988). En el campo de la Odontología presentan usos muy diversos, desde la fabricación de prótesis y aparatología ortodóncica hasta su utilización directa sobre el tejido dentario, tanto con fines preventivos, los denominados selladores dentales (Simonsen, 1988; Manton y Messer, 1995), como restauradores, los comúnmente llamados composites dentales (Leinfelder, 1995).

A pesar de la buena estabilidad de las resinas epoxi, lo cierto es que ante las agresiones físico-químicas del medio (temperatura, pH, solventes orgánicos etc.) los polímeros resultantes pueden ceder algunos de sus constituyentes más simples. Este fenómeno, conocido como "migración", consiste en la transferencia de masa entre el material polimérico y su entorno. Los componentes identificados en los medios que rodean al material polimérico pertenecen a alguno de los grupos descritos a continuación:

- Monómeros residuales no polimerizados, o polímeros de bajo peso molecular. Originados por defectos en la polimerización, polimerización incompleta o por degradación de los polímeros a consecuencia de las agresiones físico-químicas del medio.
- Aditivos adicionados al polímero para modificar sus propiedades físico-químicas, y que no se incorporan a éste en su totalidad.

- Sustancias de bajo peso molecular, tales como adhesivos, colorantes etc., que son constituyentes habituales de las mezclas comerciales.

Por razones toxicológicas, la migración de estos compuestos debe ser limitada, y se hace necesario, además, el estudio de su degradación en las distintas aplicaciones (Paseiro y col., 1993). Por ejemplo, la degradación térmica de los policarbonatos conduce a un gran número de productos de bajo peso molecular entre los que caben citar CO₂, BFA, difenil-carbonato, fenol-fenil salicilato, fenil-2 fenoxibenzoato etc. (Rufus y col., 1994; Brotons y col., 1995).

De igual modo se ha descrito recientemente la contaminación por bisfenol-A de los alimentos mantenidos en latas de conserva, a partir del material polimérico empleado en los recubrimientos interiores de tales envases (Brotons, 1995), y la aparición de monómeros en vinos almacenados en material polimérico (Larroque, 1988).

La UE establece unos límites de residuos de 3 mg/kg de alimento para el BFA y de 0,02 mg/kg para el BADGE (BOE nº 72 de 24 de marzo de 1992).

En la definición de los límites máximos para el residuo se toman en consideración los estudios toxicológicos realizados con anterioridad al empleo de los materiales poliméricos. En lo que respecta a las resinas epoxi, los estudios de toxicidad del BFA y su derivado BADGE, han estado orientados hacia los efectos tópicos que inducen al ponerse en contacto con piel y mucosas. De esta manera se han descrito, en algunas ocasiones reacciones locales: dermatitis de contacto, irritaciones mucosas y, a veces, reacciones inflamatorias (Jolanki y col., 1990; Joost y col., 1990). El BFA, parece presentar capacidad fotoalérgica cuando se aplica tópicamente en ratones; como referencia del comportamiento del BFA y otras sustancias sintéticas testadas, se ha utilizado la cumarina, conocido fotosensibilizador (Maguire, 1988; Gerberick y Ryan, 1990). No obstante, trabajos posteriores realizados sobre cobayas no han podido demostrar el efecto fotosensibilizador del BFA (Maguire, 1988) ni del componente de los composites

dentales, el dimetacrilato del diglicidil eter de bisfenol-A (BisGMA) (Rathinam y Mohanan, 1993).

Desde el punto de vista epidemiológico, se han publicado trabajos sobre estos productos en relación con la aparición de alergias ocupacionales en personas que los manipulan. Tal es el caso de los tabajos de Bruze y Almgren (1989), Jolanki y col (1990), van Joost y col. (1990) y Kanerva y col. (1991), en los que indican la presentación de reacciones alérgicas cutáneas provocadas por compuestos derivados del BFA en trabajadores de la industria.

Se ha estudiado, también, la capacidad carcinogénica de las resinas epoxi y sus componentes. Peristianis y col. (1988) evaluaron el potencial carcinogénico de dos derivados del BADGE en ratones, observando un aumento de la incidencia de tumores linforeticulares y hematopoyéticos en las hembras y tumores renales en los machos. Bentley y col. (1989) analizaron los efectos de la administración simultánea de BADGE y de epoxyciclopentileter de BFA, y demostraron la formación de aductos en el DNA de las células cutáneas de ratón al ser expuestas a dosis altas de estos productos. Más recientemente, los trabajos de Atkinson y Roy (1995a, 1995b), han demostrado la formación de aductos en el DNA tras exposición al BFA en ratas.

En lo relativo a teratogenicidad, Morrissey y col. (1987), tras administrar entre 0 y 1250 mg/Kg/día de bisfenol A disuelto en aceite de maíz a ratas y ratones en periodos de gestación comprendidos ente los días 6 y 15, concluyen que la incidencia de malformaciones no se ve alterada por el BFA, si bien el tratamiento con bisfenol en dosis tóxicas para la madre durante la organogénesis produce toxicidad fetal en ratones pero no en ratas, no afectándose el desarrollo morfológico fetal en ambas especies. No obstante, comentan la aparición de síntomas tales como hemorragias vaginales, o disminución dosis dependiente del peso del utero grávido. Por su parte Reed y col. (1985), al administrar BFA oralmente a ratones, observan la aparición en la generación inicial F_0 de una disminución del número de crías por camada, mientras que los machos tratados manifestaban disminución del peso de las vesículas seminales y reducción de la

motilidad del esperma sin comprobar evidencias de lesiones en el tejido del sistema reproductor. En la generación F_1 los machos presentaban reducción significativa del peso de los órganos reproductores con disminución de la movilidad del esperma frente a los controles. La opinión de los autores es que estos problemas relacionados con la reproducción en los machos pueden ser consecuencia del efecto tóxico generalizado del agente químico y no un fenómeno específico sobre tales órganos. Otros estudios posteriores han venido a confirmar la ausencia de teratogenicidad del BADGE (Breslin y col., 1988).

Algunos de los componentes de las resinas epoxi han sido estudiados en diferentes sistemas biológicos con objeto de identificar alguna actividad biológica distinta de la carcinogenicidad o mutagenicidad. En este sentido, el progreso mayor se ha realizado en lo referente a la actividad hormonal de carácter estrogénico atribuida al bisfenol-A.

Aunque en 1936 y 1944 había sido descrito el efecto estrogénico en ratas ovariectomizadas del bisfenol-A y compuestos afines, tal información pasó prácticamente desapercibida hasta 1993, en que Krishnan y col. redescubrieron la actividad hormonal de estos compuestos. Se debe precisamente a Dodds y Lawson (1936), el haber descrito por primera vez la actividad hormonal de compuestos que contienen dos anillos fenólicos. En una publicación en la revista *Nature* demostraron la actividad estrogénica en ratas ovariectomizadas de compuestos difenilos y difenilmetanos que tenían en común la presencia de dos grupos hidroxilo en posición "para". Posteriormente, Reid y Wilson (1944) caracterizaron otros compuestos derivados del 4-4'-dihidroxy difenilmetano con actividad estrogénica, entre los que se incluían variaciones moleculares del bisfenol-A con diferente capacidad hormonal.

Krishnan y col. (1993) demostraron la presencia de un compuesto químico con actividad estrogénica que contaminaba el medio de cultivo para levaduras. Sus resultados experimentales les llevaron a la búsqueda de un mediador de carácter hormonal capaz de transmitir un mensaje entre estos seres unicelulares. Tras estudiar y analizar minuciosamente todos los pasos en la realización de su método

experimental, llegaron a la conclusión de que el agente hormonal se producía al esterilizar en autoclave el agua destinada a producir el medio de cultivo en recipientes de plástico de policarbonato. Al someter este material a 120 °C eluía BFA al agua destilada. Mediante cromatografía lograron identificar el BFA y cuantificar su presencia en el agua destilada, situándola en torno a 2,85 μg por litro de agua. Finalmente, estimaron que BFA a concentración entre 2-5 ppb era biológicamente activo como estrógeno.

El bisfenol-A ha pasado a ser uno más dentro de la lista creciente de compuestos químicos capaces de mimetizar "in vivo" el efecto de las hormonas naturales. Tales compuestos han sido llamados xenobióticos hormonales o xenoestrógenos de forma genérica y xenoestrógenos en el caso de aquellos que semejan el efecto del estradiol-17 β y demás estrógenos naturales.

La identificación de xenoestrógenos parece ser un tarea inacabada, ya que con relativa frecuencia se van presentando nuevas informaciones de carácter experimental que asocian tal actividad hormonal a compuestos químicos muy diversos. La lista de xenoestrógenos podría comenzar con los fitoestrógenos y micoestrógenos -sustancias hormonales de origen vegetal y producidas por hongos- cuya función es desconocida.

En base a todo lo anterior McLachlan (1993) planteó la necesidad de un nuevo punto de vista a la hora de estudiar las repercusiones que la exposición a los agentes químicos inducen sobre los seres vivos. Es lo que él ha denominado "Toxicología Funcional", en la que las sustancias son definidas por su función biológica y por su estructura química. Los productos químicos que entren en contacto, no sólo con el hombre, sino con el resto de los seres vivos, deben ser estudiados, además de por su toxicidad "per se" y por la capacidad de inducir tumores o producir malformaciones, por sus acciones biológicas entre las que se encuentra el efecto hormonal o antihormonal.

Desde entonces se ha incrementado progresivamente la lista de productos químicos con actividad hormonal estrogénica (Brotons 1994; Valenzuela 1996),

a la vez que han sido descritas nuevas formas de exposición humana a estos compuestos (Brotons y col., 1995; Olea y col., 1996), lo que sin duda constituye una aportación de enorme interés desde un punto de vista epidemiológico.

I. RESINAS COMPUESTAS. COMPOSITES DENTALES.

Desde sus tiempos más remotos la Odontología Restauradora ha tenido en la estética dental uno de sus mayores retos, tarea que, sin embargo, ha estado siempre supeditada a la adecuación y disponibilidad de los materiales dentales. Sólo tras la introducción y el desarrollo de materiales de color semejante al del diente fue factible la restitución anatómica, funcional a la vez que estética del diente patológico. En este sentido se puede afirmar que la utilización del cemento de silicato supuso un auténtico hito en la historia de la estética dental. La utilización de este material, descubierto por Fletcher en 1879, constituyó, indudablemente, un avance hacia la consecución del fin estético, ya que superaba al oro en este aspecto y era además más fácil de manipular (Albers, 1988). Las ventajas parece que eran superiores a los inconvenientes: la tendencia a la desintegración en el medio oral, la inestabilidad cromática y la acción tóxica pulpar.

Años más tarde, fue de nuevo el descubrimiento de un material lo que permitió dar un paso adelante a la Odontología Estética. Se trata de los polímeros sintéticos, materiales de gran importancia y de uso en casi todas las esferas de la vida moderna desde hace más de 60 años. Los polímeros son sustancias de elevado peso molecular con carácter catenario. Una cadena de polímero se constituye por pequeñas moléculas o monómeros.

El desarrollo de materiales de obturación basados en polímeros sintéticos se inició por dos razones fundamentales: i) la necesidad de producir un material sin los inconvenientes de los cementos de silicato; ii) el avance de la tecnología de los polímeros que dió como resultado el desarrollo de resinas capaces de fraguar con facilidad a temperatura oral y remedar el aspecto del diente natural, con la ayuda de pigmentos y materiales de relleno.

Las primeras resinas de uso generalizado en Odontología fueron las denominadas resinas acrílicas. Se presentaban con dos componentes en forma de

polvo y líquido preparados para la mezcla. Desde el punto de vista de su composición química, el polvo solía contener el polímero, habitualmente un polimetilmetacrilato y un iniciador, generalmente un peróxido; en la facción líquida se encontraban los pigmentos, el monómero metilmetacrilato (MMA), un agente entrecruzador como el etilenglicol dimetacrilato (EGDMA), un inhibidor de la reacción de polimerización como la hidroquinona, y finalmente el activador de la polimerización, la N, N'-dimetil-p-toluidina. La reacción de fraguado de este tipo de resinas, implicaba una polimerización in situ por radicales libres (Albers, 1988).

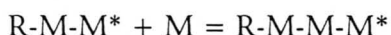
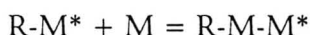
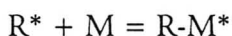
La principal ventaja de las resinas con respecto a los silicatos era su relativa estabilidad en el medio bucal, una vez polimerizadas. La estética, aunque en un principio era superior a la conseguida por los silicatos, con el tiempo dejaba mucho que desear. También eran deficientes su resistencia al desgaste y su estabilidad dimensional, debido a la gran contracción del material tras la polimerización y a su elevado coeficiente de variación térmica, ocho a nueve veces superior al de la estructura dentaria (Baum, 1987).

Intentando paliar estas grandes desventajas, surgió la primera resina clínicamente aceptable, desarrollada por R.L. Bowen en 1958, el dimetacrilato del diglicidileter de bisfenol-A, más conocido como BisGMA, compuesto de mayor tamaño y menos hidrofílico que las resinas de metacrilato previas. Además, este nuevo tipo de resinas se podían reforzar cargándolas con partículas de relleno inorgánico para mejorar las propiedades físicas de las obturaciones. Las resinas así cargadas fueron los primeros materiales dentales que recibieron la denominación de Composites. Su introducción en la práctica odontológica supuso el inicio de una nueva era en la Odontología Estética, y desde entonces la constante investigación y actualización al que han sido sometidas, les han convertido en un material de alto rendimiento clínico y gran versatilidad de uso.

La palabra "composite" significa "hecho de distintas partes". Básicamente, los composites contienen al menos dos ingredientes distintos: i) una matriz orgánica blanda; ii) partículas duras inorgánicas de relleno (Craig, 1993). En

ocasiones la matriz de resina se denomina también fase continua y las partículas de relleno, fase discontinua, dispersa o de refuerzo. Ambos componentes son muy diferentes; entre ellos no existe enlace químico, consiguiéndose su unión a través de la denominada fase de enlace.

La **matriz** de resina del composite está constituida por monómeros, que al reaccionar dan lugar a la formación de la cadena de polímero. A este proceso de conversión de los monómeros en polímeros se denomina polimerización (Noort, 1994). La reacción de polimerización en las resinas utilizadas en Odontología se produce por un mecanismo de "adición", que supone la unión de una especie reactiva a un monómero para formar una especie reactiva mayor capaz de posteriores adiciones de monómeros. En términos simplificados, la reacción puede esquematizarse como sigue:



La especie reactiva inicial se presenta por R^* y las moléculas de monómero por M .

La polimerización por adición de radicales libres es el método utilizado para la síntesis de muchos polímeros dentales (Craig, 1993). Los radicales libres se producen por agentes reactivos denominados **iniciadores**. Se trata de moléculas que contienen un enlace relativamente débil capaz de descomponerse y formar dos especies reactivas, cada una con un electrón no apareado.

Independientemente del monómero base del material, el inicio de la reacción siempre se produce con el concurso de un **activador** que puede ser un proceso químico o un fenómeno físico. En el caso de los materiales quimiopolimerizables, los radicales se obtienen al reaccionar este activador químico (una amina terciaria, la dimetil-toluidina) con el iniciador (peróxido de benzoilo).

En los sistemas activados por calor el peróxido de benzoilo se divide en radicales libres por acción térmica.

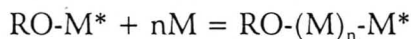
En los composites fotopolimerizables por luz ultravioleta, los radicales libres se generan por absorción de la luz de 360 nm de longitud de onda por un compuesto orgánico, (éter alquil benzoico).

En los composites fotopolimerizables por luz visible, los radicales se generan por absorción de radiación electromagnética de determinada longitud de onda (470 nm) por parte de un fotoiniciador (canforoquinona). Los grupos activados han de ser reducidos por un fotorreductor, que generalmente es una amina, para producir los radicales libres (Craig, 1993).

La mayoría de los monómeros que pueden polimerizarse mediante un mecanismo de adición de radicales son de tipo alqueno, es decir, contienen un doble enlace carbono-carbono como es el caso del MMA y otros monómeros relacionados, los cuales son de particular importancia en Odontología, debido a su frecuente empleo.

La reacción inicial se propaga a nuevas moléculas, quedando finalmente una proporción variable de moléculas insaturadas. El grado de insaturación y el de polimerización están en función de la distancia o profundidad de la superficie irradiada con respecto a la fuente de radiación (Nooth, 1994).

Tras la activación, ya sea química, térmica o por radiación, la reacción de polimerización se inicia cuando el radical formado reacciona con una molécula del monómero. Se produce así una nueva especie reactiva que es capaz de reaccionar con más moléculas de monómero dando lugar a lo que se denomina propagación de la reacción (Noort, 1994), cuya ecuación general puede describirse como



Es posible que la reacción de propagación continúe hasta que se agote el

monómero. Sin embargo, en la práctica, otras reacciones compiten con la reacción de propagación. Estas reacciones producen cadenas de polímeros que no son capaces de mayores adiciones. Un ejemplo de terminación es la combinación de dos cadenas en crecimiento para formar una cadena terminal, o la reacción de cadenas en crecimiento con una molécula de iniciador, impurezas etc, que la conviertan en no reactiva (Albers, 1988).

En cualquier sistema de polimerización por adición, los fenómenos de activación, iniciación, propagación y terminación se producen de forma simultánea, y el polímero resultante se compone de cadenas de diferentes longitudes. Generalmente este tipo de reacciones dan lugar a cadenas lineales. Sin embargo, la adición de alquenos difuncionales en los que cada uno de los dobles enlaces puede polimerizarse en una cadena independiente y de esta forma unir eficazmente dos cadenas, permite la formación de cadenas cruzadas. El agente que produce enlaces cruzados de uso más común para los polímeros de metacrilato es el EGDMA (Roth, 1994).

En el primer composite dental se utilizó una epoxiresina como matriz y partículas de cuarzo fundido convenientemente tratadas. Este material mejoraba las propiedades mecánicas y el coeficiente de expansión térmica de las resinas autocurables, pero presentaba prácticamente la misma contracción de polimerización. Esto se logró con el descubrimiento de un monómero de mayor tamaño inicial, con grupos activos en ambos extremos y que podía dar lugar a la formación de cadenas cruzadas con estructura termofija. Así apareció el Bis-GMA, abreviatura utilizada por Bowen para el 2'2-bis(-4(2-hidroxi-3metacriloxi-propiloxi)-fenil)-propano .

El Bis-GMA se obtiene a partir de 3 moléculas de base: el bisfenol A, el alcohol glicídico, y el ácido metacrílico. La macromolécula se prepara en dos tiempos (Roth, 1994):

1. Alcohol Glicídico + Ac. Metacrílico = Metacrilato de glicidilo
2. Metacrilato de glicidilo + Bisfenol A = Bis-GMA.

Los grupos aromáticos confieren mayor rigidez al polímero final, pero también le otorgan una elevada viscosidad en estado líquido, por lo que generalmente se le suele asociar otro monómero, el trietilen glicol-dimetacrilato (TEGMA) como "diluyente".

En otras ocasiones se han empleado monómeros de tamaño inicial igualmente conveniente sin el recurso del BisGMA. El compuesto más utilizado ha sido el dimetacrilato de uretano (DU), presente en algunos productos comerciales empleados en la actualidad.

Como ya se ha comentado, a la resina base Bis-GMA o al dimetacrilato de uretano se le añaden otros sistemas de resina de cadena más corta y menor peso molecular, lo que les confiere un alto grado de movilidad y un mayor grado de conversión o polimerización. Entre estas resinas diluyentes tenemos la ya citada TEGMA, el metilmetacrilato (MMA) y el etilenglicol-dimetacrilato (EDMA). El grado de conversión de la resina está directamente relacionado con la cantidad de TEGMA e inversamente con la cantidad de Bis-GMA. En general, a mayor grado de conversión mejores propiedades tiene el material (García Barbero y Calderón García ,1995).

Por lo que se refiere a las partículas de **relleno** las más comunes son de cuarzo cristalino, sílice pirolítico (Airosil), silicato de aluminio y litio, vidrio de boro y vidrio de bario. El tamaño de las partículas de relleno varía entre 100 y 0.007 μm .

La adición de partículas de relleno inorgánico a la matriz orgánica (Albers, 1988) tiene por objeto:

1. Disminuir la contracción durante la polimerización.
2. Disminuir el coeficiente de expansión térmica.
3. Aumentar la dureza y resistencia a la compresión.
4. Aumentar la resistencia a la fractura al mejorar la resistencia a la tracción.

5. Disminuir la absorción de agua.
6. Proporcionar una mayor rigidez.

Los composites se diferencian entre sí principalmente por su contenido en relleno inorgánico, siendo esta característica la que habitualmente se utiliza como criterio de clasificación. En este sentido, merece la pena destacar el exhaustivo estudio realizado por Willems y col. (1993), que representa la más completa clasificación de composites. En ese trabajo, se analiza la composición en cuanto a cantidad y tipo de relleno inorgánico, de un total de 89 composites. Estos se clasifican en doce categorías en función a las propiedades físico-mecánicas del material, lo que supone tomar en consideración la composición y el comportamiento mecánico. A continuación se describen las características básicas de los composites siguiendo una clasificación más simplificada en beneficio de la claridad expositiva (Noort, 1994).

A. Composites tradicionales o de macrorrelleno.

Fueron los primeros composites en desarrollarse, también llamados composites convencionales, los cuales estaban altamente cargados con partículas grandes de cuarzo en forma de astillas, de enorme dureza, y con un tamaño medio de partícula entre 10 y 20 μm ., aunque podían alcanzar las 40 μm . La radiolucidez y la tendencia a la fractura motivaron que fueran sustituidos por rellenos con partículas más pequeñas y de óxidos metálicos, principalmente silicatos de litio-aluminio, y cristales de bario.

Este tipo de composites presentaban como principales inconvenientes su baja resistencia a la abrasión, baja estabilidad cromática y alta rugosidad superficial por su deficiente capacidad de pulido (Baum, 1987).

B. Composites de microrrelleno.

La búsqueda de composites con mejores cualidades de pulido, llevó a la comercialización en la década de los 70 de los denominados composites de

microrrelleno. Estos presentan partículas de relleno inorgánico de sílice pirólica muy pequeñas con diámetros que oscilan entre las 0.007 y 0.115 μm ., con una media de 0.04 μm . Estos rellenos reciben el nombre de Airosil. En el mercado existen multitud de variantes de este tipo de composites, debido a que los fabricantes han ideado diferentes métodos para aumentar, en la medida de lo posible, el porcentaje de carga de sus composites de microrrelleno, factor del que depende en gran medida sus cualidades físicas. En general se caracterizan por presentar unas excelentes cualidades de acabado, aunque presentan un coeficiente de expansión térmica poco favorable, menor resistencia a la tracción y menor rigidez, gran tendencia a la absorción de agua y una mayor contracción de polimerización.

C. Composites híbridos.

En el intento de aunar las cualidades mecánicas de los macrorrellenos y las estéticas de los microrrellenos, surgieron los híbridos, que son composites que presentan una combinación variable de carga inorgánica de partícula pequeña y grande, oscilando el tamaño de partícula entre 0.04 y 15 μm .

D. Composites de pequeña partícula.

Es el nombre con el que se designa comúnmente cualquier composite de macrorrelleno con un tamaño medio de partícula menor de 5 μm . Los composites de pequeña partícula pueden ser además, convencionales o híbridos, ya que el término sólo hace referencia al tamaño de macropartícula usado.

Como se ha indicado anteriormente, los composites son formulaciones comerciales que presentan muy variados componentes. Además de la matriz de resina y el relleno inorgánico, otros componentes pueden formar parte del producto acabado. Entre ellos se destacan (Albers, 1988; Noort, 1993; Roth, 1994):

Catalizadores:

- Peróxido de benzoilo (autopolimerizables).
- Eter alquil benzoico (fotopolimerizables con luz ultravioleta).
- Canforoquinona (fotopolimerizables con luz halógena).

Inhibidores:

- Hidróxido de tolueno, que favorece la estabilidad del producto antes de la polimerización.
- 4-metoxifenol.

Aceleradores:

- Amina terciaria: Dimetiltoloudina.

Estabilizadores del color:

- Benzofenonas.
- Benzotiazoles.

Agente de enlace relleno-matriz:

- Silano, concretamente el gamma-metacriloxi-propiltrimetoxisilano, que se adhiere a la fase inorgánica y reacciona con la orgánica, con lo que se consigue una unión química y micromecánica entre matriz y relleno.

2. SELLADORES

Los hoyos y fisuras de las superficies oclusales de los molares presentan una alta susceptibilidad a la caries. La menor efectividad de los fluoruros en la prevención de la caries en esta zona, facilitó el desarrollo desde 1965 del denominado "sellado de fisuras". Esta técnica consiste en la colocación, previo grabado ácido del esmalte, de una resina sobre la tabla oclusal de premolares y molares, con el fin de evitar la aparición de la caries dental. Los materiales utilizados para este fin han sido de lo más variado: desde resinas Bis-GMA (tanto foto como quimiopolimerizables), hasta derivados de barnices de poliuretano (conteniendo fluoruros) y del ácido poliacrílico. Desde entonces, esta técnica, junto con la fluoración, el control dietético y de la placa bacteriana constituyen la base de la actual Odontología Preventiva (Llodra, 1995).

Por lo que se refiere a los selladores basados en el empleo de Bis-GMA, estos difieren básicamente de las resinas utilizadas con fines restauradores en su mayor fluidez. Esta característica es indispensable desde un punto de vista clínico para permitir que el material penetre adecuadamente en los hoyos y fisuras oclusales. Básicamente se logra mediante dos modificaciones introducidas en la preparación comercial de los composites: 1) aumentando la fluidez del Bis-GMA mediante la adición de MMA (Craig, 1993), y 2) disminuyendo considerablemente o incluso no adicionando materiales de relleno inorgánico. Por otra parte, generalmente los fabricantes añaden colorantes como el óxido de titanio, que confiere al material un aspecto blanquecino que facilita su seguimiento clínico.

Los selladores fotopolimerizables endurecen tras exposición a luz visible (halógena de 470 nm.), gracias a que presentan en su composición una dicetona y una amina alifática. El tiempo de exposición a la luz suele ser de 20 seg.

Los selladores quimiopolimerizables se caracterizan por presentar dos componentes: Bis-GMA y peróxido de benzoilo como iniciador, y Bis-GMA y una

amina orgánica como acelerador. Tras mezclar ambos componentes se colocan en la superficie de la pieza dentaria a sellar, en donde finalmente se produce la reacción química definitiva.

Los selladores fotopolimerizables tienen la ventaja sobre los quimiopolimerizables de que el tiempo empleado en su manipulación, aplicación y reacción es menor y puede ser perfectamente controlado por el operador, punto de gran interés teniendo en cuenta que se trata de una técnica que exige la colaboración del paciente y que éste, en la mayoría de las ocasiones, es de corta edad (Craig, 1993).

En general, la reacción de polimerización es también, en este caso, una reacción de adición como en los composites, aunque suelen producirse un menor número de cadenas cruzadas.

Es interesante destacar que, como en el caso del resto de las resinas compuestas, durante la polimerización se produce una capa superficial de inhibición que no reacciona al estar en contacto con el oxígeno del aire (García Barbero y Calderón, 1995), y de espesor variable dependiendo de la formulación comercial del producto. Unterbrink y Muessner (1995) demostraron que el espesor de la capa superficial en la cual puede verse dificultada la polarización "in situ" puede alcanzar los 0.5 mm., ya que encontraron que la máxima dureza del material, y, por tanto, la polimerización más completa, se encuentra a 0.5 mm. de la superficie de la preparación.

3. USO CLÍNICO DE LAS RESINAS Bis-GMA

En la actualidad, las resinas composite constituyen un grupo de materiales de gran versatilidad en Odontología. La industria modifica su formulación, especialmente en lo relativo a la carga de relleno inorgánico, para dar respuesta a un sin fin de necesidades clínicas. Dejando a un lado los selladores de fisuras, utilizados con fines preventivos, la mayoría de los usos son restauradores (Roth, 1994), y básicamente diferenciamos:

- Restauraciones estéticas directas e indirectas
- Confección de muñones
- Confección de carillas estéticas
- Cementado de *inlays*, *onlays* etc.
- Cementos para la fijación de *brackets* ortodóncicos
- Adhesivos dentinarios

4. REACCION DE POLIMERIZACION DE LAS RESINAS COMPOSITE FOTOPOLIMERIZABLES

4.1. FACTORES QUE CONDICIONAN EL GRADO DE POLIMERIZACIÓN

Las cualidades y comportamiento odontológico de los composites fotopolimerizables con luz halógena, de uso mayoritario en la actualidad, dependen de la eficacia del proceso de polimerización. El porcentaje de monómero que se integra en las cadenas de polímero, proceso que viene regido por el grado de conversión (Rueggeberg y Craig, 1988), es dependiente de la transformación de los dobles enlaces entre carbonos ($C=C$) en enlaces simples ($C-C$) (Yoshida y Greener, 1994). Cuando la polimerización es incompleta o inadecuada el producto resultante tiene unas cualidades físicas inapropiadas, debido a la aparición de ciertos fenómenos, entre los que destacan:

- El blanqueamiento o cambio de color debido a la presencia de acelerador que no ha reaccionado y a la mayor absorción de agua.
- La pérdida de retención de la restauración, con posibilidad de aparición de filtración marginal por mala polimerización de las prolongaciones de resina que se adaptan a los prismas de esmalte grabado.
- El excesivo desgaste por pérdida de dureza que resulta del incompleto entrecruzamiento de la matriz de resina.
- La pérdida de la biocompatibilidad de la resina, ya que de ella puede desprenderse el monómero no fraguado (Wu, 1983; Kawaguchi y col, 1994).

De estas consideraciones se desprende la importancia de que se produzca una adecuada reacción de polimerización, ya que condicionará, en gran medida, el éxito clínico de la restauración.

Los factores de los que depende el grado de conversión, y por lo tanto, la calidad de la reacción de curado (transformación del monómero en polímero) del composite son los siguientes:

A. Tiempo

El tiempo mínimo necesario de incidencia de la luz de polimerización sobre una capa de 2 mm de grosor para una resina composite es de 40 seg. A esta fase de la reacción de polimerización se le denomina fase lumínica. La fase oscura, que comienza al concluir la radiación, es independiente de la presencia de luz y continúa, al menos, durante 24h. En el estudio de Leung y col. (1983) se demuestra que un 50% de la polimerización de la resina, medida a través del grado de dureza superficial del material, tiene lugar durante la fase oscura.. En la mayor parte de los composites se alcanza la máxima dureza a los 7 días, aunque el 90% de ésta ocurre en las primeras 24 horas.

B. Color del composite

Los tonos más oscuros de composite requieren más tiempo de polimerización y experimentan un fraguado menos profundo que los más claros (Kawaguchi y col., 1994). Swartz y col. (1983) demostraron que un tono oscuro presenta a 1 mm de profundidad una dureza del 63% frente al 84% que alcanza un tono claro. A 2 mm de profundidad los tonos más oscuros están incluso demasiado blandos para ser medidos. En general, se admite que los tonos oscuros deben polimerizarse durante 60 seg a una profundidad máxima de 0.5 mm.

C. Temperatura

El fraguado es menor si, tras la aplicación, el composite mantiene la temperatura de almacenaje (4-8 °C). El incremento de la temperatura favorece el fraguado más completo y rápido (Albers, 1988).

D. Espesor de la capa de composite

Se ha demostrado que siete días después de haber polimerizado durante 40 seg. un composite de tonalidad clara, el porcentaje de curación a una profundidad de 1 mm. (medido según la dureza) es del 68 al 84% del porcentaje de curación obtenido en superficie. A mayor profundidad se produce una caída significativa en el grado de conversión. Así, a los 2 mm de profundidad, se observa entre el 40 y el 60% y a los 3 mm sólo el 34% de la conversión alcanzada en superficie (Swartz y col., 1983). Por esto, se recomienda, en general, no polimerizar capas superiores a 1 mm de grosor.

E. Tipo de relleno

Los composites de microrrelleno presentan mayor dificultad para la polimerización que los de macrorrelleno. En general, cuanto mayor es la carga de relleno inorgánico más fácilmente polimeriza, en primer lugar, porque presentan menor proporción de matriz de resina, y en segundo, porque muchas veces los cristales de relleno sirven para transmitir la luz a través del material. Kawaguchi y col. (1994) demostraron que los composites de micropartículas presentan un menor coeficiente de transmisión y menor profundidad de curado, frente a los híbridos y a los composites de pequeña partícula, observaciones que se justifican por las diferencias en el tamaño de las partículas de relleno inorgánico. Además, la diferencia entre el índice de refracción de la resina y el del relleno determina la cantidad de luz perdida por refracción. Los fabricantes que consiguen que la resina y el relleno tengan un índice de refracción más próximo, pueden ofertar materiales que polimerizan a mayor profundidad (Tirtha, 1982)

F. Concentración del iniciador

La cantidad en la que se encuentra el iniciador debe ser la óptima para que la reacción pueda producirse en su totalidad (Craig, 1993), aunque un exceso puede afectar al cromatismo del composite (Taira, 1989; Yoshida y Greener, 1994), ya que una alta concentración puede otorgar un tono amarillento al mismo.

G. Distancia del foco de luz a la resina

La distancia óptima entre el foco de luz y el composite es menor a 1 mm, manteniendo la fuente de luz perpendicular a la superficie del composite. Si se dobla esta distancia, la intensidad del fraguado puede disminuir a una cuarta parte, ya que la luz se disipa proporcionalmente al cuadrado de la distancia (Noort, 1994). Esto podría afectar a la profundidad del fraguado, que depende tanto del tiempo de irradiación como de la intensidad de la fuente lumínica.

H. Calidad del foco de iluminación

No sólo es importante que la intensidad de la fuente de luz sea correcta sino también que emita dentro de una gama de longitudes de onda que abarque la banda de absorción del activador y la frontera del ultravioleta, es decir, una gama comprendida entre 350 y 550 nm con una intensidad máxima localizada alrededor de los 480 nm (Roth, 1994; Noort, 1994). En estos últimos años se ha dado una gran importancia al estado de la fuente lumínica por su relación con la profundidad y calidad del curado del composite. La valoración de las lámparas de polimerización se realiza con radiómetros, aparatos que permiten cuantificar la intensidad de la luz emitida por la lámpara (Shortall y col., 1995). Es de esperar que en el futuro todas las unidades de polimerización incorporen radiómetros que permitan la valoración periódica de su eficacia.

En relación con la calidad del foco de iluminación, una línea de investigación de máxima actualidad es la que intenta valorar la influencia de la intensidad de la fuente luminosa sobre factores tales como vectores de la contracción de polimerización, módulo de elasticidad final del composite e incluso, adaptación marginal. En este sentido Unterbrink y Muessner (1995) publicaron un interesante estudio en el que comparaban el comportamiento de dos marcas comerciales de composites al ser polimerizados con dos lámparas, una de baja y otra de alta intensidad lumínica (250 y 450 mWcm⁻², respectivamente). La alta intensidad trae consigo un mayor módulo de elasticidad final del composite, y se ha demostrado que el mayor módulo de elasticidad incrementa el estrés de

polimerización (Feilzer y cols., 1990), lo que explicaría el incremento en el desajuste marginal de restauraciones de Clase I cuando el composite recibe intensidades de luz elevadas. Sin embargo, los autores citados demuestran que para un tiempo de polimerización de 40 seg., y simulando las condiciones intraorales de temperatura, las dos intensidades luminosas consiguen polimerizar el material de igual manera a profundidades de 4,5 mm.

4.2. EVALUACION DEL GRADO DE CONVERSION

La calidad de la reacción de polimerización ha preocupado a la Odontología fundamentalmente por la correlación que existe entre la conversión y las cualidades mecánicas del material (Yoshida y Greener, 1994), que, como ya hemos apuntado, tienen mucho que ver con el éxito clínico de la restauración. Tanto es así, que en algunos trabajos como los de Tirtha (1982) o Leung (1983) se valora la reacción de fraguado a través de un parámetro físico, la dureza. Concretamente, se mide la dureza que alcanza el material a distintas profundidades correlacionándola con el grado de polimerización a esa profundidad.

Además de la valoración del aspecto y cualidades físicas del composite polimerizado, se han empleado con frecuencia otros métodos analíticos para la estimación del porcentaje de conversión, basados en la cuantificación del monómero que queda libre sin reaccionar. Dentro de este apartado caben destacar la Espectrometría con técnicas de reflexión interna múltiple (MIR), (Vankerckhoven y col. 1982; Kildal y Ruyter, 1994), de resonancia magnética nuclear (NMR) (Vankerckhoven y col. 1981), y de cromatografía en sus distintas variantes.

La cromatografía se ha empleado como instrumento eficaz para evaluar el proceso de conversión del material polimerizable, la reacción de polimerización, el grado de conversión, la liberación pasiva de monómeros libres y la determinación en medios físicos o biológicos de componentes del producto comercial que eluyen una vez finalizado el proceso de curación.

La utilización de la Cromatografía en Odontología, tiene sus primeros antecedentes en trabajos en los que se valoraba la cantidad de monómero libre en resinas acrílicas. La puesta en marcha de este tipo de estudios se debía a la evidencia clínica de reacciones de hipersensibilidad en algunos pacientes a los compuestos químicos liberados por la base de resina de su prótesis. En este sentido, cabe destacar el trabajo de McCabe y Basker (1976), en el que se describe un método, de cromatografía de gases, útil para determinar el porcentaje de monómero residual en resinas acrílicas, y que permite además la identificación de dicho monómero. Otros antecedentes en el empleo de la cromatografía de gases son los trabajos de Austin y Basker (1980) y el de Harrison y Huggett (1992).

También se ha utilizado la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en el análisis de muestras acuosas de eluidos procedentes de resinas acrílicas, estableciéndose las condiciones cromatográficas idóneas del proceso (Koda y col., 1989; Hongo y Sato, 1995).

De enorme interés es el estudio de Baker y col. (1988), en el que por primera vez se cuantifica en **saliva** la presencia de metilmetacrilato procedente de elementos fabricados con resinas acrílicas y puestos en boca de voluntarios con fines experimentales. En este caso, se utilizó la cromatografía de gases para su detección y cuantificación. Se puso de manifiesto la inestabilidad de este monómero en saliva, y se estableció su dependencia de la temperatura, puesto que la vida media del MMA en saliva a 37 °C fue de 1,2 horas, disminuyendo su concentración a un 10% de la original al cabo de 19 horas a esta temperatura. Sin embargo, el monómero permaneció estable en saliva conservada a -70 °C.

Por lo que se refiere el estudio específico de las resinas composite, prácticamente se han utilizado las mismas técnicas cromatográficas que con las resinas acrílicas. En algunos casos, se trata de caracterizar las resinas en distintas presentaciones comerciales, e identificar los monómeros contenidos (Vankerckhoven y col. 1981); en otros estudios, el interés va dirigido a la valoración del grado de conversión de los monómeros. Rueggeberg y Craig (1988) concluyen que, frente a FTIR-Espectroscopía (Fourier Transform Infrared

Spectroscopy), que sin duda es un método muy fiable para la valoración de este parámetro pero con el inconveniente de que la muestra se pierde, y por tanto, no es posible proseguir su estudio, el método indirecto más fiable para valorar el grado de curación de los polímeros es el test de dureza Knoop. Este test físico, sin embargo, es muy complejo de realizar lo que sin duda supone un inconveniente a la hora de sistematizar el estudio de estos materiales. Por estos motivos, los estudios de liberación de monómero libre, en los que mediante técnicas analíticas se cuantifica el paso a un determinado medio de sustancias que eluyen desde el material, constituían un instrumento eficaz en este tipo de trabajos.

Es un hecho comprobado que todos los componentes presentes en los composites dentales pueden eluir al medio donde se encuentran (Rathburn y col. 1991; Pham y Ferracane, 1989). Sin embargo, la eficacia del proceso de elución es dependiente del medio en el que se ha producido. Los solventes orgánicos son más efectivos que el agua para la extracción del monómero residual, debido a su mayor capacidad de penetración en las redes poliméricas. Así por ejemplo, en lo que se refiere a la cantidad de monómero eluído en agua, Inoue y Hayashi (1982) encontraron que representaba entre el 0,5 y el 1,2% del peso inicial del composite, datos confirmados posteriormente por Ferracane y Condon (1990), que lo cifraron entre un 1,5 y un 2%, para muestras de composite y resina sin relleno. Estos datos sugieren que sólo el 10% del monómero residual puede ser extraído por el agua. Tanaka y col. (1991) cifraron este dato entre un 2 y un 7%.

Los disolventes orgánicos son mucho más eficaces en la extracción de los componentes libres en las resinas polimerizadas. Se han descrito porcentajes de elución del 4,5 al 11% para composites sumergidos en distintos tipos de solventes orgánicos durante un periodo de 7 días (Rahbourn y col., 1991).

Es interesante el destacar que los resultados de los estudios de Inoue y Hatashi (1982), Tanaka y col. (1991) y Ferracane y Condon (1992) apoyan la hipótesis de que sólo un 10% de los grupos metacrilato que permanecen en el composite sin reaccionar son extraíbles, ya que a pesar de un bajo grado de conversión en este tipo de resinas de uso habitual en Odontología, la mayoría de

los monómeros están "atrapados" en las redes poliméricas del material, lo que sin duda dificulta su elución.

La dinámica de elución de estos compuestos también ha sido objeto de estudio. La pérdida de monómero suele ser rápida en un primer periodo de almacenamiento (de horas), para luego enlentecerse siguiendo progresivamente una curva logarítmica (Ferracane y Condon, 1990). Según Ferracane (1994), los factores que afectan al grado de elución son básicamente dos:

1. La cantidad de monómero libre, que está en relación con la calidad de la reacción de polimerización. Concretamente Rueggeberg y Craig (1988) demostraron una excelente correlación inversa entre el grado de curado y el porcentaje de elución.

2. Las características químicas del disolvente. En concreto, el uso de soluciones conteniendo 75% de etanol/agua parecen ser los mejores solventes para el composite. Probablemente la cavidad oral constituya un medio con una capacidad de extracción intermedia entre el agua y los solventes orgánicos.

Finalmente, otro aspecto que resulta relevante para nuestro trabajo se refiere a la estabilidad de la matriz polimérica y la formación de subproductos de su degradación. Oysaed y col. (1988) usando HPLC y detector ultravioleta (UV) demostraron la producción de formaldehído desde muestras químio y fotopolimerizables almacenadas en agua durante 115 días. Por su parte, Koda y col. (1990) comunicaron la producción de ácido metacrílico durante la degradación de resinas de polimetilmetacrilato usadas en prótesis. Resultados similares se han obtenido en trabajos donde muestras de composite han sido expuestas a soluciones que contenían enzimas. Concretamente, esterazas inespecíficas y enzimas presentes en la saliva pueden alterar la matriz orgánica de los composites dentales liberando ácido metacrílico (Munksgaard y Freund, 1990).

Experimentalmente se ha demostrado que las superficies de composite expuestas a esterasa hepática de cerdo durante 48 horas, sufren un significativo

reblandecimiento junto a un incremento en el grado de desgaste cuando son testadas "in vitro" (Freund y Munksgaard, 1990; Larsen y Munksgaard, 1991). La degradación enzimática de resinas derivadas del dimetacrilato ha sido también demostrada por Yourtee y col. (1992), aunque los efectos biológicos derivados de la producción de estos bajos niveles de ácido metacrílico no han sido aún valorados. Por último cabe destacar que, en la revisión bibliográfica realizada hemos comprobado que en este tipo de trabajos se valora exclusivamente la liberación al medio externo, físico o biológico, de ácido metacrílico, sin considerar en absoluto que ocurre con el resto de moléculas que constituyen el monómero BisGMA. Se hace necesario estudiar este aspecto e investigar las repercusiones que, desde un punto de vista biológico, supone el paso de estas sustancias al medio oral.

5. ANTECEDENTES EN EL USO DE TECNICAS CROMATOGRAFICAS

Hemos descrito hasta el momento, diferentes materiales poliméricos empleados en la práctica odontológica. Además, se ha revisado la información disponible sobre la eficacia de la reacción de polimerización y la evidencia de la elución de componentes no polimerizados. Como entre nuestros objetivos se encuentra el profundizar en el conocimiento de los procesos que rigen la formación y descomposición del material polimérico basado en los derivados del bisfenol A y el ácido metacrílico, se hace necesario actualizar la información técnica disponible sobre las metodologías cromatográficas aplicables a estos compuestos químicos.

Se han desarrollado hasta el momento actual, un gran número de métodos de preparación, extracción y determinación de los monómeros citados, aplicados a muestras biológicas y alimentos. Una breve revisión de estas técnicas, nos permite comprobar que generalmente los métodos de extracción, se basan en el empleo de disolventes orgánicos debido a la afinidad de estas moléculas por los mismos, en tanto que, los métodos de cuantificación son cromatográficos, ya sea cromatografía de gases (CG) con diversos tipos de detector (llama, captura de electrones, etc...) o bien, en los últimos años y adquiriendo cada vez mayor auge, métodos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Estos últimos presentan, por una parte la ventaja de que en algunos tipos de moléculas como fenoles, difenoles y derivados, ya sea mediante la utilización del detector UV o de fluorescencia, se alcanza un alto grado de resolución y sensibilidad, y por otra, no actúan como técnicas analíticas destructivas.

EXTRACCION DE MONOMEROS

Los derivados fenólicos de bajo peso molecular son las unidades estructurales de gran cantidad de polímeros con funciones plásticas, ampliamente utilizados por la industria en innumerables procesos, entre los que se encuentran

la fabricación de recipientes para contener alimentos, materiales "inertes" y de baja conductividad eléctrica o como monómeros constituyentes de materiales de uso en clínica: entre éstos destaca su empleo en la preparación de los composites y selladores dentales.

Las determinaciones analíticas de alguno de estos monómeros como son el bisfenol-A, bisfenol-F, p-nonilfenol, p-tercoctilfenol, etc... se resuelven generalmente por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Esta determinación viene precedida de una extracción y purificación previa de la muestra en la que intervienen disolventes orgánicos. En este sentido, Henriks-Eckerman y Laijoki (1988) determinaron mediante HPLC la epoxi resina del diglicidileter del Bisfenol-A (BADGE), tras la extracción de los monómeros libres con acetona en períodos de tiempo de uno a varios días y a temperatura ambiente. El rendimiento de extracción de estos monómeros se sitúa por término medio en el 90%, observación confirmada en una revisión muy amplia de la solubilidad de estos polímeros en disolventes orgánicos, tomando como referencia el tetrabromobisfenol A policarbonato, por Beck (1992). Así, de un total de 103 disolventes orgánicos ensayados, es interesante resaltar el alto grado de solubilidad que presenta el polímero en cloroformo, frente a la poca capacidad de solubilización de los monómeros en hexano, metanol y tolueno entre otros.

Una de las experiencias más completas sobre la extracción y determinación de monómeros en resinas epoxi es la presentada en numerosas publicaciones por el Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela. Su objetivo principal es el estudio de la degradación que pueden sufrir estas epoxiresinas cuyo monómero principal es el BFA y su paso al alimento contenido en los envases tratados con este tipo de resinas. Como simulantes para la comprobación de la migración de estos monómeros, utilizan los recomendados por la Legislación Alimentaria Española (RD 211/ 1992) los cuales son: ácido acético al 4% (v/v), H₂O destilada y etanol al 15% (v/v). Los trabajos los realizan en períodos de tiempo controlados y temperaturas medias de 40°C. Para la extracción de los monómeros proponen la elución del oligómero 340 a través de un cartucho Sep-Pack de C₁₈ con metanol,

(Paseiro y col., 1991). La optimización del proceso, les han llevado al estudio de otros agentes de extracción como es el empleo de mezclas cloroformo:metanol 25:75 (v/v) manteniendo la muestra en reflujo durante 10 horas. Con este procedimiento junto con el BADGE logran también la extracción del m-xilenodiamina (m-XDA), (Paseiro y col. 1991).

Recientemente nuestro grupo de trabajo ha desarrollado un método de extracción de Bisfenol A mediante el empleo de cloroformo como solvente. El mayor rendimiento se obtuvo con la adición de metanol para la precipitación de las proteínas contenidas en muestras orgánicas, aunque, en ocasiones una simple filtración fue suficiente para eliminar los componentes del líquido de cobertura de los alimentos, antes de proceder a la extracción líquido-líquido (Brotons y col., 1995). Los porcentajes de recuperación fueron en todos los casos superiores al 90% en muestras marcadas.

DETERMINACION POR CROMATOLOGRAFIA LIQUIDA

La estructura química de los monómeros de los composites basados en el BisGMA presenta cierta similitud con otros compuestos químicos de conocida actividad biológica. Así, por ejemplo, ciertos estrógenos sintéticos del tipo de los estilbenos son estructuralmente parecidos al monómero BFA. Dada la sospecha de que BFA y compuestos afines estén dotados de la capacidad hormonal atribuida al dietilstilbestrol (DES), hemos creído conveniente revisar en esta introducción la metodología analítica más apropiada para la determinación de los bisfenoles, estilbenos y estrógenos naturales.

La estructura química de los bifenoles justifica ampliamente el desarrollo de técnicas de cromatografía líquida para su análisis cuantitativo, de un aparte porque presentan absorbancia en la región ultravioleta del espectro y de otra porque en ocasiones resultan además fluorescentes, lo cual lleva consigo el poder adaptar un detector muy sensible al cromatógrafo de líquido de alta resolución. Al revisar los antecedentes bibliográficos se encuentra con frecuencia el análisis de moléculas con comportamientos biológicos cercanos a los que se están estudiando

en esta Memoria, si bien desde el punto de vista estructural son diferentes. Es el caso de productos como el DES, fitoestrógenos o bien hormonas como estradiol-17 β o estrona. Así, Tscherne y Capitano (1977) desarrollaron un método de HPLC, que les permitía la separación de compuestos esteroídicos procedentes de productos farmacéuticos como pueden ser vitamina D₂ y D₃ o bien estriol, equilin, estrona, estradiol, etc..., sustancias que hasta ese momento no era fácil separar. Se utilizó una columna C₁₈ y en la fase móvil (metanol:agua) introdujeron nitrato de plata lo que les permitió una gran resolución.

Por cromatografía en capa fina, Wortberg y col. (1978) separaron zearalenol, estradiol, estriol y estrona en alimentos, revelando los productos con un azo-colorante y midiendo las manchas por densitometría. Así se lograron límites de detección del orden de 10 ng, similares a los conseguidos por Verbeke (1979), en el análisis por cromatografía en capa fina y medida de la fluorescencia, en la determinación de productos anabolizantes como benzenestrol, DES, estradiol-17 β , hexestrol, zearalenol, en orina y tejidos de animales sacrificados y de consumo alimenticio. Gottschlich y Metzler (1979) desarrollaron una técnica de HPLC y fase reversa ensayando dos columnas cromatográficas una C₁₈ y otra C₈, que les permite separar y determinar el DES y algunos de sus metabolitos en tejidos animales.

El análisis del estradiol-17 β y sus metabolitos procedentes de medios biológicos fue descrita por Slikker y col. (1981), utilizando un gradiente de elución y columna Lichrosorb-RP-18, y leyendo el detector UV a 280 nm. Obtuvieron 6 fracciones en las que se identifican los distintos estrógenos. Con una columna de naturaleza similar, Aten y col. (1982) desarrollaron un método de cromatografía preparativa de HPLC que les permitía la separación de numerosos estrógenos y sus metabolitos. La columna utilizada era Lichrosorb-diol y la fase móvil cloruro de metilenoisooctano.

De nuevo Verbeke y Vanhee proponen en 1993 un método de análisis por HPLC de DES en orina logrando niveles de detección de 1 ppb; para ello tras la separación cromatográfica, realizan un proceso de oxidación del DES antes de la

medida con detector fluométrico. Por su parte, Medina y col. (1986), utilizando HPLC y en trabajando en gradiente lograron separar y determinar diversos estrógenos, estradiol, estrona, zeranol y DES.

Así hemos visto cómo estas sustancias esteroídicas fácilmente se pueden determinar por HPLC y detector ultravioleta o bien de fluorescencia debido a la presencia de anillos fenólicos en su estructura. Esta particularidad estructural, la cumplen también bisfenoles y sus derivados empleados en las resinas epoxi, razón por la cual es presumible el acierto en la aplicación de estos métodos analíticos en la determinación de los compuestos químicos constituyentes de los composites.

Por último, es necesario comentar que se ha determinado bisfenol-A, bisfenol-F y el diglicidil éter de estas moléculas mediante cromatografía en fase reversa y detector de fluorescencia (Paseiro y col., 1992; Simal y col., 1992, 1993). Henviks-Eckerman y col. (1988), determinaron el glicidil éter del bisfenol A mediante cromatografía líquida en fase reversa con detector ultravioleta a 280 nm a partir de epoxiresinas tratadas con acetona. En esta línea analítica se ha desarrollado por nuestro grupo (Brotons y col., 1995) un método de separación y cuantificación de bisfenol A que utiliza una columna de sílice y detector ultravioleta; como eluyentes se emplean dos fases: una de hexano y la otra de hexano:metanol y 2-propanol. Los resultados son adecuados y en estas condiciones de trabajo, el tiempo de retención del BFA es de 19,2 min. La técnica es fácil de realización, reproducible y puede ser aplicada en cualquier protocolo experimental en el que sea necesaria la determinación del BFA.

6. BIOCOMPATIBILIDAD DE LOS MATERIALES DENTALES

Los primeros intentos de normalizar los estudios sobre materiales dentales datan de 1926, año en el que, a instancias de la American Dental Association (ADA), científicos del National Bureau of Standards (actualmente National Institute of Science and Technology, N.I.S.T.), estandarizaron los test físicos para la evaluación de la amalgama dental.

Durante décadas el gran interés que ha suscitado el análisis de las propiedades físicas de los materiales odontológicos no ha corrido en paralelo con la realización, de estudios donde se establecieran los requisitos de biocompatibilidad que debían cumplir estos mismos materiales (Warfvinge, 1994). Quizás las razones que justifican este hecho sean la gran variedad de test biológicos disponibles y la falta de consenso en su utilización (Craig, 1993).

Por otra parte, la elección de un protocolo único para el estudio de la biocompatibilidad no está exento de dificultades, ya que como afirma Schmalz (1994), ésto supone: 1) la selección de un número apropiado de test a utilizar con el consiguiente esfuerzo y tiempo que ello conlleva, 2) el riesgo de que propiedades concretas no queden recogidas en los estándares propuestos y 3) la necesidad de cambiar los protocolos de estudio cuando los métodos seleccionados queden desplazados por otros con mejores prestaciones.

Se define "biocompatibilidad" como la cualidad de un material que permite ser utilizado en una aplicación específica generando una respuesta adecuada del receptor, entendiéndose ésta, como la ausencia de reacciones adversas del sistema vivo ante dicho material (Schmalz, 1994). Resulta llamativo que el estudio de la biocompatibilidad de los materiales dentales no haya tenido tanto desarrollo como el de otros materiales utilizados en Medicina. Según Tyas (1977) esto puede deberse a que los materiales utilizados en boca "sólo pueden ocasionar daño tisular local, pudiendo ser en este caso más fácilmente eliminados que otros colocados más internamente en el organismo". Afirmaciones como ésta suponen una visión

simplista de los problemas toxicológicos causados por materiales que, en principio, se han considerado inertes. La posibilidad de eliminar el material en contacto con los tejidos orales de forma simple no implica que no haya riesgo de daño, ya que tanto la ingesta como la absorción local suponen una exposición sistémica que debe ser considerada.

El estudio de Dixon y Rickert en 1933 constituye uno de los primeros intentos de diseño de un test único para el estudio de la biocompatibilidad de todos los materiales dentales. En este trabajo los autores proponían la realización de pequeños lechos de tamaño uniforme a nivel del tejido muscular esquelético donde se introducían muestras de idéntico tamaño de la mayoría de los materiales utilizados en la época. Las muestras de la biopsia realizada a los 6 meses eran valoradas microscópicamente. Posteriormente son dignos de mención los estudios de Mitchell en 1959 sobre tejido conectivo y el de Massler en 1958 sobre pulpa dental (Craig, 1993), con el objetivo de evaluar la toxicidad de los materiales odontológicos.

Desde los años 30 hasta la década de los 70 se fueron publicando numerosos trabajos sobre métodos de control toxicológico de los materiales dentales. Ante la dispersión de resultados y metodología seguida en 1972 el Council on Dental Materials, Instruments and Equipment de la American National Standards Institute/American Dental Association (ANSI/ADA), aprobó el documento n° 41 sobre "Recommended Standard Practices for Biological Evaluation of Dental Materials" (1972). El comité que desarrolló este documento reconoció la necesidad de establecer una realización secuenciada de los tests con el fin de reducir, en la medida de lo posible, el número de sustancias a testar en estudios clínicos. En este mismo documento, además de clasificar en grupos los materiales utilizados en Odontología y definir los test que deben superar cada uno de ellos, se establece que "la toxicidad de un material será definida como la medida del daño funcional o morfológico causada a tejidos vivos expuestos a una concentración determinada del producto". En 1982 esta norma se actualizó con la inclusión del test de Ames de actividad mutagénica.

El documento 41 es clave en el desarrollo de la estandarización de los tests biológicos a los que deben someterse los materiales dentales. Entre sus objetivos se encuentra el establecimiento y desarrollo de las distintas pruebas a las que de forma sucesiva deben someterse los materiales. De esta forma se distinguirían tres niveles de ensayos, de complejidad y costo crecientes: un nivel inicial, uno secundario y finalmente, los denominados "test de utilización".

En general, la experimentación con modelos biológicos es imprescindible en el terreno biomédico para poner de manifiesto el comportamiento de numerosos productos químicos previo a su aplicación en seres superiores o bien con la finalidad de prevenir el efecto tóxico de estas moléculas. Tradicionalmente se ha trabajado con modelos animales pero en el momento actual cada vez hay mayor interés por sustituir la experimentación animal por modelos biológicos alternativos. Por esta razón, son cada vez más frecuentes las técnicas "in vitro/en cultivo" que se desarrollan para analizar el comportamiento biológico y toxicológico de productos químicos y fármacos que se lanzan al mercado.

La investigación en el campo de la Odontología también se ha hecho eco de esta tendencia, y en la actualidad se desarrollan un gran número de pruebas biológicas "in vitro/en cultivo". Siguiendo la clasificación anterior se comentaran a continuación, de forma breve, el tipo de pruebas incluidas en los tres niveles descritos de ensayos.

1. Ensayos iniciales

Como ensayos iniciales, se incluyen los test de citotoxicidad, mutagénesis, de capacidad hemolítica y el de dosis letal 50 (LD50).

1.1. Ensayos de citotoxicidad

Evalúan el efecto de los productos que eluyen desde el material dental sobre las funciones metabólicas de un sistema celular. En su diseño se deben considerar:

- El modelo biológico utilizado (Hensten-Pettersen y Helgeland, 1980; Sumitra, 1981; Hume y Mount, 1988; Müller y col, 1990)
- El tipo de contacto entre las células y el material, ya sea de tipo directo, indirecto, mediante extractos, a través de alguna barrera (Hanks y col. 1988)
- El parámetro biológico valorado
- El sistema de evaluación de los resultados

Segun Schmalz (1994) el uso primordial de los test "in vitro" sería el estudio de los mecanismos a través de los cuales se produce el efecto tóxico.

Un aspecto importante en el diseño de un modelo para el análisis de la toxicidad "in vitro/en cultivo" es el relativo a la utilización de líneas celulares establecidas o de células en primocultivo (Hensten-Pettersen y Helgeland, 1981). Mientras que el primocultivo celular supone la utilización de un material tomado en fresco a partir de un tejido, y por tanto, muy similar al que sufre la exposición "in vivo", la dificultad en el desarrollo de este tipo de ensayos ha motivado el empleo de líneas celulares establecidas en cultivo a largo plazo. En este caso, las células presentan una estabilidad y homogeneidad en la respuesta que permite la comparación de resultados en los test de toxicidad de forma sencilla.

Este tipo de test presenta ciertas ventajas e inconvenientes. Entre las ventajas se describen:

1. Permiten analizar aisladamente los efectos sobre una determinada función del metabolismo celular y las condiciones experimentales siempre son controladas.

2. De forma rápida y barata se puede disponer de un gran número de muestras y de resultados

3. Los resultados son cuantificables.

4. Presentan una mayor sensibilidad a los materiales tóxicos "per se" que los "test de utilización".

5. Permiten la estandarización de los estudios.

6. No plantean problemas éticos.

Por otra parte, ciertos inconvenientes limitan sus aplicaciones:

1. Generalmente no se dispone de todas las líneas celulares que constituyen un órgano.

2. Podrían aducirse diferencias entre las células de una línea celular establecida y las de un organismo completo.

3. No valora la respuesta inflamatoria y de otros mecanismos defensivos del organismo en las células en cultivo, ya que carece de sistema inmune.

4. Finalmente, y a consecuencia de todo lo anterior, pueden plantearse dificultades en la extrapolación de los resultados (Tyas y Browne, 1977; Craig, 1993; Schmalz, 1994).

Teniendo en cuenta el parámetro biológico analizado y el propio diseño experimental, dentro de los ensayos de citotoxicidad se pueden distinguir varios tipos de pruebas:

A. Test de proliferación celular. Este tipo de test se basa en la exposición directa de las células, en un medio de cultivo adecuado, al material a testar en condiciones de esterilidad durante un periodo de tiempo variable. Este procedimiento permite determinar si algún componente del material de los que eluyen al medio de cultivo interfiere con la fijación de las células o con su ritmo proliferativo. Estos dos parámetros son cuantificables y la evaluación del efecto se establece al comparar los resultados obtenidos con la respuesta celular del grupo control negativo, esto es, cultivadas las células en ausencia de sustancias químicas a testar y con el control positivo, en el que las células se exponen a un compuesto químico cuya actividad ha sido previamente demostrada.

Se pueden cuantificar funciones celulares tales como la síntesis proteica (Rathbun y col, 1991) o de DNA, mediante la adición de precursores marcados con isótopos radiactivos al medio de cultivo (Hanks y col. 1991; Jontell y col. 1995; Bumgardner, J.D. y Lucas, 1995; Schedle y col, 1995). La evaluación del

grado de proliferación se realiza por conteo de células o mediante técnicas colorimétricas (Skehan, 1990).

B. Test de análisis de la permeabilidad de la membrana celular. En este tipo de ensayos se valora la agresión del tóxico a la integridad de la membrana celular. La medida del daño se realiza utilizando isótopos radiactivos (^{51}Cr , ^3H -Timidina, ^3H -uridina) o bien moléculas que precisan del transporte activo como es el caso del rojo neutro (test de difusión de tóxico utilizando agar o filtros Millipore). La presencia en el medio de los marcadores tras la exposición al tóxico se correlaciona con la lesión de la membrana y la muerte celular (Craig, 1994).

C. Test de la barrera dentinaria. Estos ensayos son de gran interés ya que sus resultados se correlacionan con los obtenidos en los "test de utilización". Técnicamente consisten en la colocación de un disco de dentina que se interpone entre el material a ensayar y las células en cultivo. La dentina ofrece una difusión direccional del material, simulando las condiciones "in vivo" (Hanks y col, 1988).

D. Ensayos de quimiotaxis y de respuesta inmunológica. Son de desarrollo reciente y los resultados que se están obteniendo no están suficientemente contrastados.

1.2 Ensayos de mutagénesis

Este tipo de test biológicos se basan en la detección de los cambios morfológicos o metabólicos que se producen en un tipo celular determinado que ha sido expuesto a un tóxico que alteró su genoma. El Documento nº 41 describe dos: el test de Ames y el de Transformación celular de Styles.

A. Test de Ames. Es el más empleado debido a su relativa simplicidad. Valora el carácter mutagénico de una sustancia a través de la capacidad de transformar una estirpe mutante de *Salmonella typhimurium* que precisa histamina exógena en la cepa original, y que, una vez mutada, no la precisa. Las sustancias químicas que incrementen la frecuencia de mutación presentan una elevada

probabilidad de ser carcinógenos en mamíferos, ya que demuestran tener capacidad de alterar el material genético. No obstante, en la actualidad se acepta que no todos los carcinógenos son mutagénicos y que no todos los mutagénicos son carcinógenos (Tennant, 1987).

B. Test de transformación celular de Styles. Valora la capacidad de un producto químico para transformar líneas celulares de mamífero establecidas en cultivo en el sentido de que sean capaces de crecer sobre agar, capacidad de la que carecen las células no alteradas. Esta capacidad de crecimiento, propia de los fibroblastos alterados, es la única que se correlaciona con la habilidad para producir tumores "in vivo".

C. Test de dominancia letal. También está recogido en el Documento nº 41. A diferencia de los anteriores se trata de un test "in vivo" en el que la capacidad mutagénica se valora por las alteraciones en la espermatogénesis y en las primeras fases del desarrollo embrionario.

1.3 Otros ensayos

Se han utilizado otros tipos de ensayos de muy distinto fundamento biológico. Desde test en los que se valora la capacidad de un compuesto químico para inducir hemólisis (Fujisawa y col., 1978), a ensayos biológicos más complejos en los que se estudia la letalidad animal tras la administración oral o intraperitoneal del compuesto en cuestión. El parámetro evaluado es la dosis del producto capaz de producir la muerte de la mitad de los animales tratados (Dosis Letal 50% o DL50%). Generalmente el compuesto a testar se administra en agua, metilcelulosa en medio acuoso, propilenglicol o aceite vegetal via intraperitoneal u oral a las ratas (Dahl y Becher, 1995). Si la DL_{50} es menor a 1 g/Kg de peso, se considera que el producto presenta toxicidad aguda sistémica.

En relación con este tipo de test resulta interesante el hacer constar que en la introducción de la norma ISO/DIS 10993-11, "Test for Systemic Toxicity", se lee: "Cuando un producto libera constituyentes al organismo, si éstos alcanzan una

concentración suficiente se pueden originar efectos tóxicos sistémicos. Sin embargo, las evidencias clínicas y experimentales con las que contamos en este área son escasas". Esta afirmación supone, como afirma Sune (1994), un reto para la planificación de tests más apropiados, que incluyan la investigación de los efectos generales sobre el organismo humano. No obstante, también trae implícito el ambiente de seguridad de uso de estos materiales, lo que justificaría la ausencia de estudios sobre el metabolismo de los monómeros utilizados en Odontología. Por ejemplo, únicamente se han realizado algunos trabajos sobre los efectos biológicos sistémicos del diglicidileter de BPA (Climie, 1981a, 1981b), a pesar de que Bond y col. pusieron de manifiesto en el año 1980 los efectos sobre la reproducción del BPA, en clara consonancia con Dods y Lawson (1936) y Reid y Wilson (1944) que demostraron la estrogenicidad de ésta y de otras sustancias químicamente relacionadas.

2. Ensayos intermedios o secundarios

Los test descritos hasta el momento suponen una apreciación inicial y de carácter general a la puesta de manifiesto de la toxicidad de los productos utilizados en Odontología. Un segundo escalón en el proceso de identificación de los efectos adversos está representado por los llamados ensayos intermedios o secundarios.

Una vez que se ha reducido el número de materiales con posibilidades de uso en una determinada aplicación clínica mediante la demostración de su toxicidad en los test iniciales, se deben realizar los ensayos encaminados a evaluar la respuesta de tipo inflamatorio o inmunológico, empleando para ello el animal más apropiado.

2.1. Test de irritación de la membrana mucosa

Determinan si el material a estudiar causa inflamación en la membrana mucosa o en la piel irritada de la mejilla del hamster o en la mucosa oral del

conejo. Los resultados se comparan con controles positivos y negativos en, al menos, 10 animales.

2.2. Test de sensibilización cutánea en cobayas

El agente se inyecta subepidérmicamente para valorar su capacidad de inducir reacciones de hipersensibilidad. El grado de reacción inducida y el porcentaje de animales que la muestran son los parámetros a considerar para valorar el potencial alergénico del material (Rathinam y Mohanan, 1993). Una variante a este test es el test de Buehler, en el que se utilizan parches cutáneos. Este tipo de test es frecuentemente cuestionado (Warfvinge, 1994) por su diseño empírico y por la subjetividad de la interpretación de los resultados, por lo que se propone su sustitución por otros ensayos "in vitro" de información rápida tales como el "Lymphocyte blastogenesis assay" o el "local lymph node assay"

2.3. Test de implantación

Se coloca el material a estudiar en contacto con el tejido celular subcutáneo o con el hueso, dependiendo del uso clínico para el que se ha diseñado. Son especialmente útiles en aquellos materiales que se utilizan en implantología o los de uso en endodoncia o periodoncia. Se realizan sobre animales de experimentación adecuados a los que se aplican durante un tiempo variable los materiales a testar. Los animales se sacrifican a las pocas semanas en el caso de que se valoren respuestas agudas o al año o los dos años para estudiar respuestas crónicas o inducción de tumores.

3. Test de "utilización"

En contraste con los test de información rápida, los ensayos de "utilización" identifican los efectos que producen los materiales sobre los tejidos con los que entran en contacto en su uso clínico habitual (Browne, 1994). Estos tejidos son, para el caso concreto de la Odontología, la pulpa dental, la mucosa oral y las estructuras que constituyen el periodonto.

3.1. Test de irritación pulpar

En este tipo de pruebas el material odontológico se coloca sobre cavidades de clase V preparadas en dientes sanos de mono (White y col., 1995) o de otro animal adecuado, e incluso, a veces, se realiza en humanos (Goldberg, 1994), prestando especial atención en la uniformidad del tamaño cavitario. La valoración se realiza a los 3 días, 5 y 8 semanas, mediante la preparación de las muestras para su observación en microscopía. La presencia de fenómenos inflamatorios así como la aparición de focos necróticos y otros hallazgos anatomopatológicos permite establecer la intensidad de la respuesta de la pulpa al material odontológico (Stanley y col., 1979).

3.2. Implantes endoóseos

Actualmente se realizan fundamentalmente tres test para la valoración del éxito o el fracaso de los implantes endoóseos. Son los siguientes:

- Sondaje periodontal
- Movilidad del implante
- Imágenes radiográficas de osteointegración o radiolucidez en torno al implante.

3.3. Test de irritación gingival

Dado que en determinadas circunstancias clínicas los materiales de obturación entran en contacto directo con la mucosa gingival (Hörsted-Bindslev, 1994), es necesario valorar su grado de tolerancia. Mediante la preparación de cavidades de clase V con extensión gingival, y posterior obturación con el producto problema se determina la respuesta tisular a los 7 y 30 días.

7. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ESTROGENICA

Como se ha venido comentando a lo largo de esta introducción, parece demostrada la capacidad de algunos compuestos químicos empleados en la fabricación de materiales odontológicos para mimetizar el efecto "in vivo" de las hormonas estrogénicas. No obstante, hasta la fecha, no se ha realizado ningún estudio formal que trate de identificar cuáles son estos compuestos, cuál es su grado de utilización y, en definitiva, cuál es el nivel de exposición humana a tales estrógenos ajenos al organismo.

Para conocer la importancia real de la exposición humana a xenobióticos estrogénicos es necesario poner en marcha estudios de carácter mixto, básico, clínico y epidemiológico. Estos han de tener como objetivo inicial la identificación de los xenobióticos con actividad estrogénica, y como objetivo último la demostración del coste en salud que pueda suponer la contaminación humana por xenoestrógenos.

El reconocimiento de compuestos químicos con esta actividad hormonal se ha visto dificultada durante años por dos motivos fundamentales: 1) la complejidad y variedad de los tests predictivos de actividad hormonal y 2) la imposibilidad de atribuir a un compuesto químico actividad de tipo estrogénico, tomando como base la simple observación de su estructura molecular.

A pesar del gran interés en la identificación de los xenoestrógenos, son pocos los bioensayos que se reconocen en la actualidad como instrumentos útiles para la identificación de sustancias químicas con potencial actividad estrogénica. Los tests de identificación de un potencial estrógeno más comúnmente empleados se describen a continuación.

Test de cornificación vaginal.

Se basa en la capacidad de una sustancia química de inducir la fase de "estro" cuando se inyecta en un animal, generalmente ratón o rata hembras, previamente castrado. La técnica del test ha permanecido casi invariable desde su descripción por Allen y Doisy (1923), siendo el examen microscópico del epitelio vaginal la forma usual de evaluar la transformación estrogénica del animal receptor. Habitualmente la actividad de una sustancia se expresa en unidades internacionales, siendo la U.Í. en el ratón la cantidad de estrógeno natural capaz de inducir el "estro", que para la estrona corresponde a una dosis de 0,1 μ g.

Test de incremento del peso uterino.

El test de evaluación del peso uterino es útil para la identificación de un potencial estrógeno, capaz de inducir el "estro", mediante la evaluación del incremento del peso uterino tras la aplicación subcutánea de la sustancia estrogénica a un animal hembra inmaduro u ovariectomizado (Astwood, 1938). En la práctica se aconseja utilizar grupos de 6-10 animales para cada compuesto a testar y para los controles, es decir, aquellos animales que reciben tan sólo el elemento de solubilización o vehículo de inyección, que generalmente es aceite vegetal. Se aconseja realizar el tratamiento del animal mediante inyección diaria durante tres días y sacrificio al cuarto día. Al final de este periodo, los úteros son extraídos tras el sacrificio del animal, eliminando el tejido parametrial y grasa y a continuación pesados. Las diferencias de peso frente a grupos de úteros control, esto es, no tratados, sirve para cuantificar el efecto e identificar al estrógeno.

Test del enlace competitivo con el receptor estrogénico.

El ensayo competitivo se basa en el hecho de la demostración previa de la existencia de una proteína conocida como el "receptor estrogénico" (RE) aislada en aquellos tejidos subsidiarios de la acción estrogénica, a la cual se unen, específicamente, estrógenos naturales y aquellas sustancias con probada acción hormonal (Jensen y col. 1962). Se ha defendido durante los últimos años la

hipótesis de que tras la unión del estrógeno al receptor estrogénico se produce una alteración conformacional de éste último, el cual queda capacitado para unirse al ADN intranuclear desencadenando la expresión de ciertos genes relacionados con la síntesis proteica y la proliferación celular. El ensayo fue descrito para su uso "in vivo" pero fue posteriormente adaptado al laboratorio.

- Técnicamente exige para su realización la extracción de la fracción proteica soluble -citosol- del citoplasma celular de células aisladas de un tejido estrógeno dependiente, generalmente útero de rata. Mediante ultracentrifugación del homogenizado celular se obtiene el citosol que contiene el receptor estrogénico, el cual es incubado durante un tiempo variable de 30 minutos a 18 horas con la sustancia a testar y un estrógeno natural marcado radiactivamente, generalmente estradiol-17 β marcado con tritio. Se establece durante el tiempo de incubación una competencia entre el potencial estrógeno y el estradiol-17 β marcado para unirse al receptor estrogénico. Finalmente, las fracciones libre y ligada son separadas y medidas en un contador de centelleo líquido. En definitiva, el ensayo evalúa la capacidad de desplazamiento por parte del estrógeno potencial de la unión del estradiol a su receptor específico.

Desafortunadamente, aparte de medir la afinidad por el receptor estrogénico, este test es incapaz de distinguir un agonista de un antagonista estrogénico.

Ensayos con células estrógeno-dependientes.

Son tests en los cuales se emplean células de cáncer de mama de origen humano, establecidas en cultivo y tratadas con diferentes concentraciones de estradiol-17 β o cualquier compuesto químico sospechoso de ser un estrógeno. Generalmente, finalizan con la cuantificación de la proliferación celular tras varios días de subcultivo, estableciéndose los controles mediante el mantenimiento de grupos celulares en medio libre de estrógenos. El ensayo E-SCREEN utilizado en el presente trabajo es un ejemplo de este tipo de tests funcionales.

Además de la evaluación de la proliferación celular se han propuesto ensayos en los que el efecto estrogénico se determina por la activación de ciertos genes cuyo producto proteico es cuantificado o su actividad enzimática puesta de manifiesto.

A. El ensayo cat

El test de expresión del gen de resistencia al cloranfenicol, inducido tras la translocación nuclear y unión a las secuencias específicas del ADN del complejo estrógeno-receptor, ha sido propuesto para la identificación de los estrógenos (Korach 1993).

B. Vitelogenina como biomarcador

La vitelogenina es una lipoproteína inducida por esteroides. Se sintetiza en el hígado bajo el control de estrógenos. Este hecho ocurre en hembras pero en determinadas condiciones también se puede inducir esta síntesis en machos.

Mediante la utilización de vitelogenina y proteínas relacionadas como el factor von Willebrand se puede desarrollar un ensayo aplicable a diferentes especies tanto de peces como de mamíferos. Heppell y col. (1995) han generado anticuerpos específicos para reconocer vitelogenina generada por especies acuáticas expuestas de forma accidental a xenoestrógenos. En consecuencia a través de esta experiencia se puede establecer un nuevo biomarcador de contaminación estrogénica.

C. Lactoferrina como biomarcador

La lactoferrina se está proponiendo como biomarcador en los mamíferos expuestos a xenoestrógenos de forma similar al comportamiento de vitelogenina en el caso de peces y reptiles. Teng (1995) propone que, basado en su sensibilidad para estrógenos, el gen de la lactoferrina en útero de rata puede ser un marcador válido para medir los efectos de los químicos estrogénicos. Es posible el uso del

RNAm-lactoferrina y proteínas como marcadores bioquímicos para determinar la dosis y duración de los agentes causales del efecto estrogénico.

D. El test E-SCREEN

El desarrollo metodológico del llamado test E-SCREEN (Soto y col., 1992; Villalobos y col., 1995) ha venido a facilitar el "screening" rápido y fiable de gran número de compuestos en los que se quiere demostrar una actividad hormonal de carácter estrogénico. De forma resumida el ensayo biológico se basa en la evaluación de la actividad proliferativa de un compuesto químico sobre un cultivo celular "in vitro" de células de cáncer de mama humano MCF7. Estas células responden con un incremento significativo del índice proliferativo a la acción exclusiva de los estrógenos naturales en concentraciones picomolares (Soto y col., 1985).

Se cultivan las células de cáncer de mama humano, MCF7, en cajas de cultivo de 24 pocillos. Grupos celulares "control" reciben medio de cultivo (Dulbecco, sin rojo fenol) suplementado con 10% de suero humano, previamente desprovisto de estrógenos. Otros grupos celulares quedan expuestos durante las 144 horas que dura el ensayo a idéntico medio, pero conteniendo además estradiol-17 β (1nM-0.1pM), como control de proliferación positiva, o cualquiera de las sustancias a ensayar (10 μ M-1nM). Transcurrido este tiempo se cuantifica el número de células y se expresa el valor relativo de crecimiento frente al grupo control y al estradiol-17 β .

Se ha recomendado el uso de las células MCF7 sobre otras células mamarias debido al conocimiento previo de su hormono- dependencia (Soto y col., 1985). Estas células fueron establecidas en cultivo por Soule y col. (1973) que las obtuvo a partir de un derrame pleural metastásico en una enferma afecta de un adenocarcinoma mamario de tipo ductal infiltrante. La paciente había sido tratada previamente con radioterapia y hormonoterapia. Estas células MCF7 han tenido una difusión mundial muy importante, siendo hoy día una de las líneas mamarias humanas más empleadas. Su continuo mantenimiento en diferentes laboratorios

ha hecho que se describan durante los últimos veinte años, clones con diferente dependencia hormonal y características proliferativas y antigénicas diferentes.

Las células MCF7 disponibles hoy día pueden agruparse en diferentes clones distinguibles por su comportamiento biológico (Osborne y col., 1987). Unas veces por evolución espontánea, en otras ocasiones por selección clonal planificada, lo cierto es que son muy numerosas las variantes de las células MCF7. En ciertas ocasiones estas variantes (células MIII y LCC1) se han obtenido al reestablecer la línea celular a partir de tumores originados en ratones (Leonessa y col., 1992), otras veces se obtuvieron cultivando las células en medios selectivos (Sublíneas E y D mantenidas en medio suplementado con estradiol-17 β y DES, respectivamente (Butler y col., 1986), la variedad LCC2 derivada de las LCC1 tras subcultivo en medio conteniendo el antiestrógeno hidroxitamoxifeno (Brunner y col., 1993), la variante R₃ que no responde a estradiol-17 β ni a tamoxifeno, la variante R₂₇ obtenida por clonación de la original MCF7 en agar en presencia de OH-TAM (Nawata y col., 1981), las variantes RR (Butler y col., 1986) y RTx₆ ambas resistentes a tamoxifen (Poirot y col., 1990); las células LY-2 cultivadas en medio conteniendo el antiestrógeno LY117018 y que resultaron resistentes a los antiestrógenos (Bronzert y col., 1985). El clon ADR cultivado en medio conteniendo adriamicina y hechas resistentes a este quimioterápico antineoplásico (Kaplan y col., 1990), la variedad MTX resistente al quimioterápico metotrexate (Cowan y col., 1982); el clon R-A1 descrito como resistente al factor tumoral de necrosis TNF (Branellec y col., 1992) y, finalmente, la variedad I13 cultivada en medio conteniendo el emisor radiactivo ¹⁶alfa-[¹²⁵I], yodo-estradiol (Bronzert y col., 1984).

A veces la selección de variantes de MCF7 se ha hecho cultivando las células en medio suplementado con muy bajas, o incluso nula, concentración de suero, la variante MCF7 cultivada en medio libre de suero (Prevost y col., 1991); la sublínea 9 adaptada a medio suplementado sin suero o suplementado con 0.5 a 1% (Laursen y col., 1990). En otras ocasiones se ha aprovechado alguna propiedad particular de las células para clonar a partir de ellas una nueva variedad. Tal es el caso de las células 6/7 que presentan una gran estrógeno dependencia en

la síntesis y secreción de la proteína 52 kDa (Correc y col., 1990); las células MCF7 que muestran receptores membrenarios para estradiol-17 β (Pourreau-Schneider y col., 1984); aquellas otras que crecen en suspensión formando esferoides multicelulares (Olea y col., 1992) o algunas que muestran altas concentraciones de receptores estrogénicos y progestagénicos (Schutze y col., 1993).

Otras células MCF7 han sido transfectadas con genes concretos, como es el caso de las que incluyen copias en su genoma un número significativo de copias de los genes v-ras (Kasid y col., 1985), ras-TD5 (Correc y col., 1990), AZTD5, v-Ha-ras (Berthois y col., 1992), c-myc (Liu y col., 1989), EGF (Cheville y col., 1989) y FGF (Mcleskey y col., 1992). Algunas variedades de MCF7 se han obtenido tras la separación de diferentes tamaños celulares mediante su paso a través de gradientes de Percoll o Ficol, caso de las células K2 cells (Butler y col., 1986; Resnicoff y col., 1987). Otras veces accidentes de contaminación entre cultivos, ocurrida espontáneamente en laboratorios, han sido causa de la obtención de células con cualidades particulares. Este es el caso de los clones CG5 and CG4 (Natoli y col., 1983).

Es interesante reseñar que si bien muchas de estas variantes conservan su capacidad de responder a los estrógenos mediante un incremento de la síntesis de proteínas, muy pocas conservan una respuesta proliferativa al estradiol de carácter significativo (Reiner y col., 1986).

Villalobos y col. (1995), caracterizaron cuatro clones de MCF7 (BUS, ATCC, BB, y BB104) en relación con el estradiol para determinar cual de ellos presentaba el mayor nivel de respuesta. Sus resultados fueron que la más selectiva en este sentido era la cepa BUS ya que en presencia de estradiol-17 β presentaba una tasa de proliferación que superaba en seis veces a la registrada en los controles en ausencia de estradiol, por lo que se ha aconsejado que este clon era el más adecuado para la realización del test E-SCREEN.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Considerando los antecedentes bibliográficos estudiados para el planteamiento de este trabajo experimental, junto con los resultados obtenidos previamente por el grupo de investigación en el que se integra esta Memoria, cabe plantear la siguiente hipótesis de trabajo:

Si en los composites y selladores habitualmente utilizados en Odontología que tienen como base resinas BisGMA, el grado de polimerización no es total, es posible suponer la presencia de monómeros libres con actividad biológica estrogénica en el medio al que se expone el material tras la polimerización “in vitro”, o en la saliva de pacientes a los que previamente se les han sellado las fisuras, suponiendo, por tanto, esta práctica odontológica una fuente adicional de exposición a xenobióticos hormonales.

Por tanto, nuestros objetivos son:

1. Realización de un estudio químico-analítico de composites y selladores dentales de uso habitual que permita la identificación y cuantificación de los monómeros que eluyen al medio acuoso en condiciones experimentales preestablecidas.

2. Identificación y cuantificación de los monómeros presentes en la saliva de individuos a los que se les haya aplicado sellador de fisuras a base de resina BisGMA.

3. Comprobación de la actividad biológica estrogénica de los monómeros identificados, tanto “in vitro” como “in vivo” .

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL

I. MATERIAL UTILIZADO EN CROMATOGRAFIA

I.1. INSTRUMENTACION Y MATERIAL FUNGIBLE

Cromatógrafos

El cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) utilizado ha sido un Konik, modelo KNK-500 A Series unido a un detector Konik UVIS-200 y un integrador HP-3394A. También se ha utilizado un Perkin Elmer 250 con dos bombas y un inyector automático de Waters modelo 717 Plus Autosampler. El detector Ultravioleta/Visible es del tipo Diode Array 235, con un integrador acoplado modelo Penelson 1020.

Columnas para cromatografía

La columna utilizada para HPLC fue una C-18 de la serie Symmetry de Waters, de dimensiones 4,6x250 mm y con un tamaño de partícula de 5 μ de ODS (Odtadecilsilicato).

Cromatógrafo de Gases-Espectrómetro de Masas

El Cromatógrafo de gases utilizado ha sido un Carlo Erba Fisons 8000 unido a un espectrómetro de masas Platform Fisons VG. Esta fase del estudio se ha realizado con la colaboración de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada.

Equipo de filtración para HPLC

Los solventes utilizados en HPLC fueron previamente puestos a punto mediante tratamiento con un equipo de filtración aplicado sobre un kitasato de Millipore.

Microjeringas

Las microjeringas utilizadas para HPLC son del modelo Hamilton con un volumen de 50 μ l de capacidad.

1.2. REACTIVOS

Reactivos para cromatografía

Se han utilizado los siguientes reactivos específicos para HPLC, de Panreac (España): Acetonitrilo, alcohol etílico absoluto y metanol. También se utilizó agua desionizada, bidestilada y filtrada en los ensayos que así lo requirieron.

Compuestos químicos patrones

Se utilizaron los siguientes productos de Aldrich:

- Bisfenol A (BFA) (nº de referencia 23,965-8)
- Etoxilato de BFA (EBFA) (nº de referencia 40,984-7)
- Propoxilato de BFA (PBFA) (nº de referencia 40,986-3)
- Metacrilato de BFA (BisDMA) (nº de referencia 15,632-9)

Por lo que se refiere al BADGE nos lo suministró el Dr. Paz Abuín del Departamento de Investigación de Gairesa, con una pureza del 99.95%. El Bis-GMA (NUPOL), se consiguió a través del representante en España de una multinacional fabricante de composites.

2. MATERIAL ODONTOLOGICO

2.1. INSTRUMENTACION Y MATERIAL FUNGIBLE

Lámpara de polimerización

Para la polimerización de las muestras de composite y de los selladores se utilizó una lámpara Optilux VCL-300 de la casa Demetron Research Corporation. Para comprobar su eficacia se procedió a medir su potencia lumínica, dando unos valores medios de 435 mW/cm².

Radiómetro

Para la medición de la intensidad lumínica de la lámpara de polimerización se empleó un radiómetro modelo 100, de Demetron Research Corporation, con el n° de serie 118427.

Equipo dental

La aplicación de los selladores sobre la serie de pacientes se realizó en un equipo Siemens modelo Sirona A1.

Contraángulo

La limpieza previa de las piezas dentarias a la colocación del sellador se realizó mediante cepillo de profilaxis montado en contraángulo convencional de la marca Kavo.

Moldes de polimerización

Para la confección de las muestras de composite polimerizado se utilizaron cilindros de cristal de 1 cm. de altura por 0.5 cm. de diámetro, los cuales

permitieron que todas las muestras presentaran una misma forma geométrica.

Placas de Petri

Se utilizaron placas de Petri soplada de vidrio neutro de 60 mm de diámetro y 15 mm de altura sobre la que se situaba el cilindro con el composite para su posterior polimerización a través del cristal, lo que aseguraba que la distancia de la muestra al foco permaneciera constante en todas las muestras.

Material de mano

Para la manipulación del composite se empleó un instrumento plástico Ceramicolor CS6 A-B 2c de la casa ASH.

Para las exploraciones y la colocación de los selladores se utilizaron espejos M10 (de 2.2 cm. de diámetro, plano) y sondas Exp5 de la casa Nordent SST, previamente esterilizados en autoclave.

Rollos de algodón

Para el aislamiento relativo en la colocación del sellador de fisuras en los voluntarios, se utilizaron rollos de algodón del n° 2.

Cepillos de profilaxis

Para la limpieza previa de las caras oclusales, se utilizaron cepillos de profilaxis 10/n°835 RA/PA de la casa Hawe-Neos Dental.

Botes de recogida de muestra

Se utilizaron botes de cristal esterilizables de 3 cm. de diámetro en su boca y 60 cm³ de capacidad.

3. MATERIAL UTILIZADO EN CULTIVOS CELULARES

3.1. INSTRUMENTACION Y MATERIAL FUNGIBLE

Estufa para cultivos celulares

Para poder llevar a cabo los experimentos biológicos, se empleó un incubador marca ASSAB (Estocolmo, Suecia), modelo t-304, con termostato y regulador del flujo de dióxido de carbono automáticos. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37°C, en aire con un 5% de CO₂ y saturado de humedad. Esta saturación de vapor de agua se logró haciendo burbujear el CO₂ inyectado en el incubador, a través de dos cubetas con agua destilada.

La exactitud del sensor térmico era de ± 0.05 °C. y las variaciones de temperatura en el interior de la estufa no superaron los ± 0.3 °C. El sensor que regulaba la presión parcial de CO₂ está basado en la medida de la conductividad térmica de la mezcla de gases, y su sensibilidad se situaba en torno a $\pm 0.1\%$.

Cámara de flujo laminar

Para prevenir y evitar la contaminación biológica de los cultivos celulares durante su manipulación se ha utilizado una cabina de flujo laminar modelo Gelaire, Laminar Airflow, suministrada por Flow Laboratories (Irvine, Escocia). En ella, el aire, antes de entrar en la cabina, se filtra con un rendimiento de 99.997% de retención de todas las partículas mayores de 0.3 μm . de diámetro, lo que garantiza el mantenimiento de las condiciones de esterilidad necesarias para llevar a cabo las experiencias.

Microscopio invertido

Para la observación de los cultivos se ha utilizado un microscopio invertido Olympus IMT-201 dotado con tres objetivos de diferentes aumentos, 10x, 20x y

40x, doble ocular y ocular con posibilidad de aplicación de un dispositivo fotográfico para el registro gráfico de imágenes.

Microscopio óptico

Se ha utilizado un microscopio óptico OLYMPUS CH dotado con cuatro objetivos, 4x, 10x, 40x y 100x, doble ocular y dispositivo automático de precisión para el desplazamiento de las muestras.

Cámara de Neubauer

Para el conteo de los elementos celulares en suspensión, se ha utilizado un hemocitómetro convencional o cámara de Neubauer, tras su tinción con colorante vital tipo Tripan Blue.

Bomba de vacío

En las operaciones de filtración de líquidos requeridas en los experimentos se ha utilizado una bomba de vacío de Millipore, la cual proporciona un caudal de aire regulado a 24 l/mn. para un vacío de 127 mm de Hg y va conectada a un matraz de vacío de 0.5 l. de capacidad. El matraz lleva un tubo de vacío que es el que se aplica sobre la unidad de filtración directamente o sobre el líquido a aspirar con una pipeta Pasteur.

Contador automático de células

Para el análisis del tamaño y el número de los elementos celulares presentes en las suspensiones se ha utilizado un contador de células Coulter Counter (Sampling Stand & ZM, USA).

Lector de Densidad Óptica para Placas de 96 Pocillos

Para la cuantificación del grado de proliferación celular de un experimento

se empleó un lector automático, marca Titertek Multiskan modelo MK11 (ICN, Flow). Este aparato está basado en la lectura densitométrica de la coloración existente en placas de cultivo de 96 pocillos.

Unidad de esterilización por Autoclave

Todo el material utilizado en los experimentos con cultivos requería una total esterilidad, por lo que se procesó en la unidad de esterilización general del Hospital Universitario. En todos los casos tras su esterilización, se almacenó con la fecha máxima aconsejada para su uso.

Unidades de esterilización por filtración

Para la esterilización por filtración de líquidos, se han utilizado sistemas de la marca Millipore, fabricados en plástico, modelo XXII 047. Este modelo consta de dos partes, la superior con una capacidad de 250 cc, donde se recoge la sustancia a esterilizar, y la inferior, de la misma capacidad donde se deposita la sustancia una vez filtrada. Entre ambos se sitúa una membrana de filtración recambiable, que en nuestro caso era el modelo Millipore GSWP 04700, de 0.22 μm de tamaño de poro y 47 mm. de diámetro. Alternativamente se han empleado filtros de 0.20 μm de poro de Gelman Sciences (Michigan, USA).

Contador automático de radiación gamma

El modelo utilizado fue el Wizar, que consta de un analizador automático de los resultados, y que permite la cuantificación de la radiación emitida por productos marcados con ^{125}I en las técnicas de radioinmunoensayo.

Centrífuga refrigerada

La centrífuga convencional utilizada fue suministrada por Beckman, modelo TO-6, y se caracteriza por estar dotada de una unidad de refrigeración que permite la centrifugación de las muestras a baja temperatura. La centrífuga descrita

consta de un rotor, con soportes intercambiables, para la centrifugación simultánea de un número de muestras variable (de 4 a 120 muestras).

Ultracentrífuga

En aquellos casos en los que se hacía necesario se utilizó una unidad de centrifugación modelo Beckman L8 70, en las siguientes condiciones de uso: velocidad 100.000 g, rotor SWTi 60, tiempo de rotación 60 min, temperatura 4°C y alto vacío.

Contenedor de Nitrógeno Líquido

Las líneas celulares tumorales establecidas, utilizadas en este trabajo, se han almacenado, de manera rutinaria, congeladas a -173 °C, en un contenedor relleno de nitrógeno líquido, marca Thermolyne Locator, modelo CY50900.

Cajas de cultivo

La casa Nunc suministró los frascos de poliestireno de un solo uso, estériles utilizados en los ensayos biológicos. Estos frascos se caracterizan por presentar una buena calidad óptica y su superficie plana posibilita cultivos de distribución celular uniforme. Previo a su empleo este tipo de frascos necesita ser tratado con radiación gamma, compuestos químicos o electricidad para que su superficie, de poliestireno manufacturado, hidrofóbico, quede cargado electricamente y se convierta en una superficie adecuada para la adherencia de las células y su posterior crecimiento. En este trabajo hemos utilizado frascos de cultivo de 25 cm² y de 75 cm² de superficie.

Los experimentos de proliferación celular se realizaron sobre placas de cultivo de 24 pocillos de poliestireno suministradas por ICN, (Irvine, Escocia). Se utilizaron tubos de plástico estériles, tipo universal de fondo cónico, que fueron suministrados por Labclinics (España), viales para congelación en nitrógeno líquido (Nunc), y tubos de plástico de diferentes tamaños, estériles y no estériles.

3.2. REACTIVOS

Medios de cultivo celular

El mantenimiento en cultivo de las células MCF7 se efectuó indistintamente en medio Eagle Esencial Mínimo Modificado complementado con las sales de Earle (MEM) y en medio Mínimo Esencial con sales de Earle modificado por Dulbecco (DME) suplementados ambos con glutamina (PAA Labor und Forschungs Ges, MBH, Linz, Austria). Cuando el protocolo experimental así lo requirió el cultivo se realizó en el mismo medio sin la adición del indicador de pH rojo fenol, quedando en este caso indicado en el texto como DME(-RF)(Biowhitaker, England).

Suero

Los medios de cultivo empleados para el mantenimiento de las células MCF7 contuvieron, además de los componentes específicos de los medios MEM, DME y DME(-RF), un complemento variable (5-10%) de suero de procedencias diferentes: a) suero bovino fetal (FBS)(PAA Labor und Forschungs Ges, MBH, Linz, Austria) y b) suero humano (HuS) obtenido a partir de sangre fresca extraída a voluntarios sanos. Este suero se obtuvo a partir de plasma tras su tratamiento con cloruro cálcico (Merck).

Enzimas

Para la obtención de una suspensión monocelular homogénea a partir de la monocapa celular se ha utilizado una solución de tripsina-EDTA, 0.05% y 0.025%, respectivamente (ICN Flow Laboratories, Irvine, Escocia).

Dextrano T-70

Se ha utilizado una suspensión de carbón y dextrano para la preparación del suero libre de estrógenos. El dextrano T-70 (Pharmacia Fine Chemicals,

Suecia) es una macromolécula que tiene la capacidad de formar un complejo con el carbón y por adsorción extraer del suero los estrógenos endógenos del suero así como otras moléculas de bajo peso.

Carbón activado

El carbón activado (Charcoal Activated, Sigma, St Louis, USA) se ha utilizado junto con el Dextrano T-70 en el proceso de eliminación de los estrógenos endógenos del suero.

Hormonas

Como compuesto estrogénico se ha empleado el estradiol-17 β (E₂) (Calbiochem). Se preparó una solución stock en etanol a una concentración de 1 mM. La concentración final de etanol en los cultivos no superó 0.1%.

Reactivos para test de sulforrodamina-B

La tinción de la monocapa celular se llevó a cabo tras la fijación de las células con tricloroacético (Merck, Alemania) y su posterior tinción con una solución 0.4% de sulforrodamina-B (Sigma) en 1% de ácido acético (Merck)

Reactivos para receptores hormonales

Se han empleado los kits (Abbott ER y PgR-EIA) de determinación inmunológica, en citosol, de las concentraciones de receptores de estrógenos y progesterona (Abbott Diagnostic, MI, USA).

Reactivos para pS2

Para la cuantificación de los contenidos en el medio de cultivo extracelular de la proteína pS2 se ha utilizado el kit comercial ELSA-PS2 (CIS Bio International, Gif-sur-Yvette, Francia).

Reactivos para cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas tisulares, citosólicas y del medio de cultivo celular se efectuó mediante la técnica y reactivos del BioRad Protein Assay.

4. LINEA CELULAR

Se ha empleado en este trabajo la línea celular denominada MCF7 adaptada al cultivo en monocapa. Es de origen tumoral y fue obtenida en 1973 (Soule, 1973) a partir de un derrame pleural metastásico de una enferma afecta de adenocarcinoma mamario. Su gran difusión como modelo experimental de cáncer de mama puede ser atribuido a que se trata de la primera línea celular documentada como receptor estrogénico positivo (Horwitz, 1978) que responde con cambios metabólicos y estructurales a la acción de los estrógenos (Lippman, 1975).

La línea celular MCF7 presenta, además, receptores específicos para otros agentes hormonales, entre los cuales se citan: andrógenos, progestágenos, glucocorticoides, vitamina D3, hormonas tiroideas, prolactina, insulina y calcitonina y factores estimuladores del crecimiento celular (Lippman, 1986).

La cepa utilizada en este trabajo ha sido la MCF7 BUS cedidas por el Dr. C. Sonnenschein (Tufts University, Boston, USA) quien las clonó como C₇MCF7 a partir del pase 173 de la MCF7 original cedida por el Dr. McGrath de la Michigan Cancer Foundation; se emplearon en los pases 95 a 105 tras el clonaje.

5. MATERIAL DE USO GENERAL

5.1. INSTRUMENTACION Y MATERIAL FUNGIBLE

Pipetas automáticas

Para la manipulación de los medios de cultivo se han utilizado pipetas con succión y expulsión automática del fluido de la marca Tecnomar (Zurich, Suiza) modelo R301. También se emplearon pipetas de volumen variable de 20-100 μl , modelo Microtransferpettor Digital Brand para la preparación de las muestras y la realización de los ensayos bioquímicos.

Balanza de precisión

Se han utilizado indistintamente dos balanzas de precisión Mettler 3000 y H 35-AR, capaces de alcanzar la centésima y décima de miligramo, respectivamente.

pHmetro

El pHmetro utilizado para la valoración del pH en las distintas fases de los ensayos fue suministrado por la firma Orion Research modelo 501, cuya precisión se estima en 0.01 unidades de pH.

Baño termostatzado

Para el calentamiento de líquidos se utilizó un baño termostatzado de 15 l de capacidad. El termostato del que consta permite la graduación de la temperatura en un intervalo de 0 a 100°C.

Cámara frigorífica

Las experiencias que requerían baja temperatura para su realización así como el almacenamiento correcto de los reactivos y tampones utilizados, obligaron al empleo de una cámara frigorífica con un sistema automático de termostatación que mantiene la temperatura constante a 4°C.

Congeladores

El almacenamiento de las muestras de saliva previo a su análisis, se ha realizado en un congelador, marca Bru, tipo arcón, capaz de alcanzar la temperatura de -20 °C.

Estufa de alta temperatura

Se ha empleado una estufa P-Selecta con termostato y selector de temperatura que permite alcanzar hasta 250°C.

Pipetas desechables

Las pipetas empleadas rutinariamente en la manipulación de los cultivos han sido de plástico de un solo uso, empaquetadas individualmente, estériles, y con capacidad de 1, 2, 5 y 10 cc. Fueron suministradas por Costar y corresponden a los números de referencia 4011, 4051 y 4101 respectivamente. Eventualmente se han utilizado pipetas de vidrio, esterilizables en autoclave cuyos volúmenes corresponden a los descritos para las de plástico.

También se han usado pipetas tipo Pasteur, de vidrio, Labclinics PPV/9 y PPV/6 que tras taponarse con algodón fueron esterilizadas y almacenadas.

Filtros

Para esterilizar pequeños volúmenes de medio de cultivo, salivas, suero o

soluciones, hemos contado con filtros de un solo uso tipo Watman n°41 de 9 cm. de diámetro y Millipore HAWr 02500 con membrana porosa de $0.22 \mu\text{m}$, y HA de $0,45 \mu$.

Tratamiento estadístico de los datos

Se han utilizado los siguientes métodos:

1. Descriptivos: Media Aritmética, desviación estándar y porcentajes
2. Analíticos: Test de Student para muestras independientes, Análisis de la varianza y comparaciones múltiples según método de Student-Newman-Keuls.

El programa estadístico utilizado ha sido el SPSS-PC v.4.0 (SPSS Inc, Illinois, Michigan, EEUU).

Los datos a los que se aplicó el programa estadístico fueron introducidos por duplicado. La comparación de las bases de datos creadas permitió obviar los errores de entrada.

Tratamiento de textos. Representaciones gráficas

La confección y edición del presente trabajo se ha hecho mediante el uso del procesador de textos WORD PERFECT en sus versiones 5.1 y 6.1. El programa de gráficos utilizado ha sido el Slide Writer Plus v. 3.0.

5.2. REACTIVOS

Productos químicos

Se han utilizado: Acido Clorhídrico, Bicarbonato Sódico, e Hidróxido Sódico para análisis de Merck.

6. IDENTIFICACION DE LA POBLACION

Un total de 18 adultos sanos voluntarios con edades comprendidas entre 20-24 años, 9 hombres y 9 mujeres configuran nuestra serie. Han colaborado estudiantes de Cuarto Curso de Odontología en el estudio.

Se les informó del objeto de la investigación y que tanto la técnica como el material a utilizar son aceptados clínicamente para el sellado de fisuras. No se trataba, por tanto, de ningún procedimiento experimental.

En todos los casos, se realizó una exploración previa de la boca de los sujetos, desechándose aquellos a los que por presentar caries u obturaciones previas no pudieran realizarse un total de 12 sellados: 4 en molares y 8 en premolares. También fueron excluidos los que presentaban obturaciones previas con resina compuesta.

La cantidad media de sellador empleado por individuo fue de 50 mg.

Se ha incluido también en el trabajo a dos personas que presentaban selladores previamente, y que han sido identificados con los nº 19 y 20 . El 19 presentaba originalmente un molar sellado, y se sometió a la aplicación de 12 nuevos selladores procediéndose a la toma de saliva en los momentos adecuados en función del diseño experimental del estudio. El 20, constituye una observación puntual de una muestra de saliva en un individuo que recibió 4 selladores tres años antes.

METODOS

1. METODOLOGIA CROMATOGRAFICA

1.1. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

Se ha trabajado con un cromatógrafo Konik (cromatógrafo A) de inyección manual, y un Perkin-Elmer (cromatógrafo B) de inyección automática, descritos previamente en el apartado de "Material".

Las condiciones de trabajo se especifican a continuación:

Columna: C-18
Flujo: 1 ml/min.
Detector: UV a 280 nm.
Solventes: * Fase A: Acetonitrilo/Agua: 1/1 (v/v)
* Fase B: Acetonitrilo

Trabajo en gradiente:

Gas desgasificador: Helio

Temperatura: Ambiente (25 °C)

Volumen de inyección: 20 μ l

El programa de gradiente utilizado se recoge en la tabla II:

Tabla II: Gradiente HPLC.

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)	Flujo (ml/min)
0	100	0	1
15	0	100	1
17	100	0	1

Tiempo total de cromatograma 17 minutos.

1.2. CROMATOGRAFIA DE GASES-ESPECTOMETRIA DE MASAS

Las disoluciones patrón de 10^{-3} M/l en metanol de cada uno de los productos, se utilizan previa dilución hasta la concentración adecuada para el análisis de identificación por espectrometría de masas. El cromatógrafo de gases utilizado ha sido un Carlo Erba Fisons 8000 unido a un espectrómetro de masas Platform Fisons VG. Este estudio se ha realizado con la colaboración de los Servicios Técnicos Centrales de la Universidad de Granada.

Las condiciones de trabajo se especifican a continuación:

Columna capilar:	15 m metilsilicona OV-P
Temperatura del inyector:	240°C
T ^a de la fuente de iones:	200°C
Gradiente de T ^a :	T ^a inicial (2')..... 80°C T ^a final..... 320°C Rampa de T ^a : 10°C/minuto
Gas portador:	He
Flujo:	1,2 ml/min.
Volumen de inyección:	0,2 µl.

1.3. ANALISIS CUALITATIVO DEL BisFENOL A Y OLIGOMEROS

Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Bajo las condiciones de trabajo descritas, se han analizado disoluciones en etanol, a partir de concentraciones 10^{-3} M, de los siguientes productos:

- * Bis-fenol A (BFA)
- * Etoxilato de bisfenol A (EBFA)
- * Propoxilato de bisfenol A (PBFA)
- * Diglicidil Eter de bisfenol A (BADGE)

* Dimetacrilato del diglicidileter de bisfenol A (BisGMA)

* Dimetacrilato de bisfenol A (BisDMA)

Los tiempos de retención medios relativos de dichos productos en los cromatógrafos utilizados quedan reflejados en la tabla III.

Tabla III: Tiempos de retención relativos en HPLC.

Producto	Cromatógrafo A (Tr±σ)	Cromatógrafo B (Tr±σ)
BFA	2,76±0,16	2,00±0,068
EBFA	3,86±0,12	2,73±0,19
PBFA	5,24±0,15	3,83±0,039
BADGE	7,10±0,24	9,61±0,57
BisGMA	7,60±0,24	10,16±0,58
BisDMA	10,30±0,10	11,86±0,36

Las figuras 1, 2, 3, 4,5 y 6 corresponden a cromatogramas de los patrones puros, es decir BFA, EBFA, PBFA, BADGE, BisGMA, BisDMA.

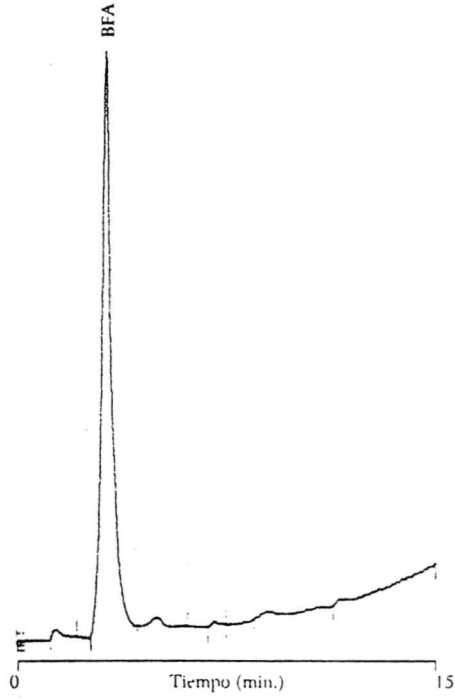


Figura 1: Cromatograma de una disolución 10^{-4} de BFA.

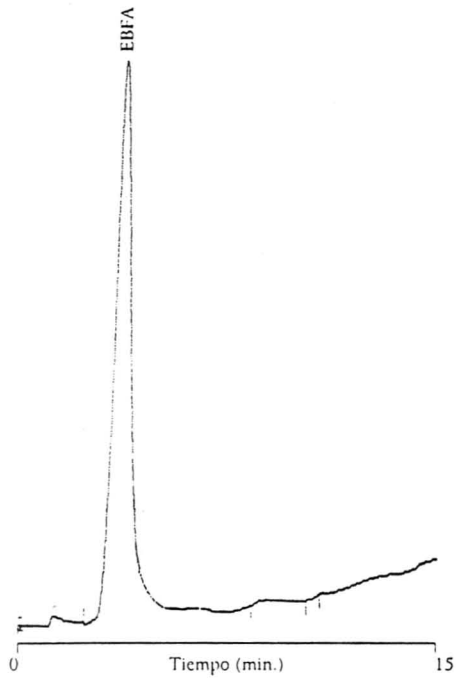


Figura 2: Cromatograma de una disolución 10^{-4} de EBFA.

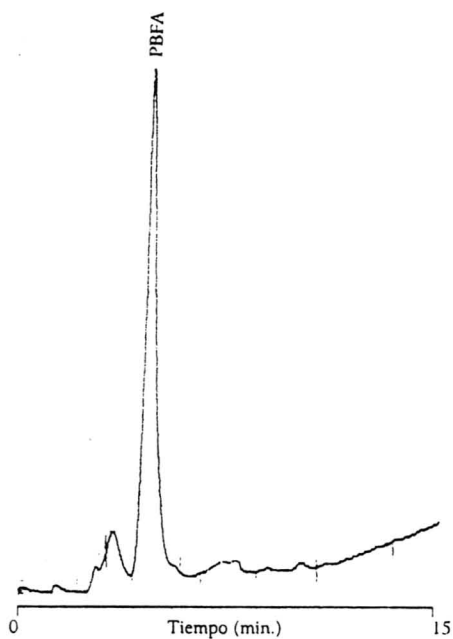


Figura 3: Cromatograma de una disolución 10^{-4} de PBFA.

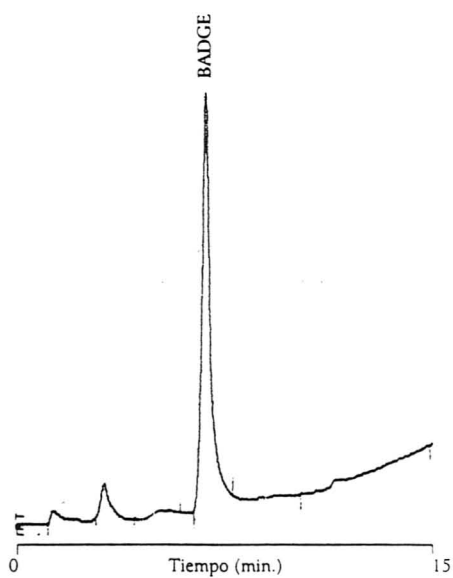


Figura 4: Cromatograma de una disolución 10^{-4} de BADGE.

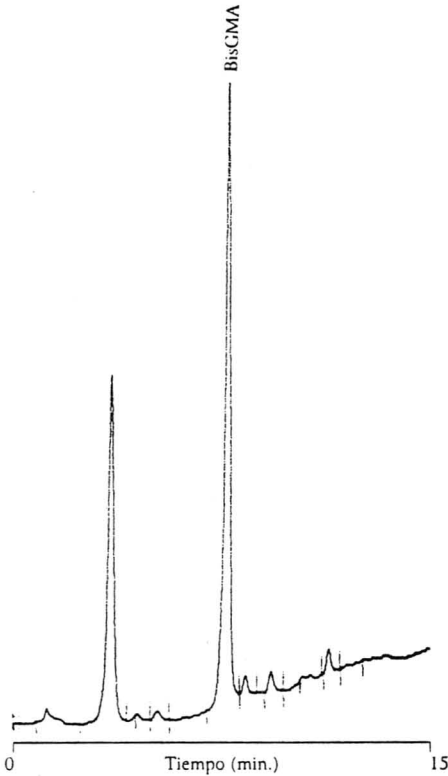


Figura 5: Cromatograma de una disolución 10^{-4} de BisGMA.

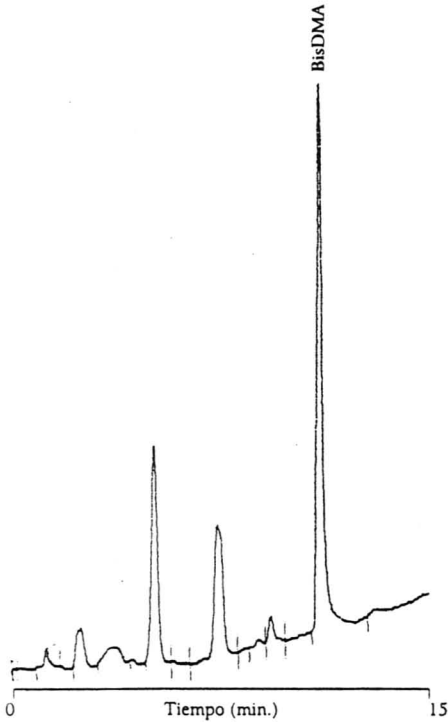


Figura 6: Cromatograma de una disolución 10^{-4} de BisDMA.

Cromatografía de gases-Espectrometría de masas

Los tiempos de retención obtenidos en las condiciones anteriormente descritas para cada uno de los patrones se recogen en la tabla IV.

Tabla IV: Tiempos de retención relativos en C.G./E.M.

Producto	Tiempo de Retención (Tr)	Desviación Estandar (σ)
BFA	21,10	$\pm 0,20$
EBFA	23,90	$\pm 0,15$
PBFA	27,17	$\pm 0,20$
BADGE	27,78	$\pm 0,30$
BisGMA	22,80	$\pm 0,20$
BisDMA	26,56	$\pm 0,20$

Los espectros de los patrones puros estudiados corresponden a las figuras 7 a 12.

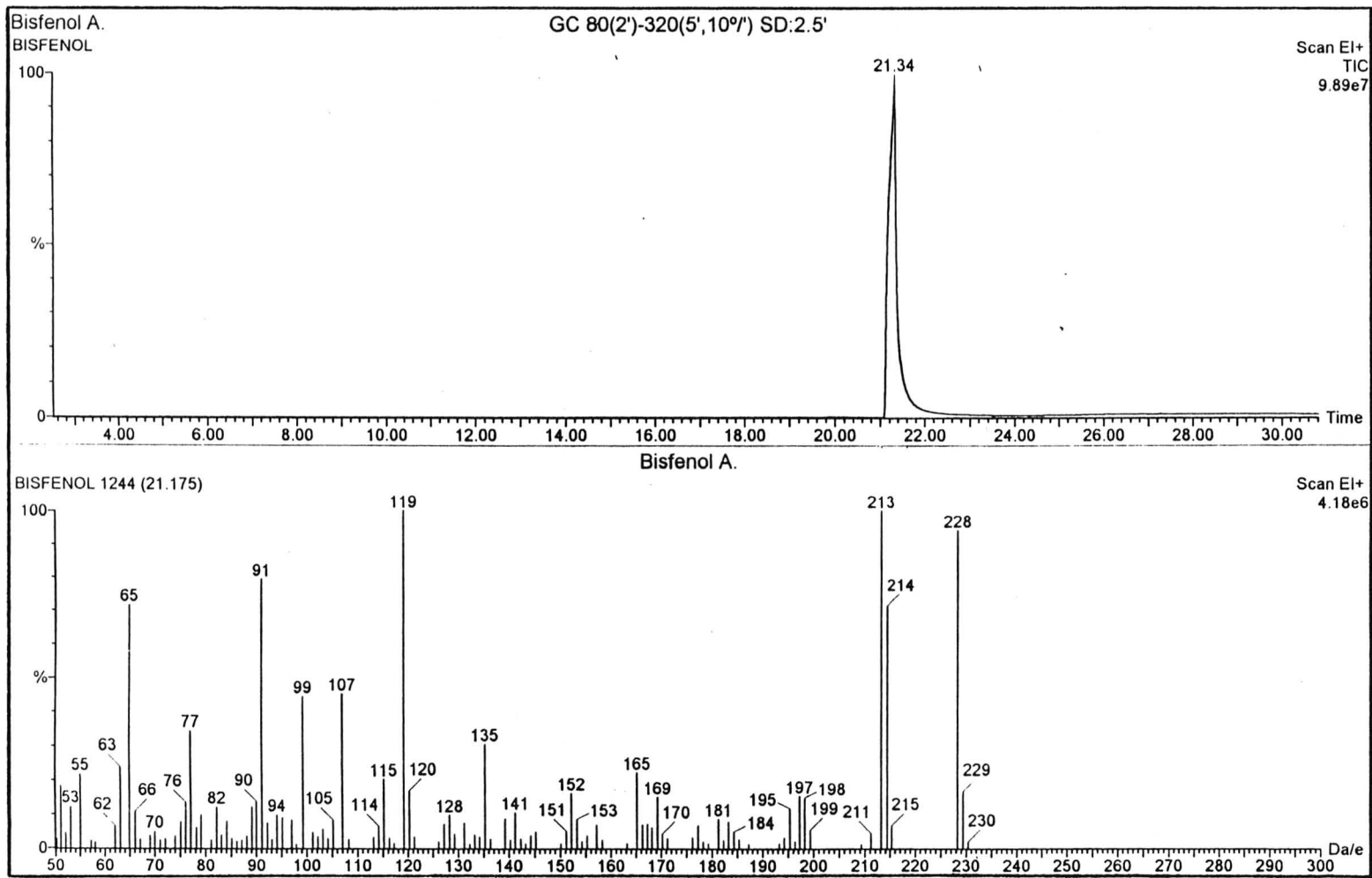


Figura 7: Cromatograma y Espectro de Masas del BFA

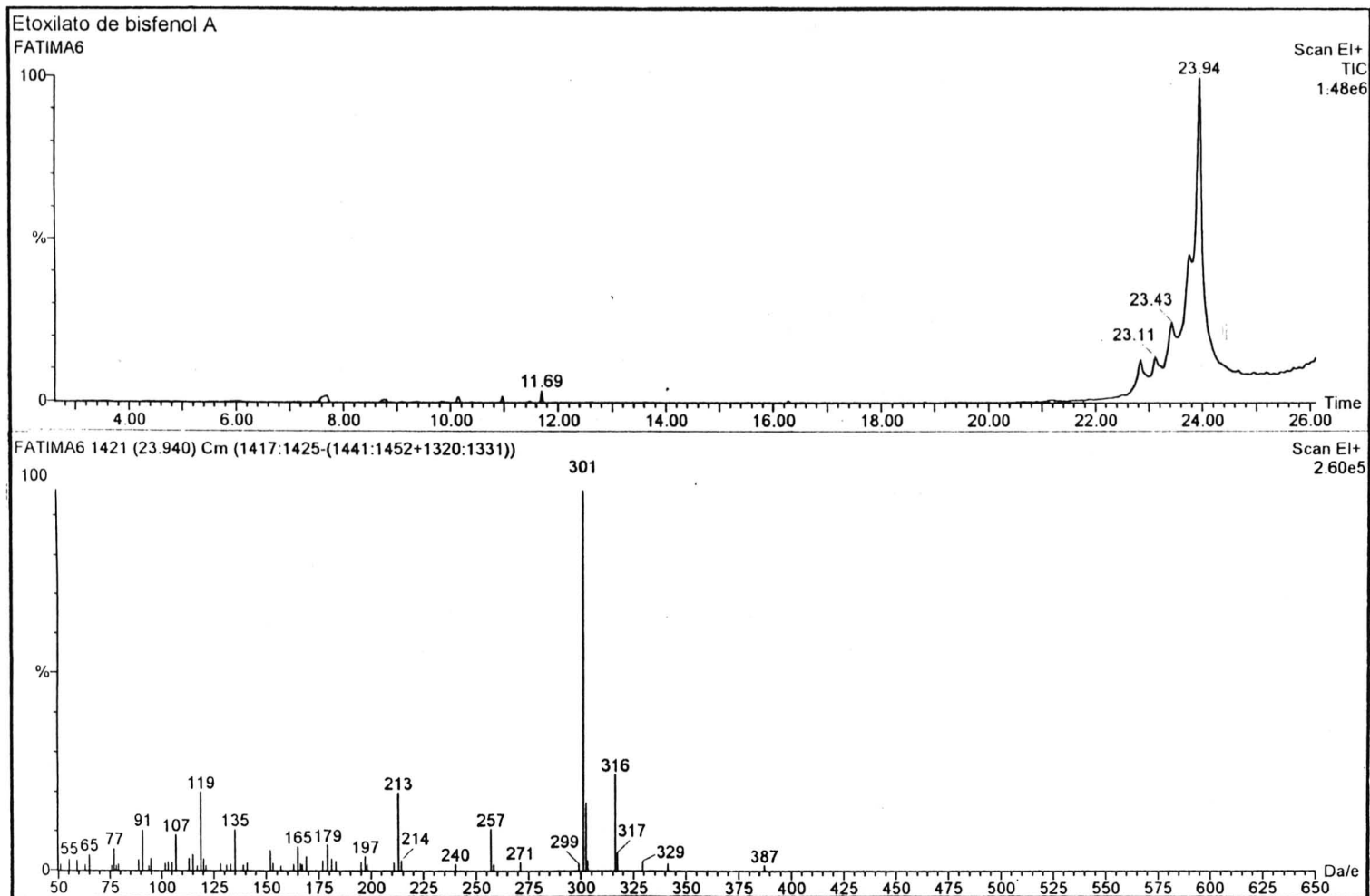


Figura 8: Cromatograma y Espectro de Masas del EBFA

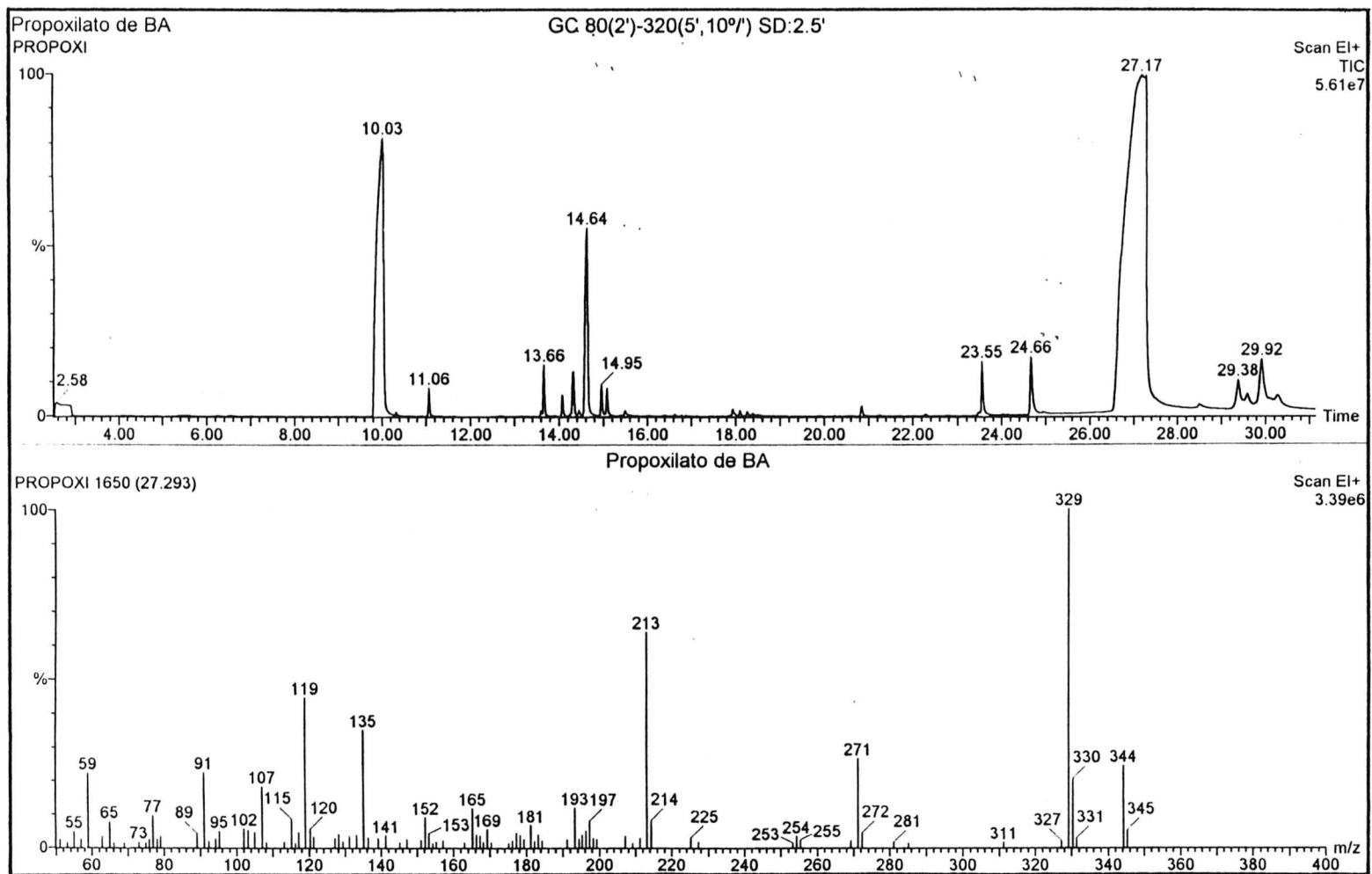


Figura 9: Cromatograma y Espectro de Masas del PBFA

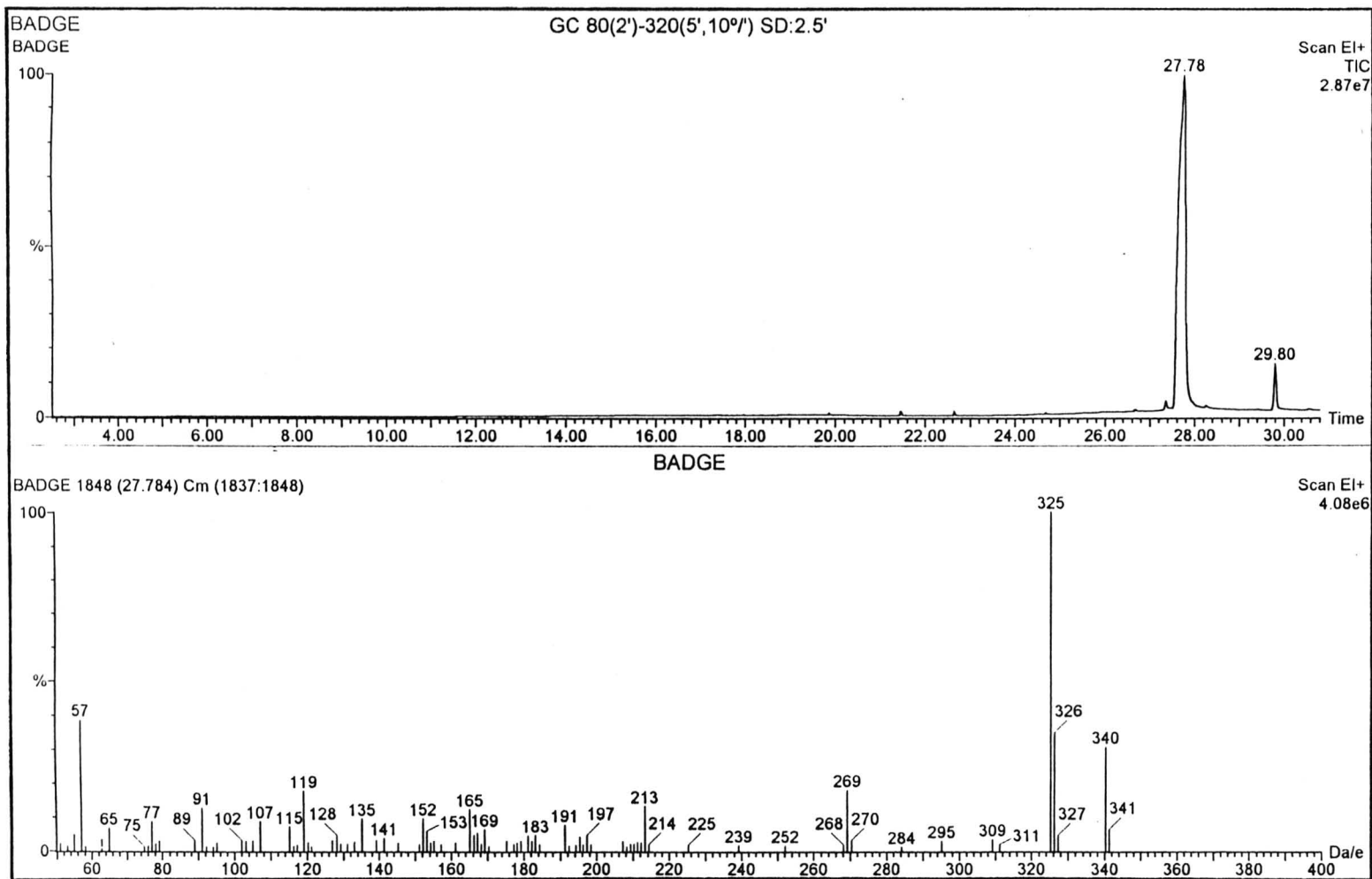


Figura 10: Cromatograma y Espectro de Masas del BADGE

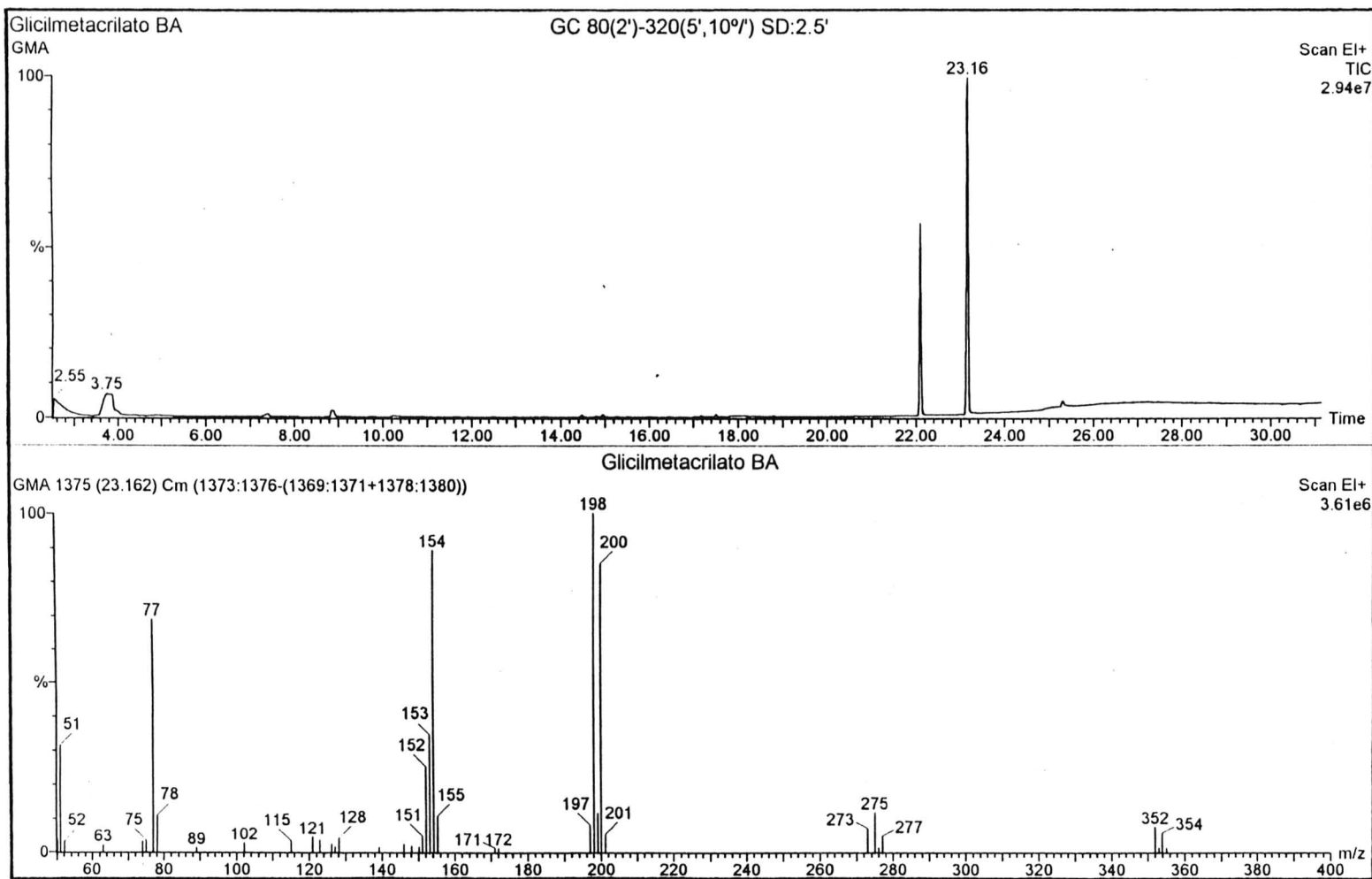


Figura 11: Cromatograma y Espectro de Masas del BisGMA

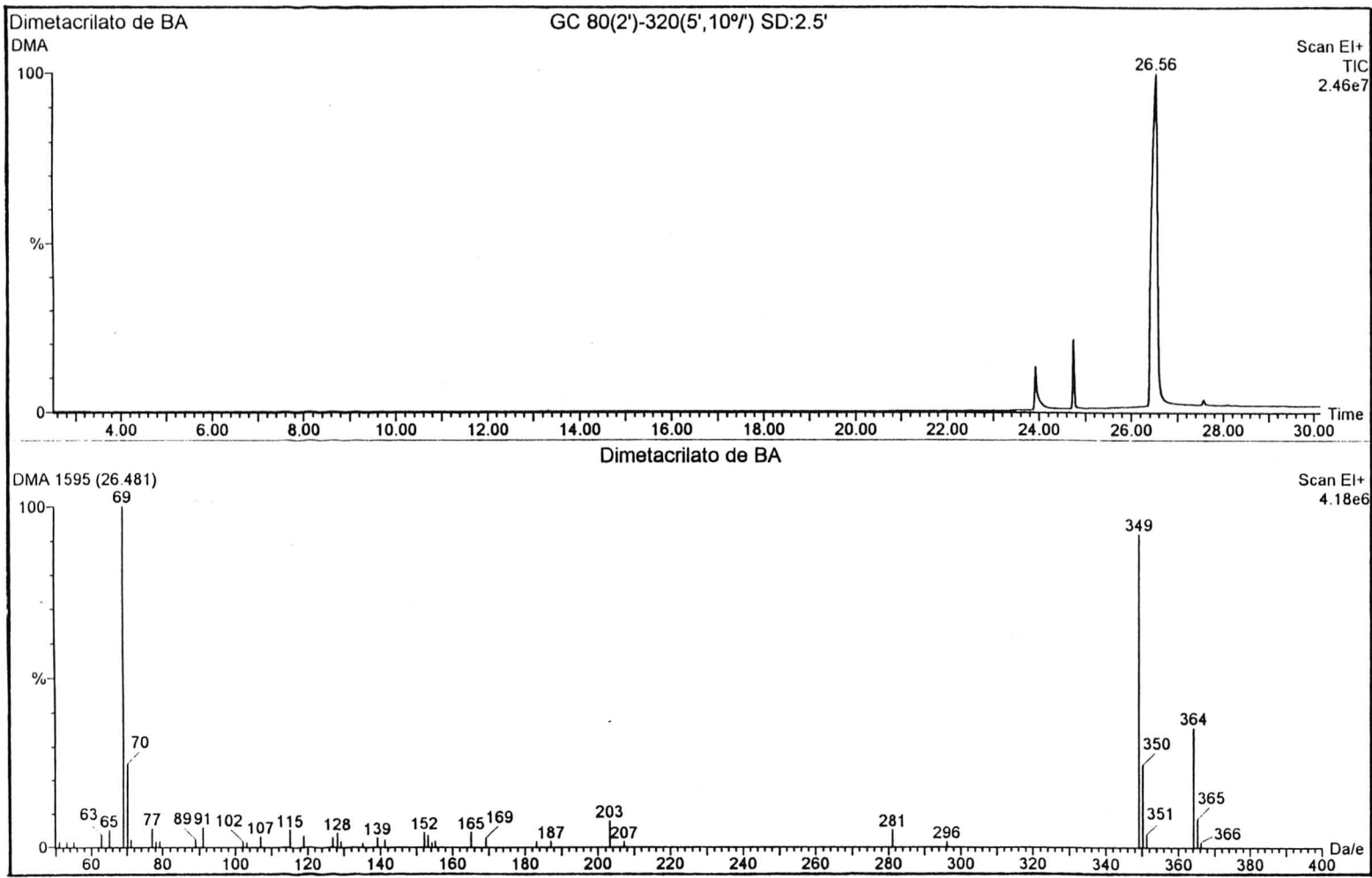


Figura 12: Cromatograma y Espectro de Masas del BisDMA

1.4. ANALISIS CUANTITATIVO DEL BISFENOL A Y OLIGOMEROS

Cromatografía Líquida de Alta Resolución

a) Reproducibilidad del método cromatográfico

A partir de la disolución patrón 10^{-3} M en etanol de cada uno de los productos, se prepararon disoluciones de 10^{-4} M y se inyectaron $20 \mu\text{l}$, en las condiciones de trabajo establecidas, para determinar el área correspondiente a cada uno de estos análisis. Las tablas V y VI recogen los valores relativos a los 10 ensayos concordantes en cada uno de los cromatógrafos empleados, así como el tratamiento estadístico realizado a los datos.

Tabla V: Area media y desviación estandar obtenidas en cromatógrafo A para disoluciones 10^{-4} M de cada producto.

PRODUCTO	AREA MEDIA	DESV..ESTANDAR
BFA	411.180	± 34.397
EBFA	1,244.425	± 21.974
PBFA	2.232.760	± 178.564
BADGE	1.523.300	± 139.358
BisGMA	1.415.260	± 72.790
BisDMA	4.423.200	± 255.972

Tabla VI: Area media y desviación estandar obtenidas en cromatógrafo B para disoluciones 10^{-4} M de cada producto.

PRODUCTO	AREA MEDIA	DESV..ESTANDAR
BFA	48.371.127	$\pm 3.869.669$
EBFA	17.747.758	$\pm 1.419.820$
PBFA	17.954.310	$\pm 1.256.801$
BADGE	13.386.238	$\pm 1.204.761$
BisGMA	11.535.483	± 546.142
BisDMA	4.075.292	± 203.764

b) Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Mac Dougall y col. (1980), propusieron una serie de normas para la adquisición y evaluación de datos analíticos y definieron dos conceptos analíticos diferenciados, como son: límite de detección y límite de cuantificación.

Límite de detección: se define como un número expresado en unidades de concentración (o cantidad), que describe el más bajo nivel de concentración (o cantidad) de un elemento que un analista puede determinar, estableciendo diferencias estadísticas respecto al ensayo en blanco, realizado en las mismas condiciones (Long y col., 1983). Para establecer el límite de detección, normalmente hay que realizar unas medidas en blanco. La media del valor de la respuesta del blanco, X_B , se puede calcular de acuerdo con la expresión

$$X_B = \frac{\sum X_{bj}}{nB}$$

y la desviación estándar

$$\sigma = \frac{\sum (X_{Bj} - X_B)^2}{(nB - 1)}$$

La IUPAC y los autores anteriormente citados consideran que un valor de nB igual a 0, es adecuado para establecer la desviación estándar. De otra parte, para definir el límite de detección en concentraciones (C_L), la IUPAC establece:

$$X_L = X_B + K \sigma_B$$

Si $K=3$, el nivel de confianza establecido estadísticamente es del orden del 99,86%. Por tanto un valor K de 3, será el que utilizemos para el cálculo de los límites de detección en este capítulo.

Límite de cuantificación: el criterio que se debe seguir para establecer el límite de cuantificación, nos lleva a situar la región de cuantificación, claramente por encima del límite de detección. Siguiendo las definiciones, el límite de cuantificación, está localizado por encima de la media del blanco de acuerdo con la expresión.

$$St - Sb \geq Kq \cdot \sigma$$

Se recomienda que Kq sea igual a 10. Donde St (o señal apreciable) será:

$$St \geq (Sb + 10 \sigma)$$

Todo lo dicho hasta el momento, se puede expresar gráficamente en la figura 13.

Señal del Analito		
Cero	Sd	Sb
Analito no detectado	Región de detección	Región de cuantificación
Cero	Sb	Sb ± 10σ
	Sb ± 3σ	
	Límite de detección	Límite de cuantificación
Señal total		

Figura 13: El límite de detección está localizado 3σ sobre la medida del blanco. El límite de cuantificación es de 10σ sobre el blanco. Estos son los criterios mínimos que recomiendan los autores citados.

En resumen este esquema corresponde a los criterios que se han seguido para establecer los límites de detección y cuantificación.

Regiones de las medidas del analito:

Señal del analito (S_x)

$< 3\sigma$	->	analito no detectado
3σ a 10σ	->	región de detección
$> 10\sigma$	->	región de cuantificación

La aplicación de estos criterios al análisis de los oligómeros constituyentes de las resinas compuestas por HPLC-Detector ultravioleta, han permitido determinar para cada uno de ellos, los límites de detección y cuantificación en las condiciones de trabajo ya definidas y de acuerdo con la realización de diez medidas concordantes, para cada uno de los productos analizados.

Las áreas que se han tomado para definir los límites de detección de los monómeros corresponden al valor 3σ .

La tabla VII corresponde a los límites de detección para el cromatógrafo A, expresándose el área límite y su concentración correspondiente.

$$X_B + 3 \sigma = X_L$$

Tabla VII: Límites de detección para el cromatógrafo A.

Producto	Area Límite (X_L)	Concentración Límite ($\mu\text{g/ml}$)
BFA	24.600	1,80
EBFA	219.740	0,40
PBFA	183.120	1,70
BADGE	120.492	9,10
BisGMA	10.830	0,30
BisDMA	795.726	0,40

Límite de cuantificación: siguiendo el criterio antes enunciado, para establecer el límite de cuantificación y de nuevo considerando que el área mínima debe corresponder a 10 veces la desviación estándar del blanco, después de realizar 10 medidas concordantes, en la tabla VIII se recogen los límites de cuantificación de cada uno de los productos en el cromatógrafo A.

Tabla VIII: Límites de cuantificación para el cromatógrafo A.

Producto	Area Cuantificable	Concentración Límite ($\mu\text{g/ml}$)
BFA	94.131	2,28
EBFA	369.000	0,50
PBFA	253.937	3,40
BADGE	330.927	10,20
BisGMA	33.178	0,54
BisDMA	1.287.725	0,80

c). Cálculo de las curvas de calibrado

A partir de la disolución patrón 10^{-3} M de cada uno de los productos se han preparado disoluciones de concentración variable según la respuesta del cromatógrafo a la sustancia en cuestión. Se inyectan de cada una de ellas $20 \mu\text{l}$ en el HPLC y en las condiciones de trabajo descritas, y una vez obtenidas 10 medidas concordantes para cada una de las concentraciones y el tiempo de retención relativo correspondiente a cada sustancia, se deducen las curvas de calibrado que permitan la posterior cuantificación en los análisis. Las tablas IX a XIV describen los datos relativos al cromatógrafo A.

Tabla IX: Calibración para el BFA.

Concentración (M/l)	Area Media	Desviación Estandar
10^{-3}	3.179.933	± 170.826
10^{-4}	411.180	± 34.397
10^{-5}	94.131	± 8.200
10^{-6}	N.S.	

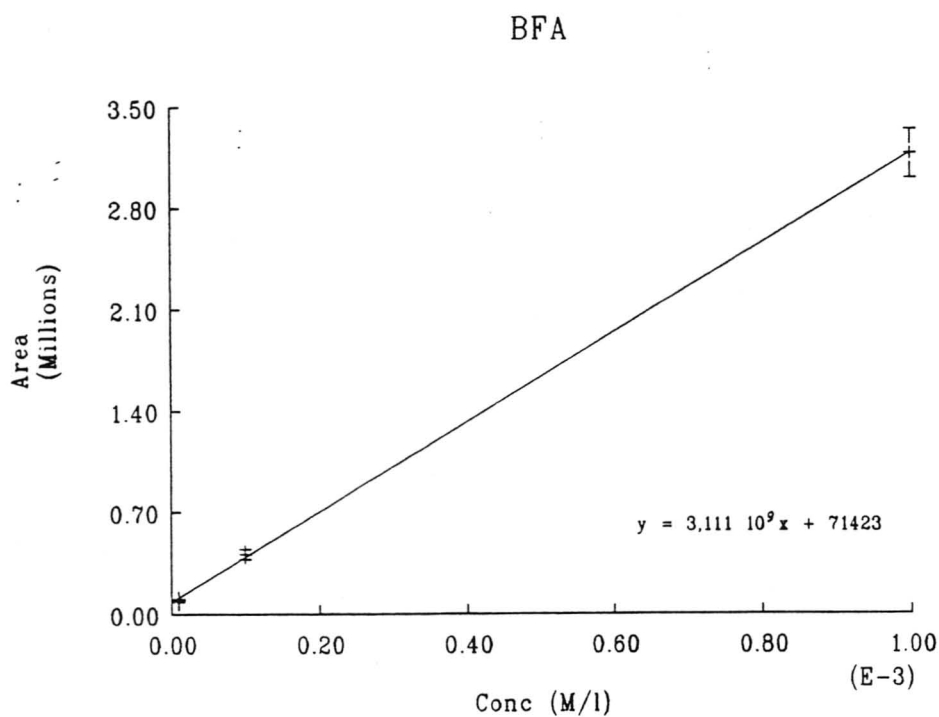


Figura 14: Curva de calibrado y ecuación de la recta para BFA.

Tabla X: Calibración para el EBFA

Concentración (M/l)	Area Media	Desviación Estandar
10^{-3}	17.187.000	± 134.350
2×10^{-4}	4.227.700	± 292.855
10^{-4}	1.244.425	± 21.974
10^{-5}	960.925	± 141.951
2×10^{-6}	410.264	± 123.974

EBFA

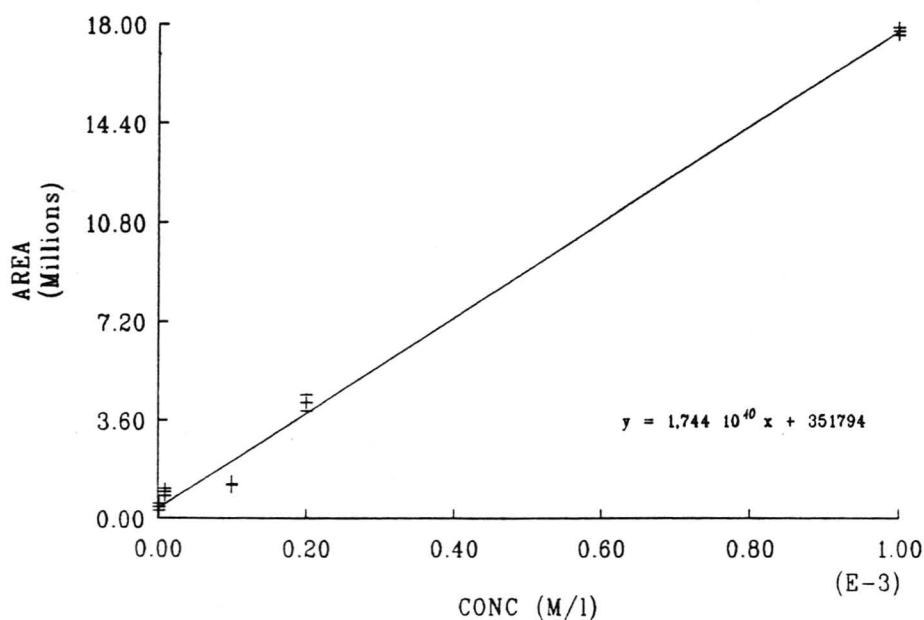


Figura 15: Curva de calibrado y ecuación de la recta para EBFA.

Tabla XI: Calibración para el PBFA.

Concentración (M/l)	Area Media	Desviación Estandar
10^{-3}	41.708.000	± 978.636
2×10^{-4}	6.411.100	± 227.065
10^{-4}	2.232.760	± 178.564
10^{-5}	253.937	± 61.040

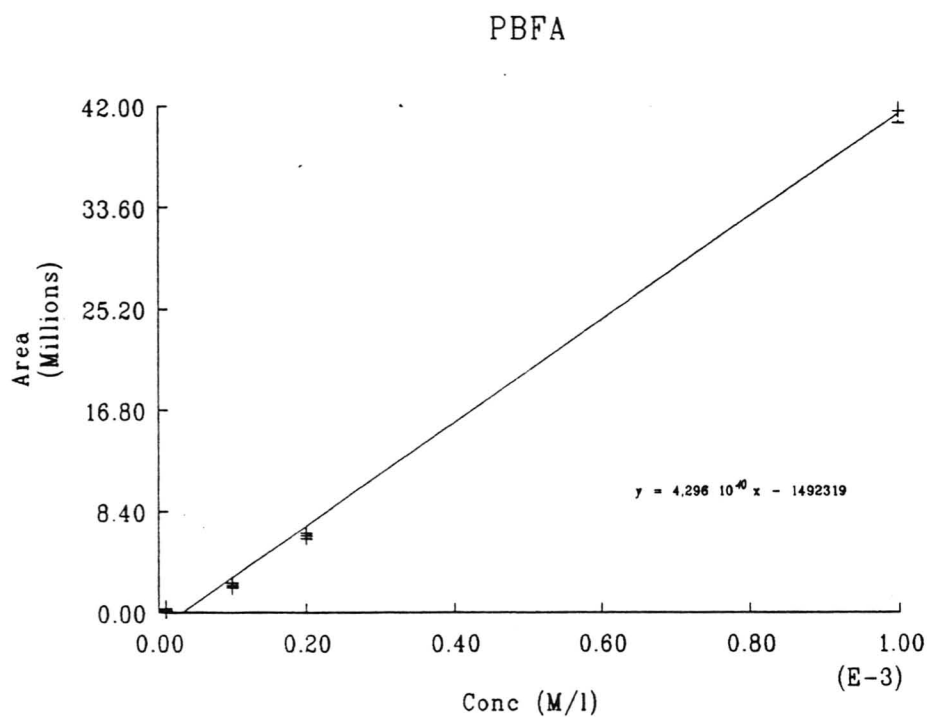


Figura 16: Curva de calibrado y ecuación de la recta para PBFA.

Tabla XII: Calibración para el BADGE.

Concentración (M/l)	Area Media	Desviación Estandar
10^{-3}	4.662.700	± 632.400
5×10^{-4}	2.459.950	± 480.425
$2,5 \times 10^{-4}$	1.523.300	± 139.358
$6,2 \times 10^{-5}$	347.370	± 94.063
$3,1 \times 10^{-5}$	290.760	± 40.164

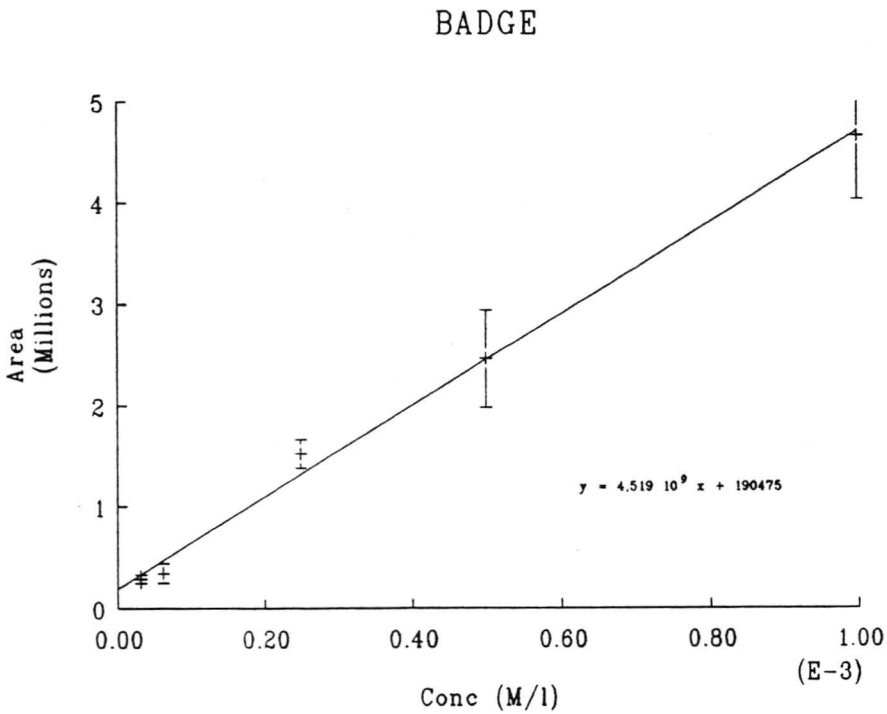


Figura 17: Curva de calibrado y ecuación de la recta para BADGE.

Tabla XIII: Calibración para el BisGMA.

Concentración (M/l)	Area Media	Desviación Estandar
10^{-3}	17.975.500	± 28.991
10^{-4}	1.415.260	± 72.790
10^{-5}	369.600	± 79.111
10^{-6}	33.178	± 1.083

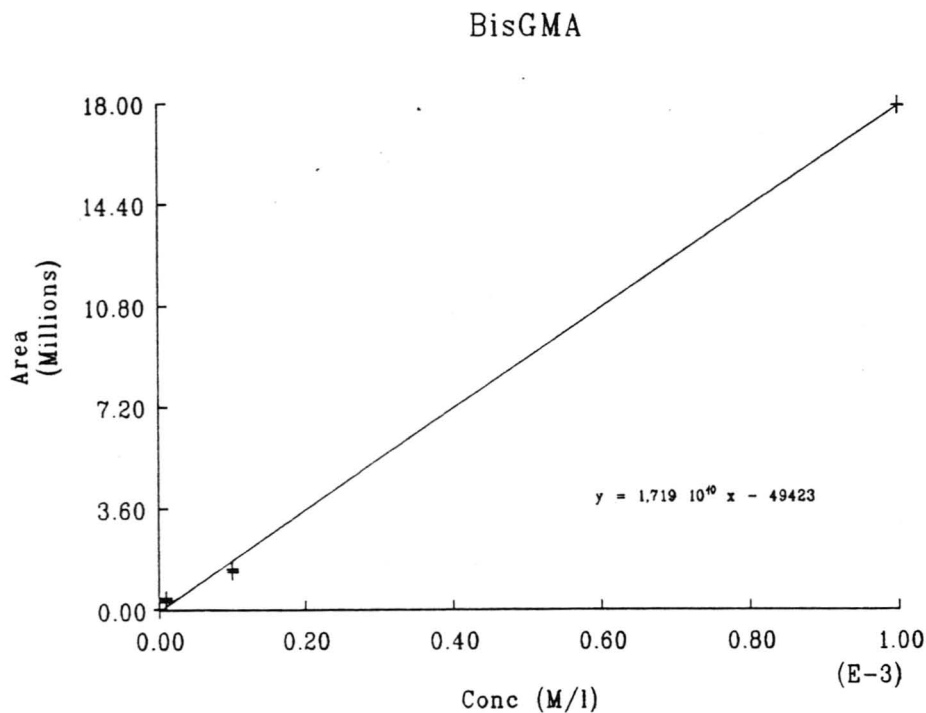


Figura 18: Curva de calibrado y ecuación de la recta para BisGMA.

Tabla XIV: Calibración para el BisDMA.

Concentración (M/l)	Area Media	Desviación Estandar
10^{-3}	25.840.000	± 240.303
10^{-4}	4.423.200	± 255.972
10^{-5}	1.552.967	± 265.242
10^{-6}	N.S.	

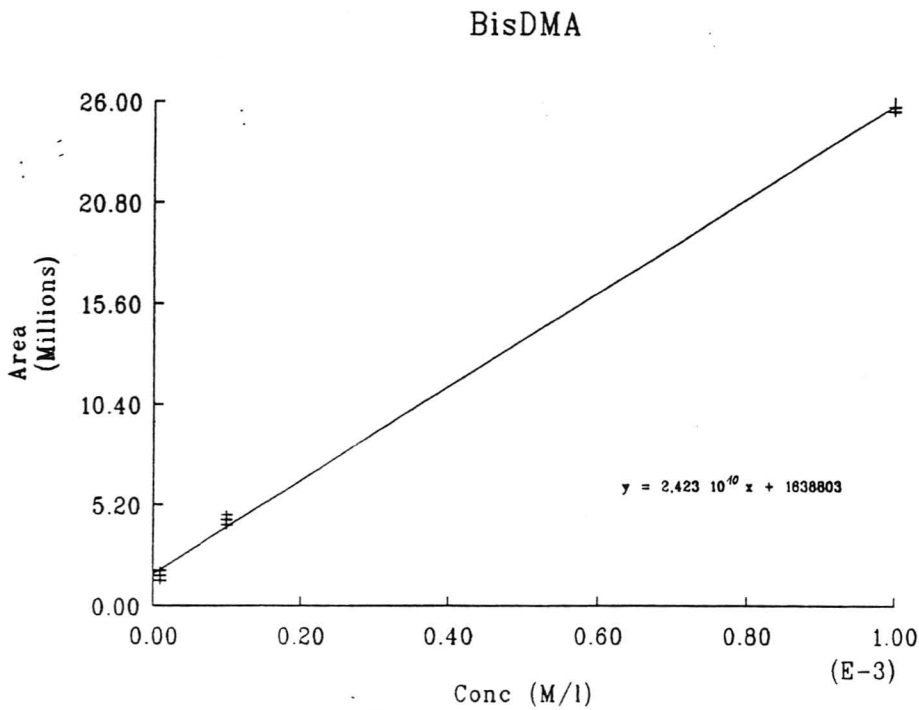


Figura 19: Curva de calibrado y ecuación de la recta para BisDMA.

d). Linealidad del detector UV

En la tabla XV se muestran las ecuaciones de la recta de calibrado para cada producto, así como el coeficiente de correlación correspondiente en el cromatógrafo A.

Tabla XV: Ecuaciones de las rectas de calibrado.

Producto	Ecuación de la Recta ($y=a_0x+a_1$)	Rval (r^2)
BFA	$y=3,111 \cdot 10^9x+71423$	0,999
EBFA	$y=1,744 \cdot 10^{10}x+351794$	0,997
PBFA	$y=4,296 \cdot 10^{10}x-1492319$	0,998
BADGE	$y=4,519 \cdot 10^9x+190475$	0,997
BisGMA	$y=1,719 \cdot 10^{10}x-49423$	0,999
BisDMA	$y=2,423 \cdot 10^{10}x+1638803$	0,999

e). Comprobación de la exactitud de la técnica cromatográfica

Para la comprobación de la exactitud de la técnica analítica por HPLC, se ha aplicado el cálculo estadístico a partir de una solución patrón de los productos objeto de estudio en unas concentraciones intermedias dentro de la recta de calibrado. La exactitud en el método, ha sido estudiada a partir de diez determinaciones de esta solución en las mismas condiciones y expresada como porcentaje de recuperación. La concentración encontrada para cada producto estudiado, representa la media de los factores obtenidos en las diez determinaciones. Estas concentraciones se calculan a partir del área del pico de cada compuesto estudiado en el cromatograma, y del factor de respuesta medio de

cada uno de ellos.

El factor de respuesta se define como la relación entre la concentración de la muestra procesada y el área de pico que registra el cromatógrafo.

$$FR_{\text{absoluto}} = \frac{\text{Concentración } (\mu\text{g/ml})}{\text{Área de pico}}$$

Este factor de respuesta, no se ve afectado ni por cambios en las cantidades o concentraciones de los componentes investigados ni por la presencia o ausencia de otras moléculas no estudiadas.

Otros parámetros representativos de la precisión del método, son la desviación estándar (D.E. ó σ_{n-1}), la desviación media o error estándar (D.M. ó σ_m), el error relativo (E.R.) y el coeficiente de variación sobre el valor medio (C.V.).

$$\text{Desviación estándar: (D.E. ó } \sigma_{n-1}) = (\sum (x_i - \bar{x})^2 / n-1)^{1/2}$$

$$\text{Error estándar: (E.E. ó } \sigma_m) = \frac{\sigma_{n-1}}{n^{1/2}}$$

$$\text{Error relativo (\%): E.R.} = \frac{\sigma_m \cdot t}{\bar{x}} \cdot 100$$

$$\text{Coeficiente de Variación (C.V.): C.V.} = \frac{\sigma_{n-1}}{\bar{x}} \cdot 100$$

Estas medidas de dispersión dan idea de la distribución de los datos de un análisis. Para un intervalo del 95% de confianza, el verdadero valor medio con un

95% de probabilidad, se encontrará entre los límites:

$$\bar{x} \pm \sigma_m \cdot t$$

A continuación se detalla la comprobación de la exactitud de la técnica analítica propuesta para cada uno de los productos objeto de estudio, tablas XVI a XXI para el cromatógrafo A.

Tabla XVI: Comprobación de la exactitud de la técnica para el BFA.

Concentración real ($\mu\text{g/ml}$)	22,8 $\mu\text{g/ml}$
Factor de respuesta medio (FR_m)	$5,54 \times 10^{-5}$
Concentración media encontrada ($\mu\text{g/ml}$)	21,8 $\mu\text{g/ml}$
Recuperación (%)	95,65 %
Desviación estándar (D.E.)	$\pm 0,37$
Coefficiente de variación (C.V.%)	0,17
Error estándar (E.E.)	0,30
Error relativo (E.R.)	2,74
$\bar{x}_m \pm \sigma_m \cdot t$	$21,8 \pm 0,60$

Tabla XVII: Comprobación de la exactitud de la técnica para el EBFA.

Concentración real ($\mu\text{g/ml}$)	31,6 $\mu\text{g/ml}$
Factor de respuesta medio (FR_m)	$2,53 \times 10^{-5}$
Concentración media encontrada ($\mu\text{g/ml}$)	31,6 $\mu\text{g/ml}$
Recuperación (%)	100,2 %
Desviación estándar (D.E.)	$\pm 0,66$
Coefficiente de variación (C.V.%)	2,13
Error estándar (E.E.)	0,54
Error relativo (E.R.)	3,4
$\bar{x}_m \pm \sigma_m \cdot t$	$31,6 \pm 1,07$

Tabla XVIII: Comprobación de la exactitud de la técnica para el PBFA.

Concentración real ($\mu\text{g/ml}$)	34,4 $\mu\text{g/ml}$
Factor de respuesta medio (FR_m)	$1,54 \times 10^{-5}$
Concentración media encontrada ($\mu\text{g/ml}$)	34,33 $\mu\text{g/ml}$
Recuperación (%)	99,8 %
Desviación estándar (D.E.)	$\pm 2,73$
Coefficiente de variación (C.V.%)	7,95
Error estándar (E.E.)	2,44
Error relativo (E.R.)	13,86
$\bar{x}_m \pm \sigma_m \cdot t$	$34,33 \pm 4,76$

Tabla XIX: Comprobación de la exactitud de la técnica para el BADGE.

Concentración real ($\mu\text{g/ml}$)	85 $\mu\text{g/ml}$
Factor de respuesta medio (FR_m)	$5,57 \times 10^{-5}$
Concentración media encontrada ($\mu\text{g/ml}$)	82,71 $\mu\text{g/ml}$
Recuperación (%)	97,3 %
Desviación estándar (D.E.)	$\pm 5,73$
Coefficiente de variación (C.V.%)	6,93
Error estándar (E.E.)	4,68
Error relativo (E.R.)	11,02
$\bar{x}_m \pm \sigma_m \cdot t$	$82,71 \pm 9,12$

Tabla XX: Comprobación de la exactitud de la técnica para el BisGMA.

Concentración real ($\mu\text{g/ml}$)	51,2 $\mu\text{g/ml}$
Factor de respuesta medio (FR_m)	$3,61 \times 10^{-5}$
Concentración media encontrada ($\mu\text{g/ml}$)	51,09 $\mu\text{g/ml}$
Recuperación (%)	99,7 %
Desviación estándar (D.E.)	$\pm 2,62$
Coefficiente de variación (C.V.%)	5,38
Error estándar (E.E.)	2,35
Error relativo (E.R.)	8,96
$\bar{x}_m \pm \sigma_m \cdot t$	$51,09 \pm 4,58$

Tabla XXI: Comprobación de la exactitud de la técnica para el BisDMA.

Concentración real ($\mu\text{g/ml}$)	36,4 $\mu\text{g/ml}$
Factor de respuesta medio (FR_m)	$8,20 \times 10^{-6}$
Concentración media encontrada ($\mu\text{g/ml}$)	36,26 $\mu\text{g/ml}$
Recuperación (%)	99,6 %
Desviación estándar (D.E.)	$\pm 1,48$
Coefficiente de variación (C.V.%)	4,09
Error estándar (E.E.)	1,21
Error relativo (E.R.)	6,52
$\bar{x}_m \pm \sigma_m \cdot t$	$36,26 \pm 2,36$

2. METODOLOGIA ODONTOLOGICA

2.1. COMPOSITES Y SELLADORES. PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Se preparan muestras de 100 mg, de cada uno de los composites y de 50 mg en el caso del sellador. La preparación de cada muestra difiere según se trate de una muestra polimerizada o sin polimerizar. En todos los casos, la muestra se ha mantenido hasta su análisis protegida de la luz en viales de vidrio topacio.

Preparacion de muestras sin polimerizar

La muestra, una vez pesada, se trasvasa cuidadosamente al vial apropiado, donde se añade 1 ml. de agua destilada de pH próximo a 7. Tras agitado vigoroso, se deja decantar.

Preparacion de muestras polimerizadas

Tras el pesado del material, el composite se introduce en un pequeño cilindro de vidrio en el que se compacta para obtener esa forma geométrica. El proceso de compactación se realiza situando el cilindro sobre una placa de Petri de características descritas en "Material". Inmediatamente se realiza la polimerización situando la boquilla de la lámpara en íntimo contacto con la cara opuesta del vidrio sobre el que se ha situado el cilindro. De esta manera se controlan los siguientes factores:

1. Forma geométrica de las muestras
2. Semejanza en el área de polimerización
3. Constancia en la distancia del foco de luz a la muestra

Estas variables influyen en la calidad de la reacción de polimerización, y por tanto, en el porcentaje de conversión del monómero en polímero.

La muestra se extrae del cilindro mediante presión y se trasvasa al vial para continuar el análisis.

En el caso del sellador de fisuras, se pesa directamente sobre el vial transparente, polimerizándose a continuación.

Seguidamente, en todos los casos, se adiciona 1 ml de agua destilada, y tras agitación vigorosa, se deja decantar.

2.2. ESTUDIO DE PRESENCIA DE MONOMEROS EN SALIVA RECOGIDA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Técnica clínica de aplicación de sellador de fisuras

Una vez que fue elegido el grupo de pacientes colaboradores en el estudio, se procedió a la aplicación del sellador de fisuras.

En todos los casos la aplicación del sellador la realizó un único operador acompañado siempre de la misma auxiliar. Ya que se ha demostrado que no influye el tipo de aislamiento en la retención del sellador (Llodra, 1995), se procedió a colocar aislamiento relativo mediante rollos de algodón. La técnica clínica de colocación del sellador fue la recomendada por el fabricante, y se describe a continuación:

- Limpieza de la superficie oclusal de las piezas del cuadrante a sellar mediante cepillo de profilaxis y pasta de piedra pómez.
- Exploración del sistema de surcos con sonda
- Aislamiento del cuadrante mediante rollos de algodón. Secado de las superficies oclusales.
- Aplicación de ácido ortofosfórico al 35% durante 30 seg.; lavado y secado.
- Colocación de nuevos rollos de algodón. Secado de la superficie.
- Aplicación del sellador en la superficie oclusal.

- Fotopolimerizado durante 20 seg. manteniendo el foco luminoso a 1 mm. de distancia.
- Comprobación con sonda del completo recubrimiento de la superficie de la pieza.
- Chequeo oclusal.

Recogida de las muestras de saliva

La recogida de saliva se programó en tres fases:

- a. En la hora previa a la colocación de los selladores
- b. Tras la colocación de los selladores
- c. A los seis meses de su aplicación

La recolección de la saliva se realizó en recipientes de vidrio de boca ancha para facilitar el procedimiento.

Durante 60 minutos, el paciente depositó la saliva en el contenedor al que previamente se habían añadido 5 ml de etanol para evitar el deterioro inmediato de la muestra. Este tiempo de recogida aseguraba el conseguir una cantidad suficiente de muestra, sin necesidad de recurrir a la estimulación de la secreción con productos químicos (Baker y col., 1988) que podrían interferir en los análisis posteriores.

Preparación de la muestra de saliva

Las muestras de saliva, antes de almacenarlas, se filtraron a través de filtro de diferentes tamaños. En primer lugar, la solución hidro-alcohólica de la muestra se filtró con ayuda de vacío por papel de celulosa Watman nº 41. Como alternativa, este primer proceso se puede sustituir por una centrifugación a 3000 rpm x 5'. A continuación se filtró por Milipore de 0,45 y de 0,22 μm de diámetro. En estas condiciones las muestras se conservaron hasta su análisis congeladas a -20°C.

Análisis de las muestras de saliva

Las muestras congeladas se dejaron a temperatura ambiente en el laboratorio hasta su total licuación. Se inyectaron en el cromatógrafo alícuotas de 20 μ l, bajo las condiciones de trabajo descritas en el apartado "Método" para el análisis de las resinas compuestas. La confirmación de la presencia de monómeros se realizó mediante CG/EM.

Preparación de las muestras de saliva para el ensayo E-SCREEN

Las muestras de saliva tras ser descongeladas a temperatura ambiente, se volvieron a filtrar a través de filtro Millipore de 0,22 μ m. A continuación se realizaron diluciones en medio de cultivo a concentraciones 1/10 y 1/50 para comprobar el efecto proliferativo en el test E-SCREEN.

3. METODOLOGIA BIOLOGICA

Medios de cultivo

Para su mantenimiento las células MCF7 se cultivaron en monocapa, utilizando cajas T-25 y T-75 de poliestireno especialmente tratado que contenían medios MEM o DME suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS).

La regulación del pH del medio se efectuó utilizando como tampón CO_3HNa y HEPES a concentraciones finales de $4,2 \mu\text{l}$ y 20 mM respectivamente.

En algunos casos, no rutinariamente, se procedió a la adición al medio de cultivo de penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 $\mu\text{g/ml}$ y gentamicina 40 mcg/ml, con el objeto de prevenir y evitar el crecimiento bacteriano.

Los medios, una vez preparados, se reesterilizaron mediante su paso a través de unidades de filtración con filtros de $0.22 \mu\text{m}$ de tamaño de poro.

Preparación del suero libre de estrógenos

Para el cultivo celular en medio libre de estrógenos, además del empleo de medio DME libre de rojo fenol (DME-RF), se utilizó suero humano desprovisto de estrógenos mediante la técnica del carbón dextrano. De forma resumida la metodología a seguir fue:

1. Preparación de una disolución de carbón activo 5% en agua estéril. Agitación.
2. Centrifugación a 500 rpm durante 5 min.
3. Aspiración del sobrenadante y repetición del proceso de lavado por triplicado.
4. Adición de dextrano T-70, 0.5% al "pellet" de carbón.
5. Resuspensión de la mezcla de carbón y dextrano. Agitación.

6. Centrifugación durante 10 min. a 2.500 rpm.
7. Tras aspiración del sobrenadante, adición del suero al "pellet" resultante. Agitación.
8. Colocación en baño a 37° C, con agitación continua durante 1 hora.
9. Centrifugación a 2.500 rpm durante 10 min.
10. Filtración del sobrenadante sobre filtros de esterilización de 0.22 μm de diámetro.
11. El suero desprovisto de estrógenos endógenos se almacena a -20°C hasta su uso.

Técnicas de mantenimiento

El subcultivo celular se llevó a cabo cuando el tapiz celular estuvo próximo a la confluencia. Para ello se procedió al despegue de las células del soporte sobre el cual están adheridas, tratándolas con una solución de Tripsina 0.05% y EDTA 0.025%. Una alícuota de la suspensión celular resultante se pasó a una nueva caja de cultivo con medio fresco convenientemente preparado. El control del estado del cultivo celular se realizó mediante análisis periódico utilizando un microscopio óptico invertido con contraste de fases.

Evaluación del número de células: Método SRB

Se ha empleado la metodología descrita previamente por Skehan (Skehan y col., 1990), ligeramente modificada (Villalobos y cols., 1995):

1. El tapiz celular se trata con ácido tricloro acético al 10%, frío, y se incuba durante 30 minutos a 4°C grados.
2. A continuación se lava con agua destilada y las cajas se dejan secar.
3. Las células así fijadas se tiñen, durante 15 minutos, con sulforrodamina-B (SRB) al 0,4% en ácido acético al 1%.
4. Se lava el tapiz con ácido acético al 1% y de nuevo se dejan secar las placas.

5. El colorante fijado sobre las células se solubiliza con una solución 10 mM Tris base (pH 10.5) con agitación suave.
6. Alícuotas de 100 μ l son transferidas a placas de 96 pocillos y leídas en un colorímetro Titertek multiscan (Flow, Irvine, CA, USA) a 492 nm.

La tabla XXII muestra los valores del ensayo de Sulforrodamina-B para una densidad óptica de 492 nm.

Tabla XXII: Ensayo de Sulforrodamina-B
(Densidad óptica a 492 nm.)

Nº CELULAS (x10 ³)	MCF7 O.P.
12,0	0,068±0,002
25,0	0,074±0,001
50,0	0,104±0,002
75,0	0,163±0,009
100,0	0,199±0,007
150,0	0,252±0,023
200,0	0,309±0,016
300,0	0,413±0,021
400,0	0,501±0,032

La figura 20 muestra la curva de calibrado para el test de la Sulforrodamina-B.

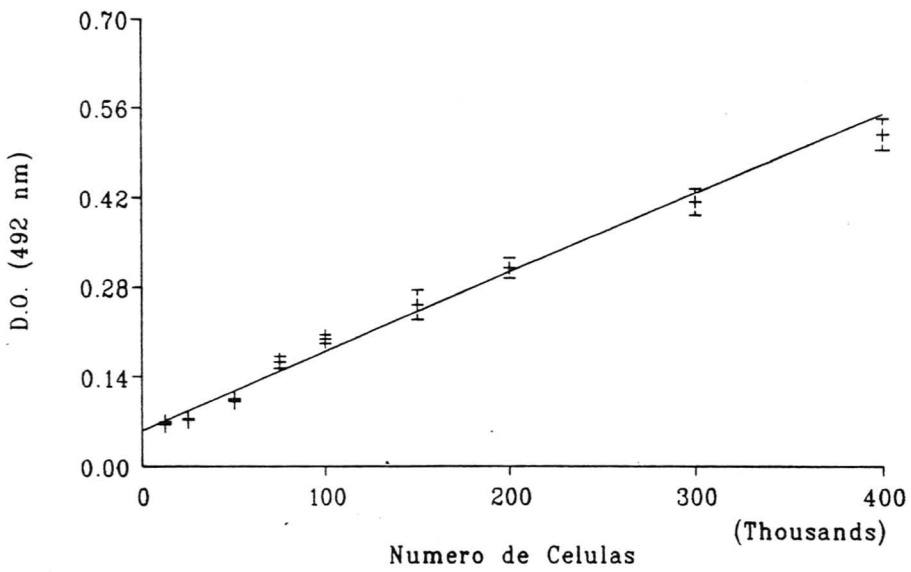


Figura 20: Curva de calibrado de la Sulforrodamina-B.

Experimentos de proliferación celular: Test E-SCREEN

El test E-SCREEN se realizó siguiendo la metodología previamente descrita por Soto y col. (1992) y modificado por Villalobos y col. (1995) De forma resumida:

1. Aproximadamente 10.000 células se siembran en placas de 24 pocillos en el medio de cultivo DME+10%FBS.
2. Pasadas 24-48 horas de la siembra, una vez que las células se han adherido al soporte plástico, el medio se reemplaza por DME(-RF) suplementado con 10% de CDHuS.
3. Estradiol-17 β o los compuestos a testar por su actividad estrogénica se añaden sobre el medio de cultivo en las diluciones indicadas en cada caso.
4. El ensayo finaliza a las 144 horas de subcultivo, tras la aspiración de los medios y la fijación de las células para la aplicación de la técnica de la sulforrodamina-B.

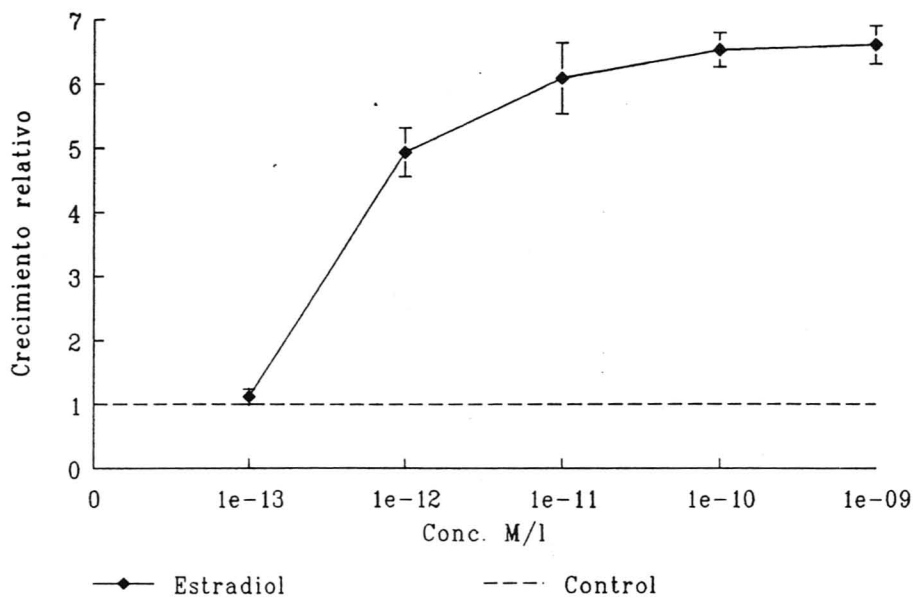
Siguiendo la metodología descrita, el crecimiento celular en presencia de estradiol-17 β , estimado con la técnica de la sulforrodamina-B, se expresa frente al crecimiento de grupos celulares no tratados (controles). Cada ensayo queda estandarizado a un valor de crecimiento 1 para los controles y se expresa la media, desviación estándar y error estándar de la media del incremento del número de células frente al control (Tabla XXIII).

Los valores medios de los resultados obtenidos en las distintas condiciones experimentales fueron comparadas mediante el test estadístico *t* de Student. La significación estadística de las diferencias queda indicada en las tablas como + ($p < 0,01$) y * ($p < 0,001$).

La figura 21 representa gráficamente los datos numéricos recogidos en la tabla XXIII del crecimiento celular relativo para diferentes concentraciones de estradiol-17 β y se incluye el crecimiento de los grupos celulares control, que se expresan por una línea de puntos en tasa de crecimiento uno.

Tabla XXIII: Estradiol-17 β .

Concentración	10^{-13}	10^{-12}	10^{-11}	10^{-10}	10^{-9}
Media	1,12	4,93*	6,09*	6,53*	6,61*
Desv. Estándar	0,12	0,38	0,55	0,27	0,30
Error Estándar	0,06	0,19	0,27	0,13	0,15

Figura 21: Crecimiento frente a Estradiol-17 β y grupo Control.

Una vez conocida la tasa máxima de proliferación celular en el E-SCREEN para cada compuesto testado, se procede a calcular la eficacia proliferativa relativa (EPR). Para ello se divide la tasa máxima de proliferación celular obtenida en cada compuesto entre la tasa máxima de proliferación celular obtenida por el estradiol-17 β , que se sitúa en $6,09 \pm 0,55$ sobre el control, restando tanto al numerador como al denominador de esta fracción una unidad, valor que representa la proliferación registrada en el grupo control. El valor resultante se expresa en tanto por ciento, estimado el 100% para el estradiol-17 β .

Igualmente se ha estimado la potencia proliferativa relativa (PPR), calculada como el cociente entre la concentración a la que el estradiol-17 β presenta su máximo efecto proliferativo y aquella con la que el producto testado consigue la máxima capacidad proliferativa. El valor resultante se expresa en tanto por ciento, estimado el 100% para el estradiol-17 β .

Cuantificación de los receptores de estrógenos y progesterona

La cuantificación de los receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RPg) se hizo mediante la metodología descrita en los kits comerciales ER y PgR EIA, tras la obtención de la fracción soluble del citoplasma de las células MCF7. El protocolo experimental previo a la determinación de los receptores hormonales es el siguiente:

1. Las células se siembran en cajas de cultivo T-25, en medio DME + 5% FBS.
2. A las 24 horas, el medio se cambia por DME(-RF)+ 10% CDHuS y el estradiol-17 β o los compuestos a testar se añaden en el rango de concentraciones indicado en cada experimento.
3. Tras 72 horas de subcultivo, se elimina el medio por aspiración y las cajas se congelan rápidamente en nitrógeno líquido, donde quedan almacenadas hasta su posterior procesamiento.
4. Tras descongelación, en el día del ensayo de receptores, el tapíz celular se trata con una solución tampón conteniendo 0.5M KCl, 10 mM fosfato

potásico, 1,5 mM EDTA y 1mM monotioglicerol a pH 7,4, durante 30 minutos a 4°C (Maddedu, 1987).

5. El detrito celular se precipita por centrifugación y 100 μ l de la fracción soluble se utilizan para la cuantificación de los receptores hormonales.

Siguiendo este protocolo, la tabla XXIV muestra los resultados obtenidos en esta experiencia para el estradiol-17 β y el grupo control. Se indica el crecimiento celular, expresado como cantidad de proteína extraída del tapiz celular, la concentración bruta de receptor de estrógenos y el cociente entre ambas magnitudes. Además, se indica el porcentaje de variación de la concentración de receptor estrogénico tomando como referencia el 100% para el grupo celular control.

Los valores medios de los resultados obtenidos en las distintas condiciones experimentales fueron comparadas mediante el test estadístico *t* de Student. La significación estadística de las diferencias queda indicada en las tablas como + ($p < 0,01$) y * ($p < 0,001$).

La figura 22 muestra gráficamente los resultados obtenidos en este tipo de experimentos.

Tabla XXIV: Concentración de receptor estrogénico (RE) Estradiol-17 β y grupo control.

PRODUCTO [Conc.]	[Prot.] (mg/ml)	RE (fmol/ml)	RE/[Prot.] (fmol/mg)	Variación (%)
CONTROL [0]	1,1 \pm 0,1	202,3 \pm 15,1	183,9 \pm 59,0	100,0
ESTRADIOL- 17 β [1 nM]	1,5 \pm 0,1	138,5 \pm 7,3	92,6 \pm 13,1*	50,4

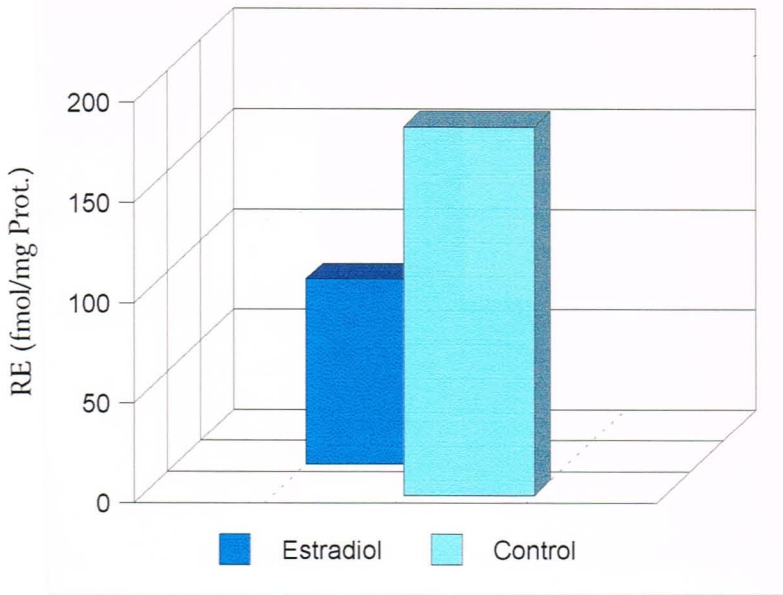


Figura 22: Concentración de receptor estrogénico (RE) Estradiol-17 β y grupo control.

Por lo que se refiere al receptor de progesterona, la tabla XXV muestra los resultados obtenidos. Se indica el crecimiento celular, expresado como cantidad de proteína extraída del tapíz celular, la concentración bruta de receptor de progesterona y el cociente entre ambas magnitudes. Además, se indica el porcentaje de variación de la concentración de receptor de progesterona tomando como referencia el 100% para el grupo celular control.

Los valores medios de los resultados obtenidos en las distintas condiciones experimentales fueron comparadas mediante el test estadístico *t* de Student. La significación estadística de las diferencias queda indicada en la tabla como + ($p < 0,01$) y * ($p < 0,001$).

La figura 23 muestra gráficamente los resultados obtenidos en este tipo de experimentos.

Tabla XXV: Concentración de receptores de Progesterona (RPg) en Estradiol-17 β y grupo control.

PRODUCTO [Conc.]	[Prot.] (mg/ml)	RPg (fmol/ml)	RPg/[Prot.] (fmol/mg)	Variación (%)
CONTROL [0]	1,1 \pm 0,1	18,0 \pm 5,2	16,4 \pm 3,0	100,0
ESTRADIOL- 17 β [1 nM]	1,5 \pm 0,1	229,7 \pm 6,9	153,1 \pm 10,5*	900,30

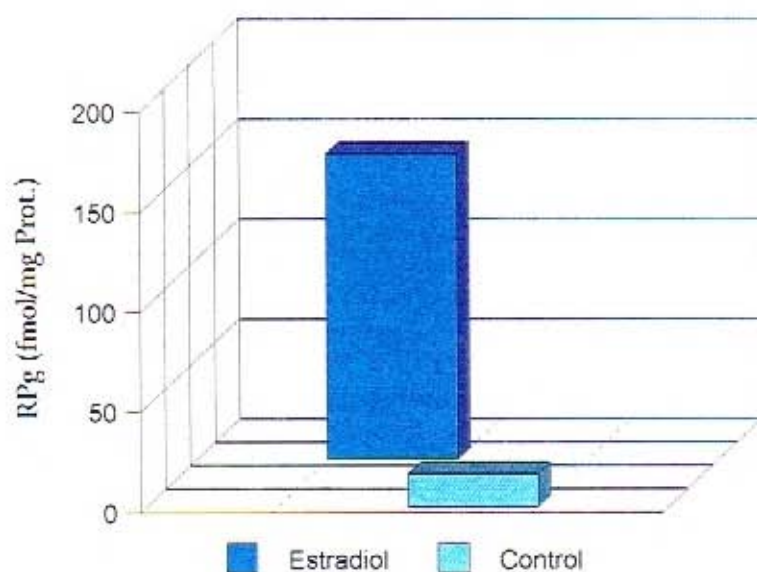


Figura 23: Concentración de receptores de Progesterona (RPg) en Estradiol-17 β y grupo control.

Cuantificación de pS2

Esta proteína es secretada por las células MCF7 por lo que se cuantifica en el medio de cultivo. En experimentos en los cuales se testa la capacidad proliferativa de estradiol-17 β y otros compuestos estrogénicos se desarrolla el siguiente protocolo:

1. El medio extracelular es recogido tras 144 horas de subcultivo.
2. Tras centrifugación (2.500 rpm/10 minutos) para eliminar las células despegadas y el detrito celular, alícuotas de los medios se almacenan a -80°C hasta su procesamiento.
3. Se sigue entonces la metodología descrita en el kit comercial ELSA-PS2, una vez efectuadas las diluciones indicadas.

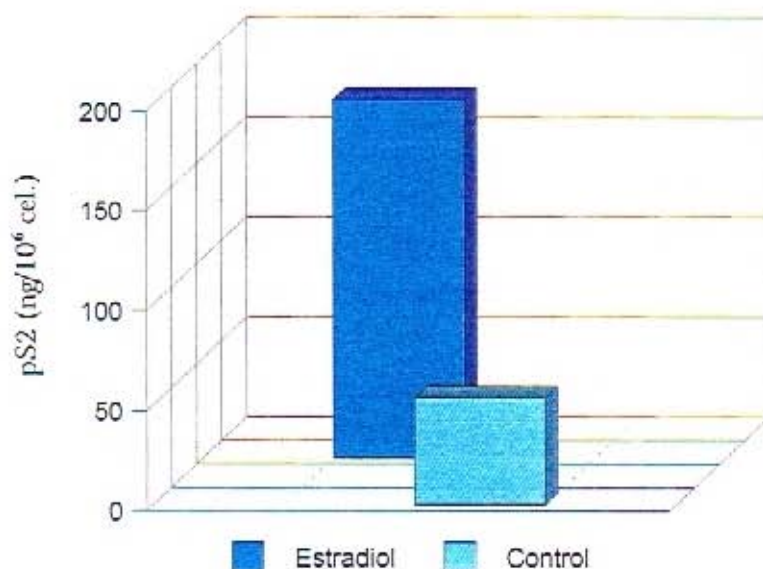
La Tabla XXVI muestra las tasas de crecimiento celular, expresadas en número de células tras 144 horas de subcultivo, y la concentración de pS2 acumulada en el medio extracelular durante dicho tiempo por las MCF7 en presencia de estradiol-17 β . También se recoge la expresión relativa de la concentración de la proteína y el número celular y el factor de incremento respecto a grupos celulares control, a los que se asigna un valor de 1.

Los valores medios de los resultados obtenidos en las distintas condiciones experimentales fueron comparadas mediante el test estadístico *t* de Student. La significación estadística de las diferencias queda indicada en las tablas como + ($p < 0,01$) y * ($p < 0,001$).

La figura 24 muestra gráficamente los resultados obtenidos en este tipo de experimentos.

Tabla XXVI: Secreción de pS2 en grupo control y en Estradiol-17 β .

PRODUCTO [Conc.]	Nº céls/poc. (x10 ³)	pS2 (ng/ml)	pS2/NºCéls. (ng/10 ⁶)	Variación
CONTROL [0]	63,2±1,4	3,4±1,1	53,6±8,7	1,0
ESTRADIOL- 17 β [1 nM]	378,3±11,1	67,9±7,3	179,4±13,1*	3,3

Figura 24: Secreción de pS2 en grupo control y en Estradiol 17 β .

Estudios de enlace al receptor estrogénico

En los estudios de afinidad de los diferentes compuestos químicos al receptor estrogénico se ha utilizado el receptor hormonal aislado de útero de ratas inmaduras. Para ello se ha preparado la fracción citosólica del homogenizado tisular de los úteros de rata. Para cada grupo de diez animales se ha procedido en la siguiente forma:

1. Extracción de los úteros, limpieza de grasa y corte en fragmentos de 1 mm de longitud.
2. Homogenización en "poter" de teflón, 4 pulsos de 2 min. en el tampón adecuado Tris-ClH (50 mM TrisClH, 0,1 mM EDTA, 10 mM de molibdato sódico y 1 mM de monotioglicerol, pH=7.4) en baño a 4°C.
3. Ultracentrifugación en ultracentrífuga Beckman L7-80, a 105.000 g, durante 1 h a 4°C.

Alícuotas del citosol obtenido son guardadas a -70°C hasta su uso tras haber cuantificado la concentración proteica y ajustado ésta en un rango de 2-3 mg/ml de proteína. Previamente al ensayo de competencia se realiza, para cada lote de úteros, un test de enlace completo para estimar la concentración de receptor estrogénico y la constante de afinidad del proceso de enlace.

En los ensayos de cuantificación del receptor estrogénico se ha empleado como hormona marcada [2,4,6,7-³H]estradiol-17β con una actividad específica 103 Bq/mmol de Amersham (Buckinghamshire, Gran Bretaña). Las concentraciones de la hormona marcada se establecieron en el rango 0.5 a 20 nM y el competidor empleado, estradiol no marcado, se utilizó en un exceso de 300 veces sobre la concentración de la hormona marcada. La incubación se llevó a cabo en el mismo tampón de homogenización, a 4°C durante 18 h. Transcurrido este tiempo se separa la fracción libre de la ligada mediante la incubación con una suspensión de carbón dextrano (0.1 y 0.01%, respectivamente) y centrifugación a 3000 g durante 20 min a 4°C. Una alícuota de la fracción sobrenadante se cuenta en un contador-β durante 5 min.

El cálculo de las afinidades entre la hormona y su receptor se hizo mediante la estimación de la capacidad máxima de enlace y la constante de afinidad del proceso siguiendo el método de Scatchard (Scatchard, 1.990).

Los datos de enlace nos permitieron conocer que la capacidad máxima de unión del receptor obtenido a partir del tejido uterino se encuentra en el rango 50 a 70 fmol/mg de proteína citosólica, con una constante de disociación $K_d = 1$ nM. Además, permitieron establecer que una concentración de estradiol marcado en torno a 2 nM es la óptima para los estudios de competitividad.

El test de competencia de los distintos compuestos químicos se hizo de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Alícuotas de 200 μ l de citosol se incubaron -4°C , 18 h con una concentración constante de estradiol tritiado ajustada a 2 nM y concentraciones variables de estradiol-17 no marcado (1 pM a 1 μ M) o de los diferentes compuestos testados en el rango 1 nM a 100 μ M.
2. La incubación se paró con la adición de 300 μ l de una suspensión de carbón dextrano de las características y concentración indicadas anteriormente para el ensayo de cuantificación de receptores.
3. Una alícuota de 400 μ l del sobrenadante fue medida en el contador β .
4. Alícuotas del mismo citosol fueron incubadas en paralelo con idéntico volumen de tampón, no conteniendo competidor alguno, para la estimación de la capacidad máxima de enlace y con una concentración 1 μ M de DES para la estimación de la fracción ligada de forma no específica por proteínas distintas del receptor estrogénico (Enlaces no específicos).

Los cálculos de la afinidad relativa (RBA) de cada compuesto en su unión al receptor estrogénico son efectuados de acuerdo con el siguiente procedimiento:

$$\text{RBA} = \frac{\text{Actividad ligada compuesto X - Enlaces no específicos}}{\text{Actividad ligada estradiol - Enlaces no específicos}} \times 100$$

Finalmente se representan las concentraciones testadas de cada producto, incluido el estradiol-17 β , frente al porcentaje de inhibición del enlace entre el receptor y el estradiol tritiado. La estimación de la concentración de cada producto para inhibir el 50% del enlace es expresada como el RBA50%.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE COMPOSITOS Y SELLADORES

Se han considerado como variables fundamentales del estudio, el pH del medio y la temperatura. Se ha trabajado apareando las variables.

Valores de pH: 1, 7, 9, y 12, regulados, respectivamente, con disolución Normal de ClH, en suspensión en agua destilada, solución saturada de CO_3HNa y disolución Normal de NaOH. Las temperaturas que se han empleado para cada uno de los valores de pH han sido 37 °C y 100 °C. Cuando se trabaja a 37 °C, las muestras se han mantenido en estufa 24 horas a esta temperatura, mientras que en los análisis a 100 °C sólo han permanecido una hora. En consecuencia cada producto comercial se ha analizado en ocho condiciones fisicoquímicas diferentes, tanto en el caso de muestras polimerizadas como sin polimerizar.

El análisis cromatográfico se ha realizado mediante HPLC siguiendo la metodología descrita en el capítulo "Método" para los monómeros constituyentes de las resinas epoxi.

Análisis cuantitativo mediante HPLC

Una alícuota de 20 μl de la disolución acuosa en contacto con los composites, una vez filtrada, era inyectada en el cromatógrafo, siguiendo las condiciones cromatográficas ya descritas. Las tablas XXVII a XLII muestran los valores medios con las desviaciones estándar de las concentraciones de los distintos componentes identificados en cada muestra comercial (BFA=Bisfenol A; EBFA=Etoxilato de BFA; PBFA=Propoxilato de BFA; BADGE= Diglicidileter de BFA; BisGMA=Glicidilmetacrilato de BFA; BisDMA=Dimetacrilato de BFA).

Tabla XXVII: Elución de monómeros en muestras polimerizadas del Composite Brilliant ($\bar{x} \pm \sigma$).

TEMP.	PH	COMPUESTO ($\mu\text{g/ml}$)					
		BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
37°	1	--	--	--	--	--	--
	7	--	--	--	--	--	--
	9	0,7±0,6	--	--	--	--	--
	12	11,3±0,7	--	--	9,4±0,6	22,8±0,6	--
100°	1	--	--	--	--	--	--
	7	--	--	--	--	--	--
	9	34,3±2,0	--	--	--	18,1±1,6	3,7±0,5
	12	231,1±6,8	--	--	--	8,4±0,6	4,2±0,4

Tabla XXVIII: Elución de monómeros en muestras sin polimerizar del Composite Brilliant ($\bar{x} \pm \sigma$).

TEMP.	PH	COMPUESTO ($\mu\text{g/ml}$)					
		BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
37°	1	0,3±0,0	--	--	--	--	--
	7	0,2±0,0	--	--	1,4±0,1	--	--
	9	1,0±0,1	--	--	2,6±0,3	--	--
	12	9,4±0,6	--	--	15,4±0,7	37,6±1,6	--
100°	1	18,7±1,5	--	--	--	--	--
	7	10,8±0,7	--	--	7,4±0,6	--	0,9±0,3
	9	16,8±1,1	--	--	74,3±6,1	0,8±0,1	9,5±0,6
	12	33,0±2,6	--	--	119,3±8,8	--	14,6±0,9

Tabla XXIX: Elución de monómeros en muestras polimerizadas del Composite Charisma ($\bar{x} \pm \sigma$).

TEMP.	PH	COMPUESTO ($\mu\text{g/ml}$)					
		BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
37°	1	2,7±0,4	--	--	3,6±0,4	4,3±0,6	3,8±0,6
	7	1,4±0,3	--	--	2,6±0,4	2,6±0,5	5,9±0,4
	9	7,6±0,7	--	--	15,7±1,5	--	7,0±0,3
	12	19,5±0,5	--	--	8,2±0,3	--	--
100°	1	31,9±1,7	--	30,7±2,3	--	2,6±0,6	--
	7	7,5±0,6	--	81,7±6,9	166,5±16,0	108,0±7,9	0,3±0,2
	9	11,4±9,9	--	--	--	2,5±0,6	--
	12	55,1±5,0	--	1,1±0,2	--	4,9±0,3	--

Tabla XXX: Elución de monómeros en muestras sin polimerizar del Composite Charisma ($\bar{x} \pm \sigma$).

TEMP.	PH	COMPUESTO ($\mu\text{g/ml}$)					
		BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
37°	1	179,5±19,1	--	--	--	--	--
	7	155,9±17,7	--	--	--	--	--
	9	168,2±14,1	--	--	--	--	--
	12	155,3±12,8	--	--	--	--	--
100°	1	49,1±7,0	--	--	28,3±2,1	29,7±2,4	0,8±0,3
	7	29,2±25,3	--	--	1,6±1,4	3,7±0,5	--
	9	15,3±2,0	--	--	20,3±1,8	311,2±16,7	2,0±0,2
	12	121,6±13,6	--	--	3,3±0,3	138,1±8,1	--

Tabla XXXI: Elución de monómeros en muestras polimerizadas del Composite Pekalux ($\bar{x} \pm \sigma$).

TEMP.	PH	COMPUESTO ($\mu\text{g/ml}$)					
		BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
37°	1	0,8±0,3	--	--	51,7±4,4	9,7±0,7	2,8±1,5
	7	0,6±0,3	--	--	1,4±2,4	--	--
	9	0,8±0,3	--	--	--	2,2±0,2	26,6±1,9
	12	17,8±2,1	--	--	4,8±0,6	2,1±0,3	114,9±11,8
100°	1	47,8±4,6	--	107,1±10,3	90,2±7,4	95,1±4,6	1,4±0,1
	7	24,3±1,8	--	81,9±7,9	31,9±1,8	98,1±6,1	2,2±0,3
	9	76,8±4,9	--	18,3±2,8	21,6±0,8	12,4±1,1	--
	12	355,1±33,4	--	19,6±2,4	20,0±1,4	17,7±0,8	11,25±0,9

Tabla XXXII: Elución de monómeros en muestras sin polimerizar del Composite Pekalux ($\bar{x} \pm \sigma$).

TEMP.	PH	COMPUESTO ($\mu\text{g/ml}$)					
		BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
37°	1	5,8±0,6	1,5±1,3	--	16,6±1,4	--	--
	7	13,2 ±1,3	4,6±0,5	10,4±1,1	24,1±2,1	--	--
	9	18,5±1,5	15,8±0,9	6,5±0,7	2,6±0,6	4,8±0,6	--
	12	10,7±1,9	3,3±0,2	7,6±0,7	12,2±1,2	--	--
100°	1	22,1±1,7	--	5,6±0,6	123,4±12,5	8,0±0,6	--
	7	1,3±0,4	--	5,4±0,4	8,9±1,0	3,1±0,5	--
	9	11,9±1,0	--	2,7±3,3	12,2±0,9	2,3±0,5	0,7±0,6
	12	110,0±8,3	--	--	21,6±1,6	14,2±1,0	93,4±6,1

Tabla XXXIII: Elución de monómeros en muestras polymerizadas del Composite Polofil
($\bar{x} \pm \sigma$).

TEMP.	PH	COMPUESTO ($\mu\text{g/ml}$)					
		BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
37°	1	0,7±0,3	--	--	--	--	4,1±0,3
	7	0,8±0,2	--	--	7,8±0,7	--	--
	9	2,8±0,2	--	--	2,5±0,4	--	17,8±0,9
	12	0,6±0,3	--	--	2,9±0,3	--	12,1±0,9
100°	1	--	--	--	--	20,8±1,1	--
	7	10,6±1,3	--	--	--	1,8±0,1	--
	9	24,7±3,1	--	--	--	37,3±2,1	1,0±0,2
	12	357,3±20,4	--	--	--	3,3±0,1	2,8±0,3

Tabla XXXIV: Elución de monómeros en muestras sin polymerizar del Composite Polofil
($\bar{x} \pm \sigma$).

TEMP.	PH	COMPUESTO ($\mu\text{g/ml}$)					
		BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
37°	1	0,1±0,1	--	--	--	--	--
	7	0,1±0,1	--	--	5,5±0,5	--	--
	9	0,1±0,0	--	--	--	--	--
	12	0,1±0,1	--	--	2,1±0,2	1,5±0,2	3,2±0,3
100°	1	13,7±0,9	--	--	245,3±17,2	--	--
	7	11,9±0,9	--	--	8,8±0,8	--	0,5±0,1
	9	15,4±1,0	--	--	10,3±1,0	17,5±0,6	1,4±0,5
	12	34,6±2,5	--	--	12,7±0,9	21,2±1,2	--

Tabla XXXV: Elución de monómeros en muestras polimerizadas del Composite Silux ($\bar{x} \pm \sigma$).

TEMP.	PH	COMPUESTO ($\mu\text{g/ml}$)					
		BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
37°	1	0,6±0,1	1,6±0,3	--	--	--	--
	7	16,5±1,3	1,1±0,2	--	--	--	--
	9	5,4±0,2	--	--	17,1±1,5	--	--
	12	10,3±0,7	1,2±0,2	--	--	--	--
100°	1	1,9±0,2	--	--	--	--	--
	7	10,0±0,8	--	--	--	4,9±0,6	--
	9	18,7±1,5	--	--	--	1,5±0,3	--
	12	47,4±3,0	--	--	--	--	7,3±0,6

Tabla XXXVI: Elución de monómeros en muestras sin polimerizar del Composite Silux ($\bar{x} \pm \sigma$).

TEMP.	PH	COMPUESTO ($\mu\text{g/ml}$)					
		BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
37°	1	14,8±1,1	30,4±1,5	--	27,4±2,5	--	--
	7	16,9±13,3	19,0±0,9	--	8,3±1,3	--	--
	9	47,5±2,5	20,3±1,0	--	16,6±1,3	--	--
	12	16,2±1,0	31,8±1,5	--	2,9±0,3	--	--
100°	1	82,1±5,9	--	--	6,7±0,7	--	0,1±0,2
	7	22,7±1,5	--	--	--	--	--
	9	306,4±24,9	--	--	13,3±1,2	--	--
	12	909,6±47,9	--	--	183,0±11,5	257,3±9,1	14,8±0,9

Tabla XXXVII: Elución de monómeros en muestras polimerizadas del Composite Tetric
($\bar{x} \pm \sigma$).

TEMP.	PH	COMPUESTO ($\mu\text{g/ml}$)					
		BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
37°	1	9,7±0,7	8,6±0,4	--	9,8±0,8	1,9±0,4	--
	7	12,9±1,0	9,6±0,5	--	9,6±0,8	0,4±0,4	--
	9	21,1±1,0	--	--	105,1±9,5	1,4±0,4	0,4±0,3
	12	116,1±6,0	--	--	--	--	--
100°	1	31,6±2,6	9,1±0,6	--	--	3,1±0,2	--
	7	36,2±2,7	13,8±0,7	--	3,3±0,3	--	--
	9	28,3±0,3	89,0±4,5	--	161,8±13,5	--	1,5±0,3
	12	264,3±14,6	15,2±0,7	--	5,5±0,5	--	0,3±0,3

Tabla XXXVIII: Elución de monómeros en muestras sin polimerizar del Composite Tetric
($\bar{x} \pm \sigma$).

TEMP.	PH	COMPUESTO ($\mu\text{g/ml}$)					
		BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
37°	1	1,9±0,4	--	--	--	--	--
	7	0,0±0,0	--	--	13,4±1,2	--	--
	9	0,6±0,6	--	--	14,1±1,2	--	--
	12	2,5±0,3	--	--	14,0±1,2	--	--
100°	1	292,9±17,5	--	--	--	1,0±0,1	0,2±0,2
	7	380,0±20,7	--	--	34,6±3,2	36,7±1,4	0,3±0,2
	9	721,1±28,3	--	--	--	12,6±0,6	0,3±0,3
	12	321,7±22,7	--	--	3,1±0,3	8,8±0,6	38,6±1,8

Tabla XXXIX: Elución de monómeros en muestras polimerizadas del Composite Z-100 ($\bar{x} \pm \sigma$).

TEMP.	PH	COMPUESTO ($\mu\text{g/ml}$)					
		BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
37°	1	0,3±0,2	--	--	3,4±0,4	--	--
	7	0,3±0,2	--	--	--	5,1±0,4	--
	9	1,5±0,4	--	--	1,5±0,2	--	12,8±0,1
	12	9,3±0,6	--	--	--	--	68,3±5,1
100°	1	5,1±0,5	--	166,2±8,5	--	48,9±2,4	--
	7	3,1±0,4	--	6,9±0,7	--	14,4±0,7	--
	9	2,0±0,1	--	35,9±2,2	--	31,1±1,5	--
	12	20,8±1,6	--	3,3±0,3	--	16,5±0,7	--

Tabla XL: Elución de monómeros en muestras y sin polimerizar del Composite Z-100 ($\bar{x} \pm \sigma$).

TEMP.	PH	COMPUESTO ($\mu\text{g/ml}$)					
		BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
37°	1	21,5±1,6	--	--	--	204,7±10,3	--
	7	24,6±1,7	--	--	59,5±5,1	--	--
	9	37,0±3,0	--	--	71,1±6,0	4,5±0,3	--
	12	23,3±1,5	--	--	--	44,4±2,6	--
100°	1	6,1±0,6	--	25,2±2,2	458,7±25,1	--	--
	7	5,5±0,5	--	7,8±0,6	43,4±3,5	--	--
	9	5,7±0,6	--	4,4±0,4	37,2±3,1	--	0,1±0,2
	12	20,3±1,5	--	3,3±0,4	48,0±4,5	--	4,6±0,4

Tabla XLI: Elución de monómeros en muestras polimerizadas del Sellador Delton ($\bar{x} \pm \sigma$).

TEMP.	PH	COMPUESTO ($\mu\text{g/ml}$)					
		BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
37°	1	6,5±0,6	39,9±1,2	243,0±17,9	63,7±4,6	--	--
	7	42,8±2,7	8,3±0,4	30,7±2,1	309,0±12,9	2,5±0,4	1,8±0,2
	9	22,5±1,4	7,4±0,4	22,5±1,6	171,4±9,0	1,8±0,2	1,3±0,2
	12	28,1±2,0	4,1±0,2	19,9±2,1	60,8±4,7	1,2±0,2	0,3±0,3
100°	1	55,7±3,8	--	--	--	--	--
	7	9,9±0,8	--	--	4,8±0,6	11,1±0,5	4,2±0,3
	9	77,4±4,9	--	--	--	--	0,1±0,1
	12	116,6±8,5	8,1±0,6	--	--	1,7±0,4	0,2±0,2

Tabla XLII: Elución de monómeros en muestras sin polimerizar del Sellador Delton ($\bar{x} \pm \sigma$).

TEMP.	PH	COMPUESTO ($\mu\text{g/ml}$)					
		BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
37°	1	0,0±0,1	--	--	46,2±3,9	10,1±0,6	--
	7	0,4±0,4	--	--	2,9±0,2	31,3±1,4	3,4±0,3
	9	5,4±0,4	--	--	16,3±1,3	1,6±0,4	--
	12	0,0±0,0	--	--	15,5±1,4	--	--
100°	1	15,2±1,2	--	18,8±1,5	1.464,5±59	83,5±4,5	0,4±0,4
	7	22,3±1,4	--	28,6±1,8	670,8±33,4	753,7±22,9	31,5±1,6
	9	10,4±0,6	--	--	785,4±31,9	785,4±31,9	15,4±0,8
	12	252,1±12,8	--	11,0±0,9	1.040,3±43	86,2±3,4	0,4±0,3

A título de ejemplo, las figuras 25 a 32 muestran los cromatogramas correspondientes al análisis mediante HPLC de las muestras de algunos de los composites (Brillant, Charisma, Tetric, Z-100, Polofil y Delton) en las diferentes condiciones de trabajo.

A partir de los tiempos de retención de cada producto, se han identificado los monómeros mayoritarios de interés en esta Memoria.

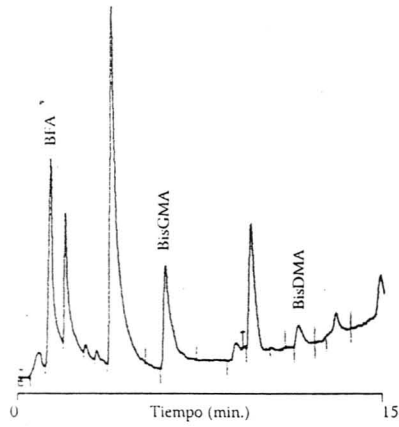


Figura 25: Cromatograma del composite Brillant polimerizado a 100 °C y pH 9.

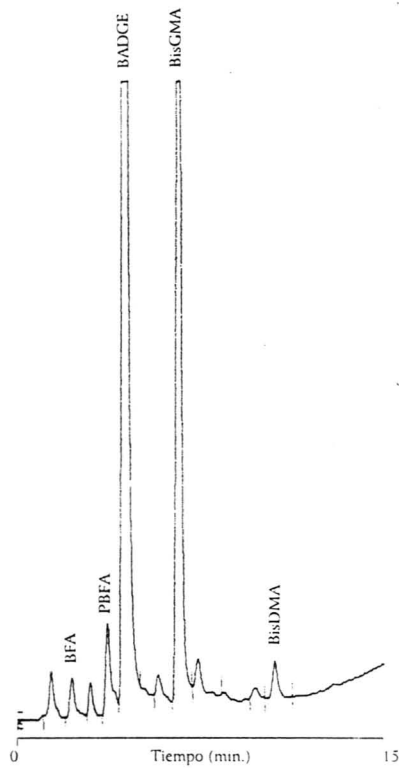


Figura 26: Cromatograma del composite Charisma polimerizado a 100 °C y pH 7.

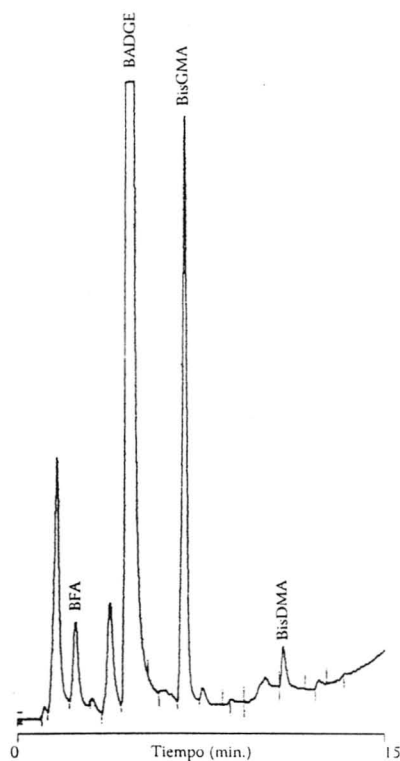


Figura 27: Cromatograma del composite Tetric polimerizado a 37 °C y pH 9.

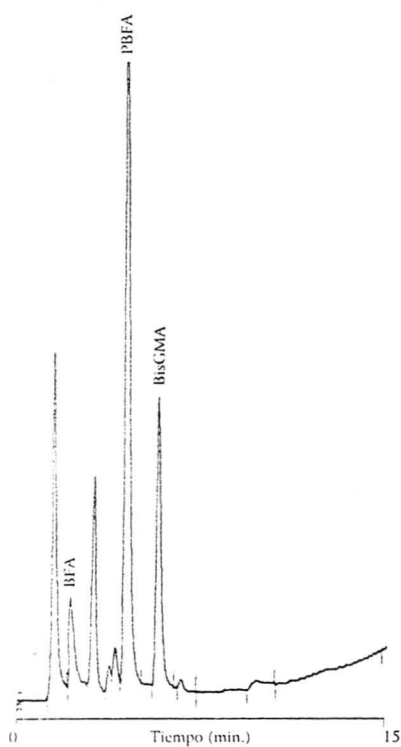


Figura 28: Cromatograma del composite Z-100 polimerizado a 100 °C y pH 1.

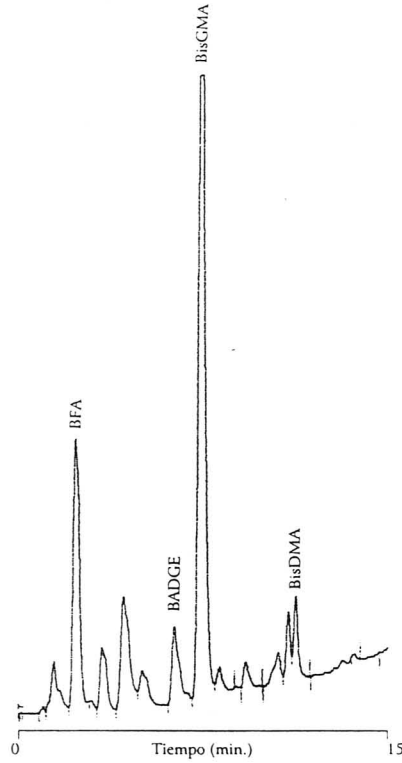


Figura 29: Cromatograma del composite Charisma sin polimerizar a 100 °C y pH 9.

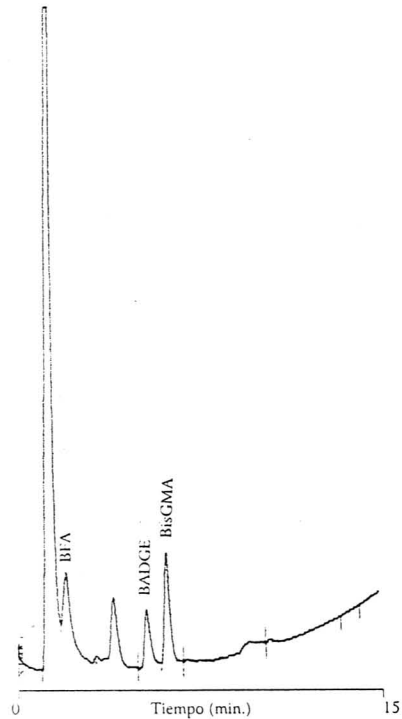


Figura 30: Cromatograma del composite Polofil sin polimerizar a 100 °C y pH 12.

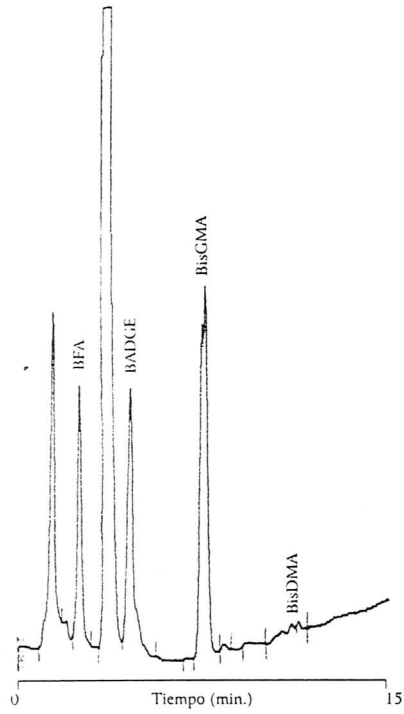


Figura 31: Cromatograma del composite Tetric sin polimerizar a 100 °C y pH 7.

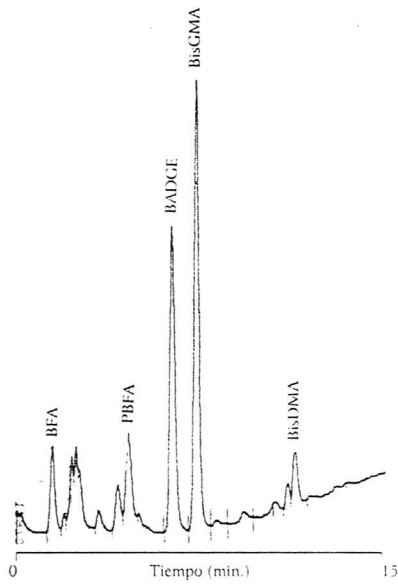


Figura 32: Cromatograma del composite Delton sin polimerizar a 100 °C y pH 7.

Las figuras 33 a 36 corresponden a diagramas de barras en los que gráficamente se observan las diferencias entre las distintas marcas comerciales en cuanto a la elución de BFA desde las muestras.

De igual modo, las figuras 37 a 44 corresponden a los diagramas de barras elaborados a partir de las tablas XXXI-XXXII y XLI-XLII correspondientes al composite Pekalux y al sellador Delton. En ellos se observa la liberación de monómeros desde muestras de estos productos comerciales en las distintas condiciones experimentales propuestas en nuestro trabajo.

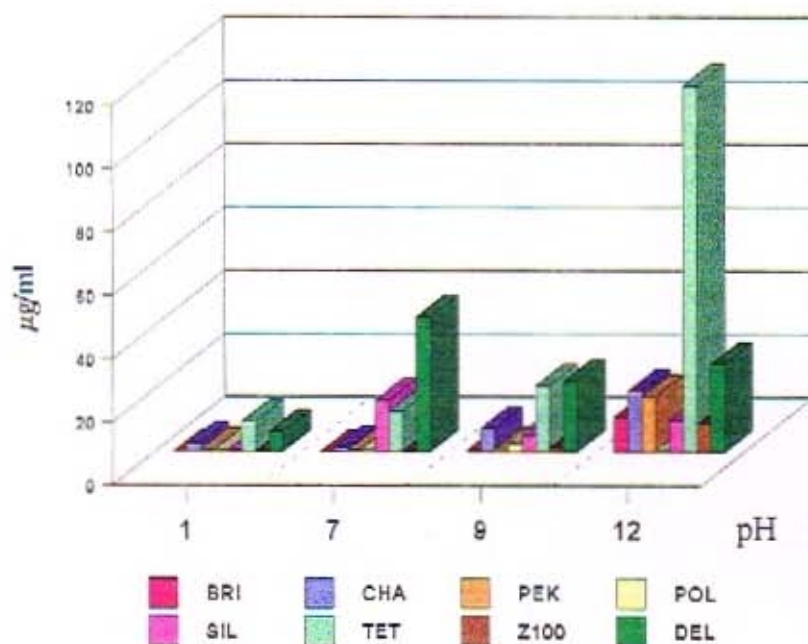


Figura 33: Diagrama de barras de elución de BFA en muestras polimerizadas a 37 °C.

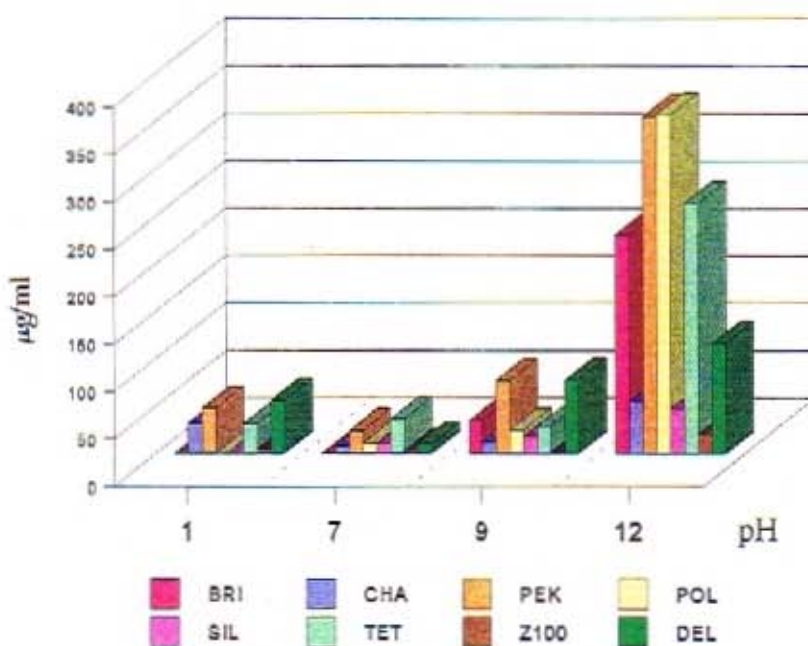


Figura 34: Diagrama de barras de elución de BFA en muestras polimerizadas a 100 °C.

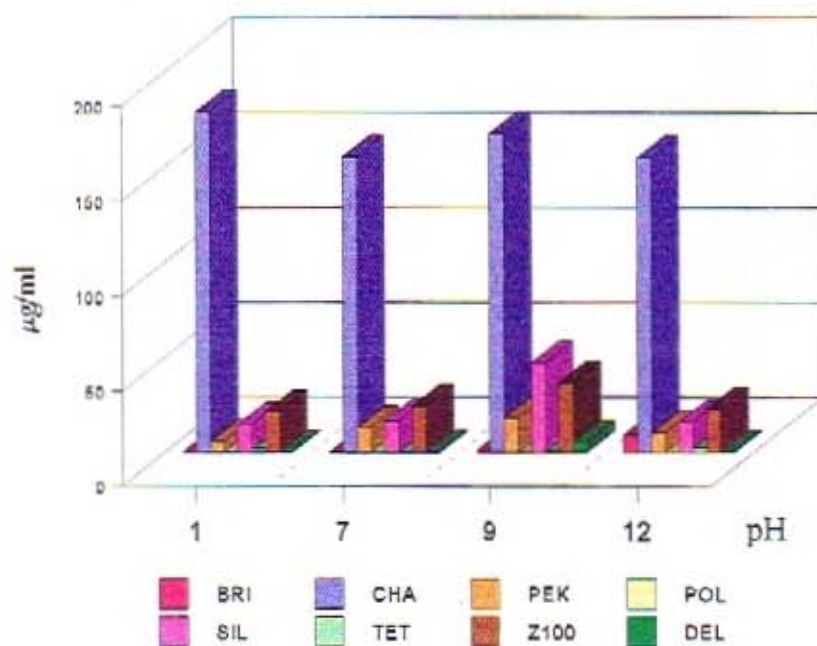


Figura 35: Diagrama de barras de elución de BFA en muestras sin polimerizar a 37 °C.

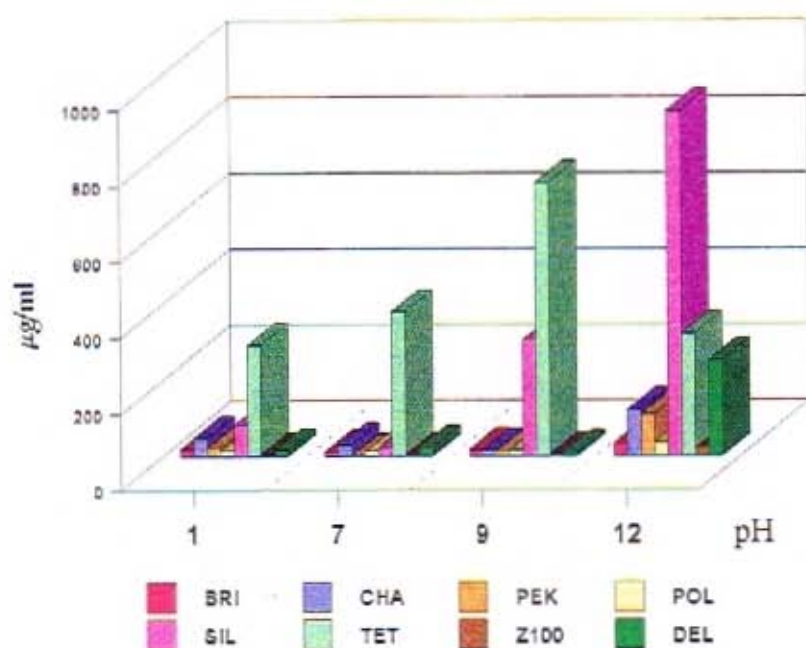


Figura 36: Diagrama de barras de elución de BFA en muestras sin polimerizar a 100 °C.

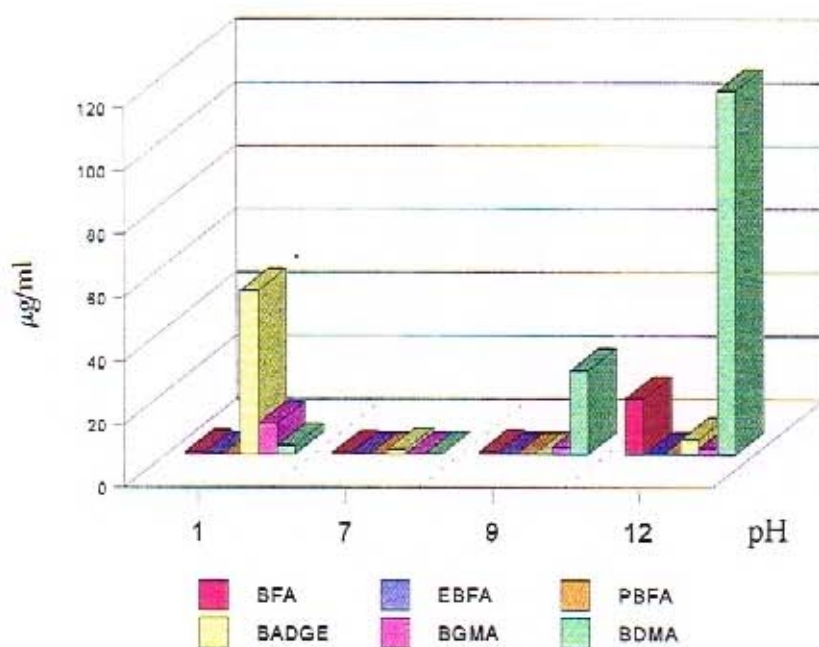


Figura 37: Diagrama de barras con la elución de monómeros de Pekalux en muestras polimerizadas a 37 °C.

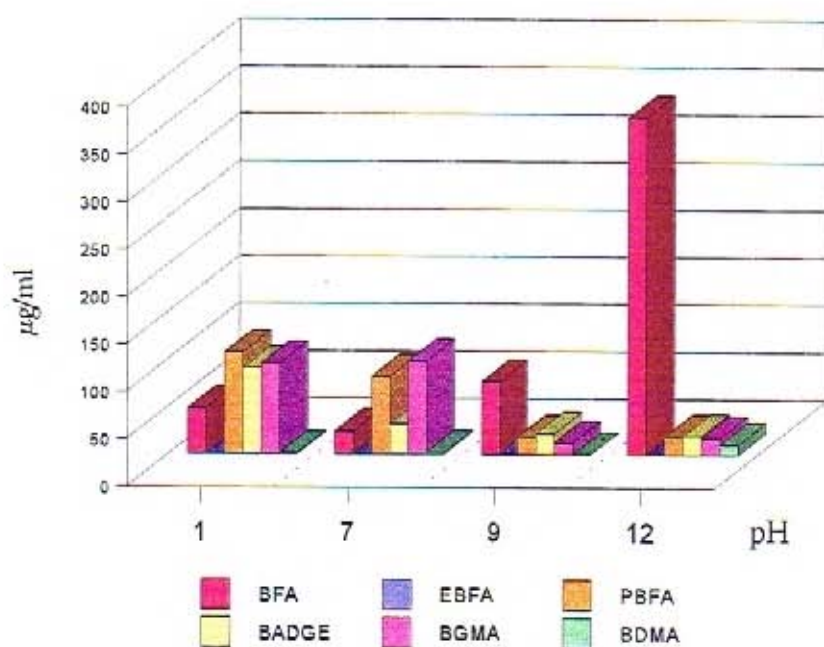


Figura 38: Diagrama de barras con la elución de monómeros de Pekalux en muestras polimerizadas a 100 °C.

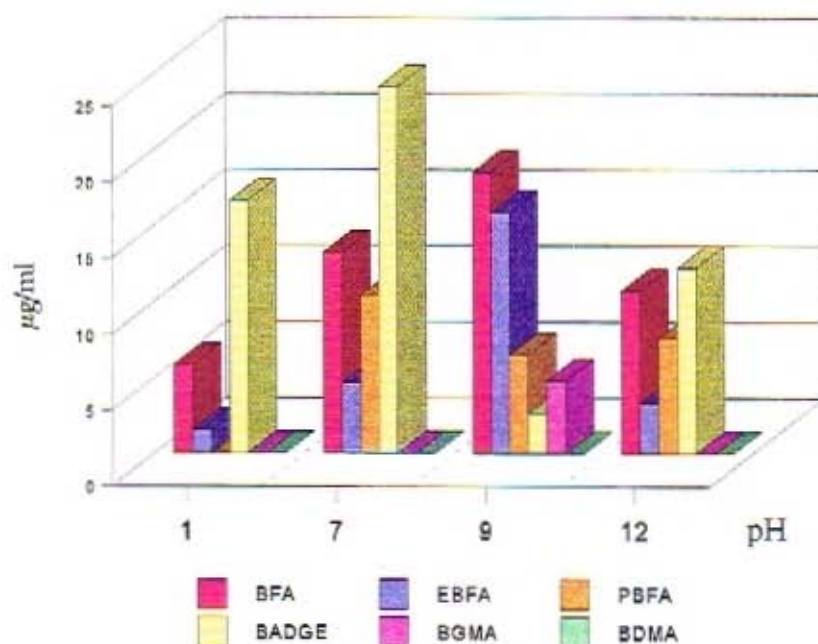


Figura 39: Diagrama de barras con la elución de monómeros de Pekalux en muestras sin polimerizar a 37 °C.

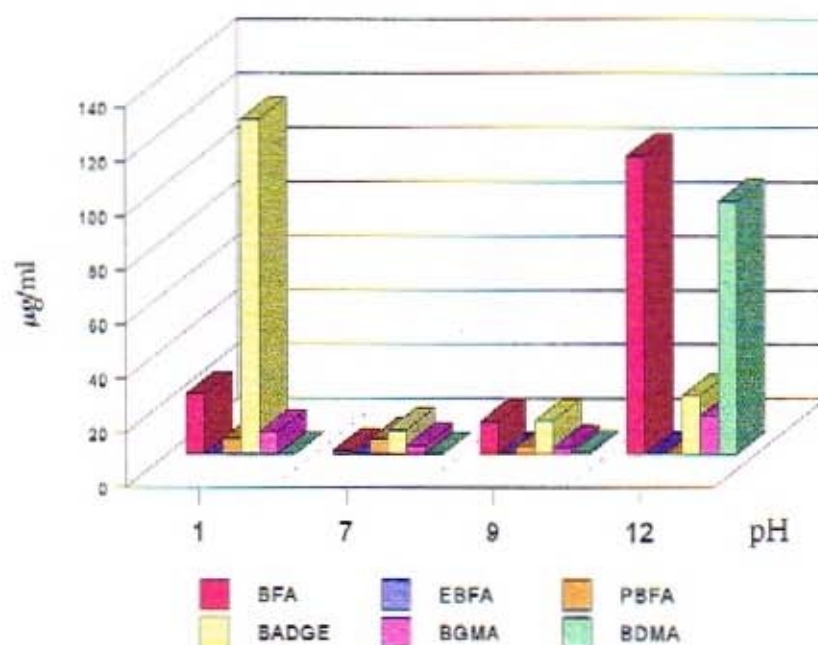


Figura 40: Diagrama de barras con la elución de monómeros de Pekalux en muestras sin polimerizar a 100 °C.

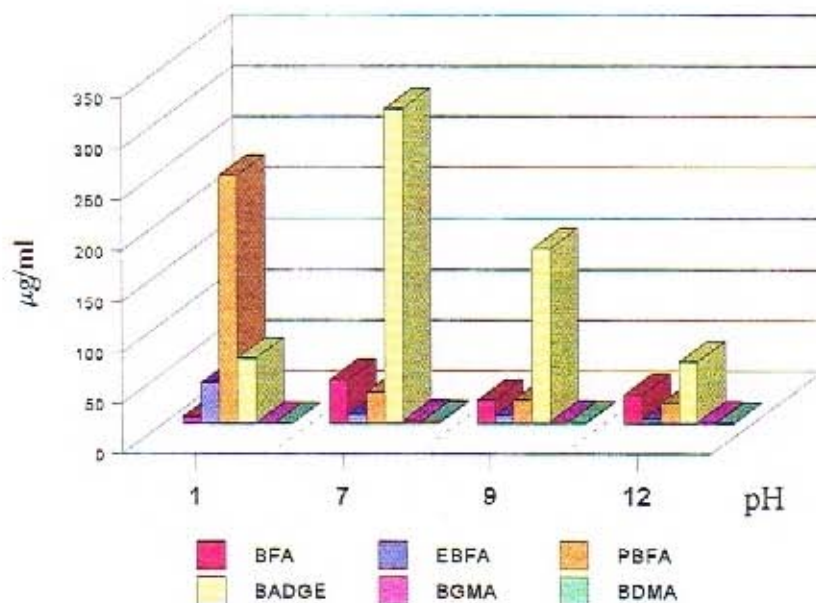


Figura 41: Diagrama de barras con la elución de monómeros de Delton en muestras polimerizadas a 37 °C.

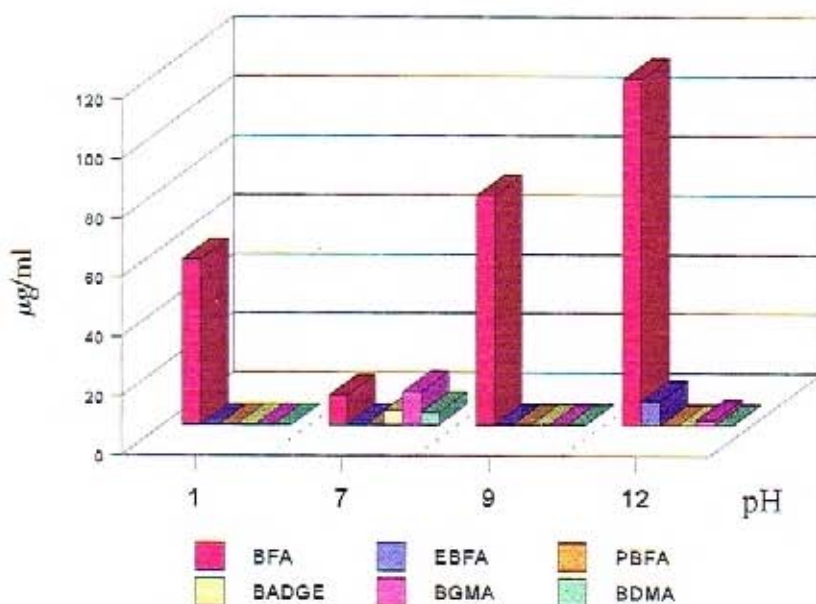


Figura 42: Diagrama de barras con la elución de monómeros de Delton en muestras polimerizadas a 100 °C.

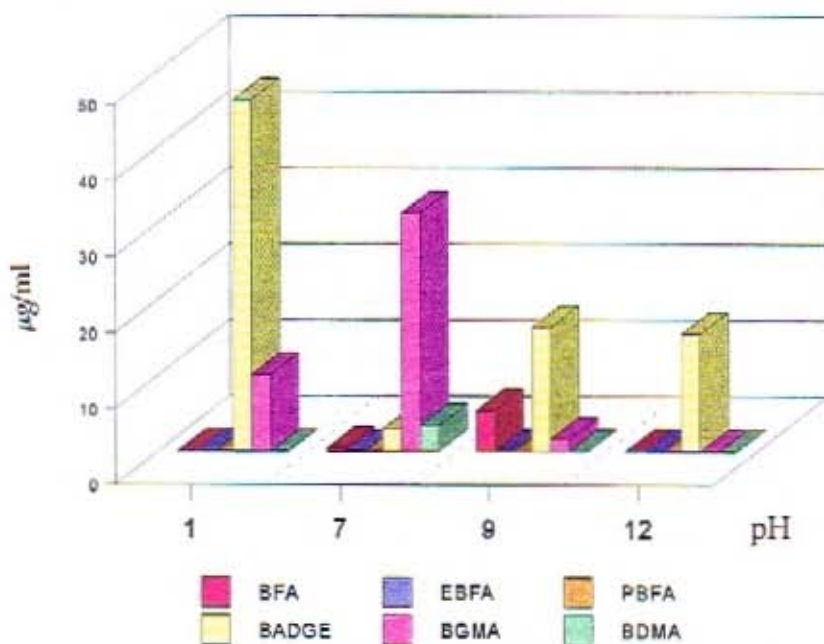


Figura 43: Diagrama de barras con la elución de monómeros de Delton en muestras sin polimerizar a 37 °C.

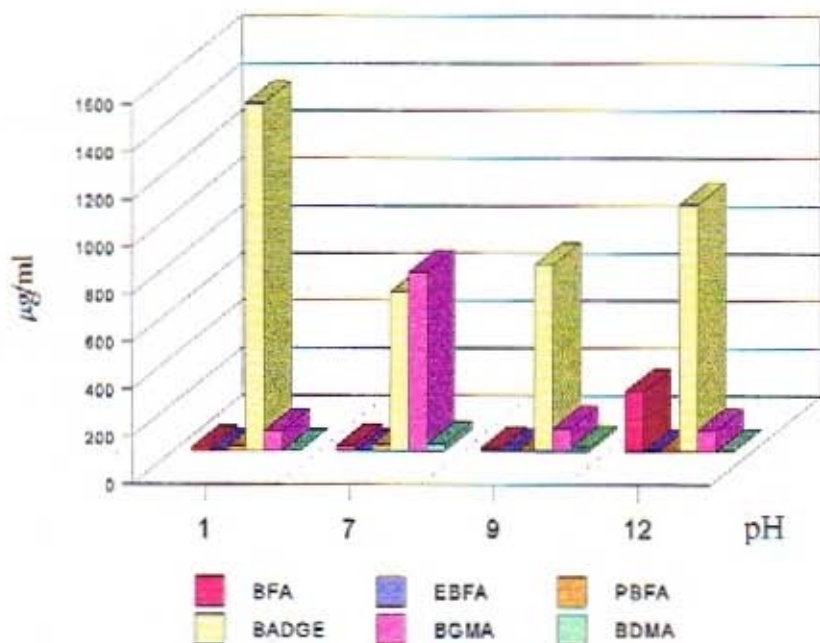


Figura 44: Diagrama de barras con la elución de monómeros de Delton en muestras sin polimerizar a 100 °C.

Análisis cualitativo mediante CG-EM

La confirmación de los datos presentados en las tablas XXVII-XLII referentes a la identificación de los monómeros eluidos al medio acuoso desde las muestras de composite, se ha realizado mediante Espectrometría de Masas. La tabla XLIII corresponde a los resultados obtenidos mediante esta técnica en relación con la presencia de monómeros en las distintas marcas comerciales, en muestras sin polimerizar y a pH 7.

Las figuras 45-47 ilustran, a modo de ejemplo, los resultados de la aplicación de la técnica a este tipo de muestras. La 45.a, 46.a y la 47.a corresponden a los cromatogramas en CG con los monómeros identificados del composite Charisma, Pekalux y el sellador Delton, respectivamente. Las figuras 45.b, 46.b y 47.b contienen los Espectros de Masas de mayor interés de los cromatogramas anteriormente citados. No se muestran la totalidad de los espectros para evitar la reiteración de la información.

Tabla XLIII: Detección de monómeros por espectrometría de masas.

	BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
BRILLANT	+	-	-	+	+	-
CHARISMA	+	-	-	-	+	-
PEKALUX	+	+	+	+	+	-
POLOFIL	+	-	-	+	+	-
SILUX	+	+	-	+	+	-
TETRIC	+	-	-	+	+	-
Z-100	+	-	-	+	+	-
DELTON	+	-	-	+	+	+

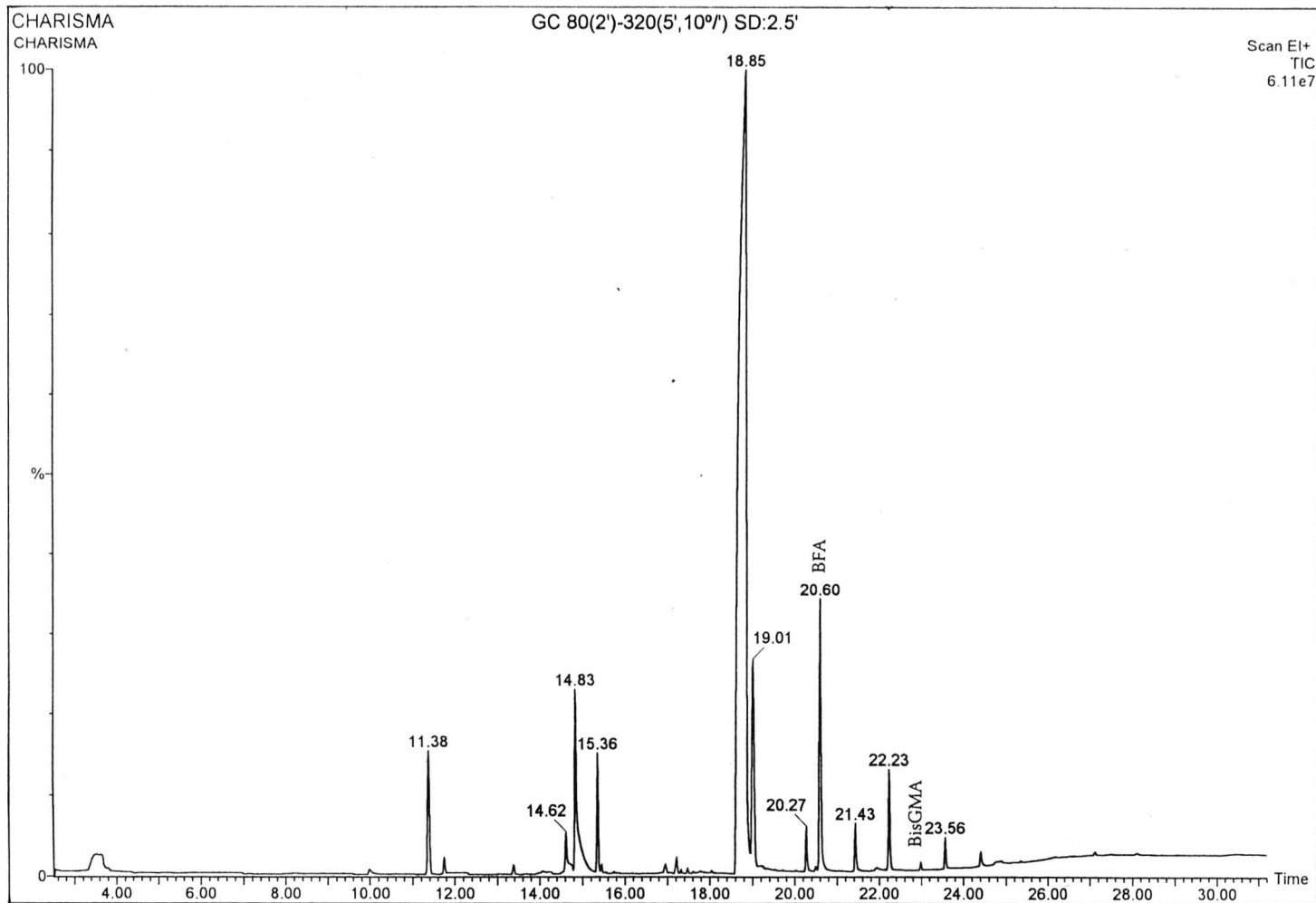


Figura 45.a: Cromatograma del composite Charisma con los monómeros identificados

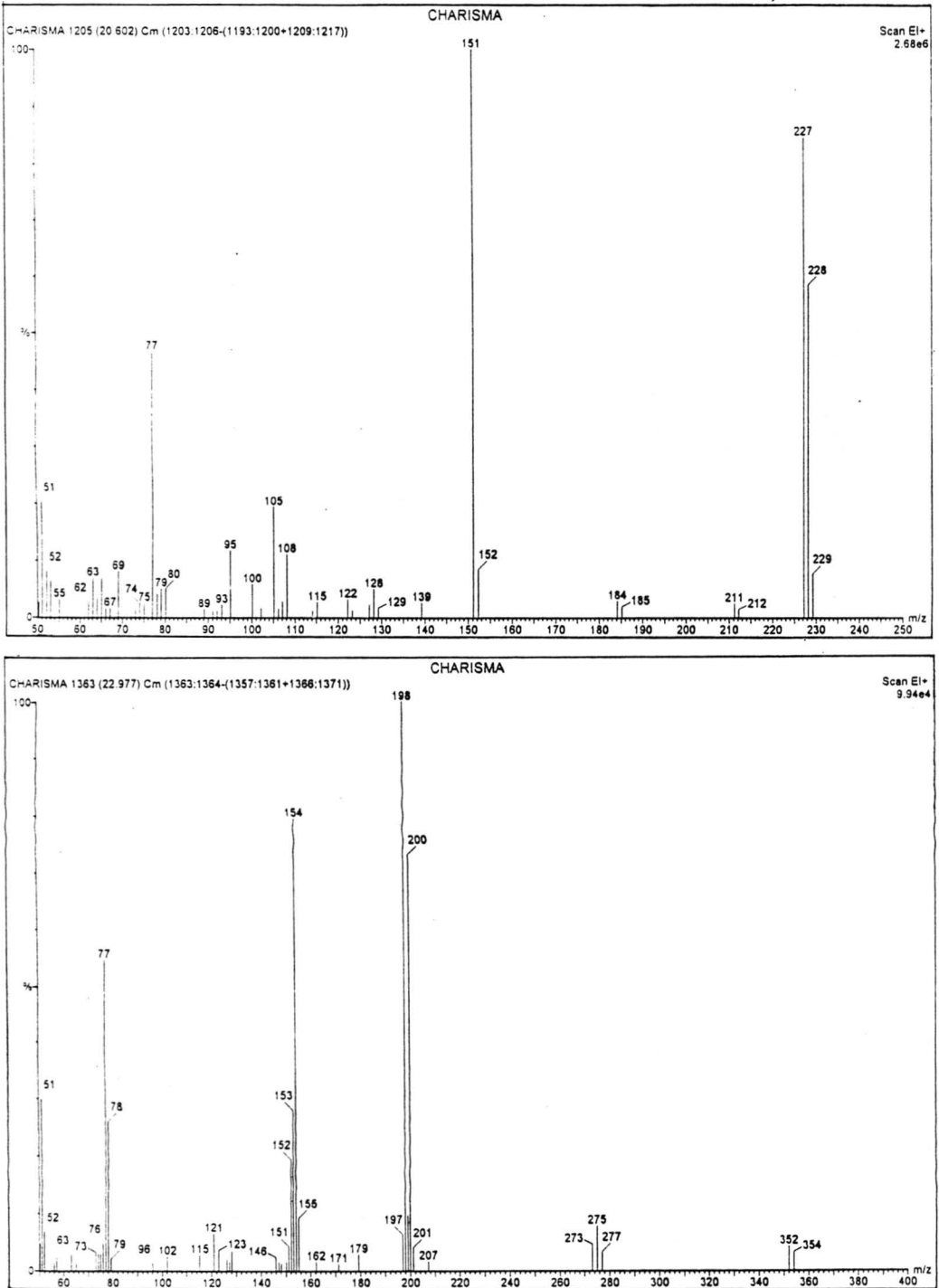


Figura 45.b: Espectros de masas del BFA y BisGMA correspondientes al cromatograma de la figura 45.a.

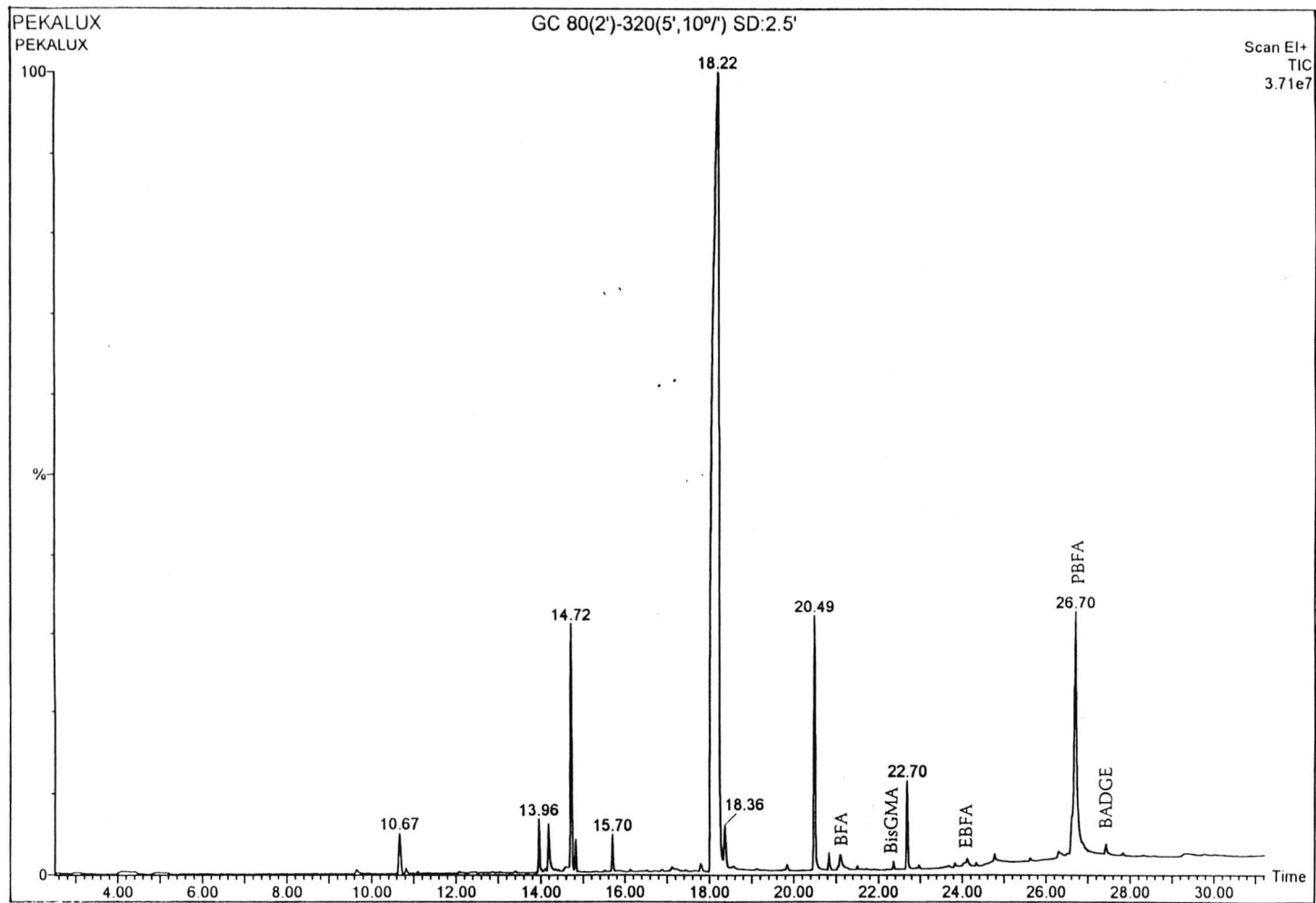


Figura 46.a: Cromatograma del composite Pekalux con los monómeros identificados

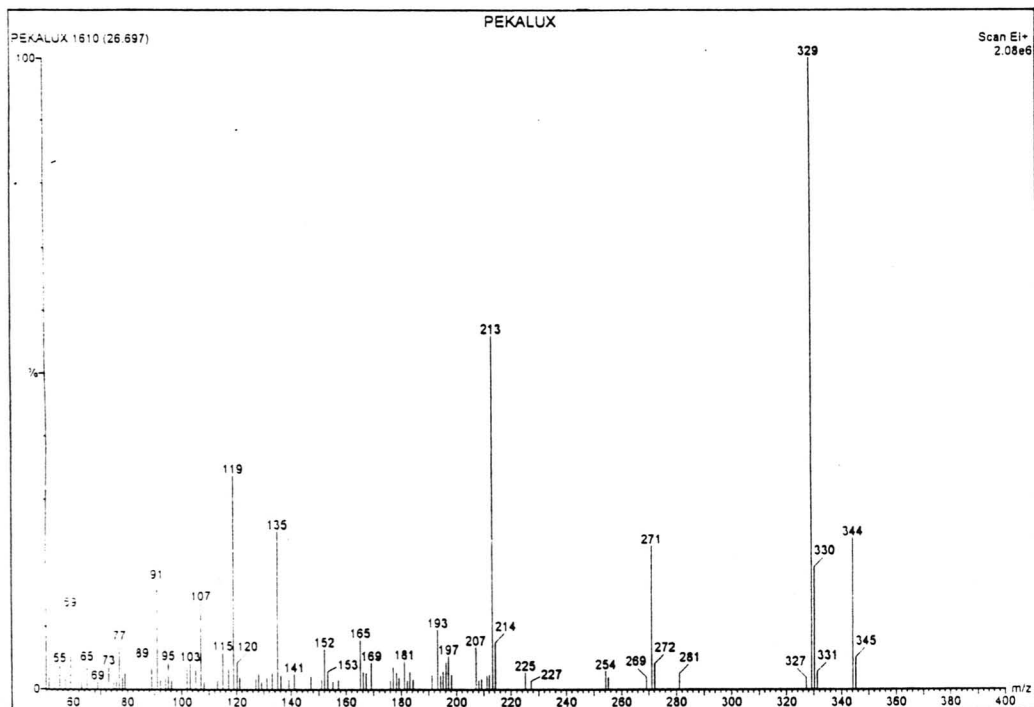
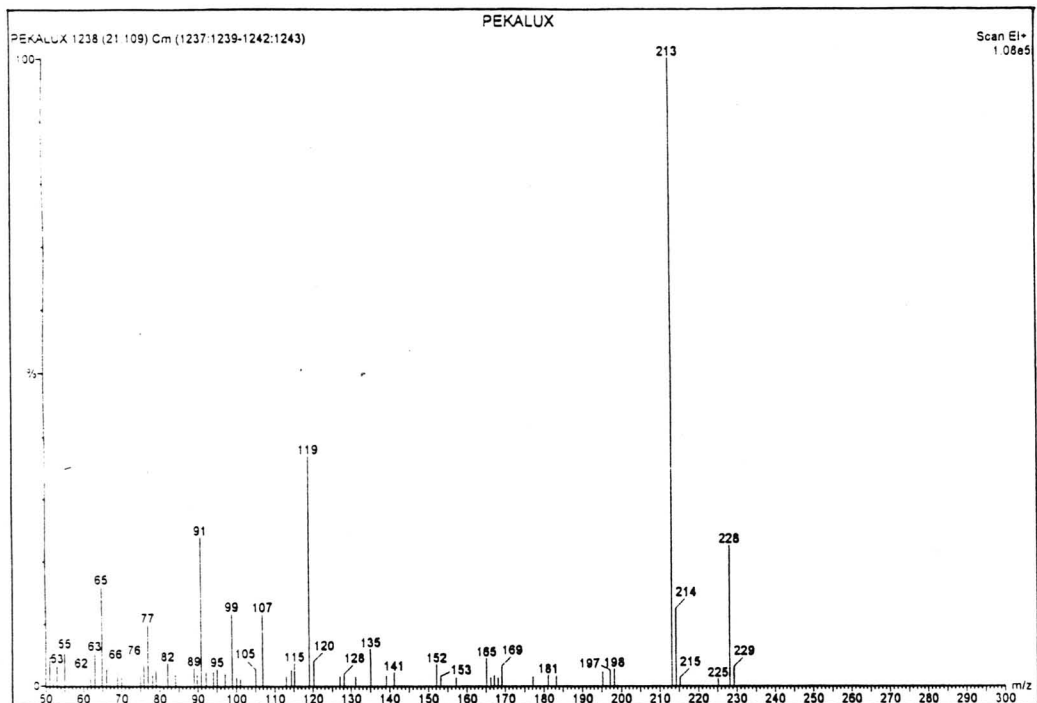


Figura 46.b: Espectros de masas del BFA y PBFA correspondientes al cromatograma de la figura 46.a.

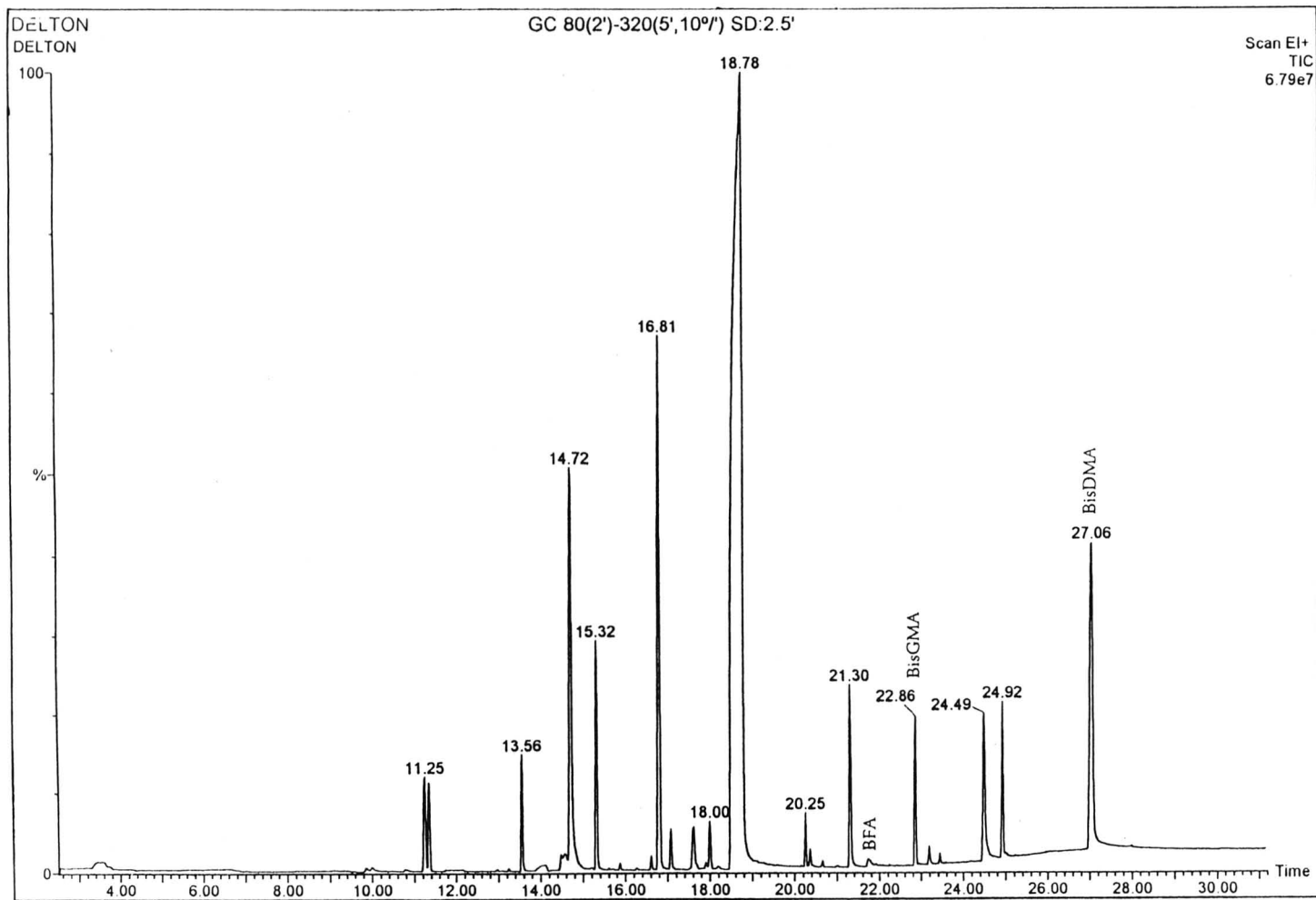


Figura 47.a: Cromatograma del sellador Delton con los monómeros identificados

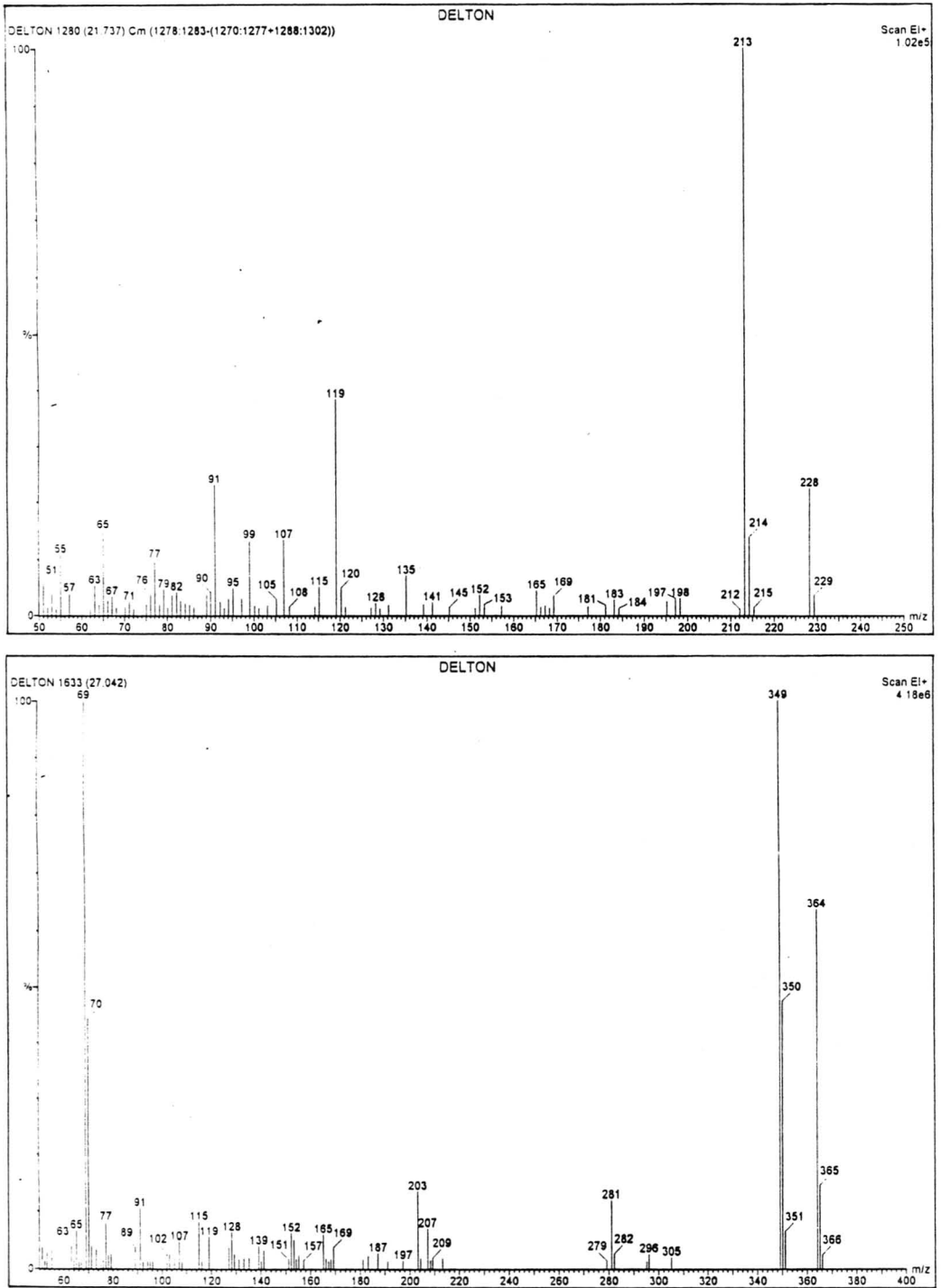


Figura 47.b: Espectros de masas del BFA y BisDMA correspondientes al cromatograma de la figura 47.a.

2. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR CROMATOGRAFIA

2.1. ANALISIS INICIAL

Las tablas XLIV a XLVII muestran la frecuencia de aparición de cada monómero, en función a las condiciones fisico-químicas a que se han sometido las muestras de composites y selladores analizados. Así, se presenta el valor absoluto y el porcentaje de aparición de cada componente identificado con respecto al total de las 384 muestras analizadas, las cuales corresponden a un total de 192 procesadas sin polimerizar y un número idéntico polimerizadas.

Aunque el número total de productos comerciales estudiados fue de 8 (siete composites y un sellador), la variedad de condiciones experimentales multiplica el número final de cromatogramas obtenidos.

Tabla XLIV: Frecuencia de la presencia de monómeros en el total de las muestras analizadas según la polimerización (%).

	BFA		EBFA		PBFA		BADGE		BisGMA		BisDMA	
	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
POLIMERIZADAS	19 (9,9)	173 (90,1)	150 (78,1)	42 (21,9)	147 (76,6)	45 (23,4)	104 (54,2)	88 (45,8)	85 (44,3)	107 (55,7)	111 (57,8)	81 (42,2)
SIN POLIMERIZAR	13 (6,8)	179 (93,2)	169 (88,0)	23 (12,0)	153 (79,7)	39 (20,3)	43 (22,4)	149 (77,6)	105 (54,7)	87 (45,3)	132 (68,8)	60 (31,3)
TOTAL	32 (8,3)	352 (91,7)	319 (83,1)	65 (16,9)	300 (78,1)	84 (21,9)	147 (38,3)	237 (61,7)	190 (49,5)	194 (50,5)	243 (63,3)	141 (36,7)

Tabla XLV: Frecuencia de la presencia de monómeros en el total de las muestras analizadas según la temperatura (%).

	BFA		EBFA		PBFA		BADGE		BisGMA		BisDMA	
	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
37°	21 (10,9)	171 (89,1)	142 (74,0)	50 (26,0)	171 (89,1)	21 (10,9)	65 (33,9)	127 (66,1)	127 (66,1)	65 (33,9)	143 (74,5)	49 (25,5)
100°	11 (5,7)	181 (94,3)	177 (92,2)	15 (7,8)	129 (67,2)	63 (32,8)	82 (42,7)	110 (57,3)	63 (32,8)	129 (67,2)	100 (52,1)	92 (47,9)
TOTAL	32 (8,3)	352 (91,7)	319 (83,1)	65 (16,9)	300 (78,1)	84 (21,9)	147 (38,3)	237 (61,7)	190 (49,5)	194 (50,5)	243 (63,3)	141 (36,7)

Tabla XLVI: Frecuencia de la presencia de monómeros en el total de las muestras analizadas según el pH del medio (%).

pH	BFA		EBFA		PBFA		BADGE		BisGMA		BisDMA	
	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
1	13 (13,5)	83 (86,5)	79 (82,3)	17 (17,7)	75 (78,1)	21 (21,9)	51 (53,1)	45 (46,9)	54 (56,3)	42 (43,8)	75 (78,1)	21 (21,9)
7	12 (12,5)	84 (87,5)	78 (81,3)	18 (18,8)	72 (75,0)	24 (25,0)	30 (31,3)	66 (66,8)	52 (54,2)	44 (45,8)	67 (69,8)	29 (30,2)
9	4 (4,2)	92 (95,8)	84 (87,5)	12 (12,5)	78 (81,3)	18 (18,8)	33 (34,4)	63 (65,6)	42 (43,8)	54 (56,3)	52 (54,2)	44 (45,8)
12	3 (3,1)	93 (96,9)	78 (81,3)	18 (18,8)	75 (78,1)	21 (21,9)	33 (34,4)	63 (65,5)	42 (43,8)	54 (56,3)	49 (51,0)	47 (49,0)
TOTAL	32 (8,3)	352 (91,7)	319 (83,1)	65 (16,9)	300 (78,1)	84 (21,9)	147 (38,3)	237 (61,7)	190 (49,5)	194 (50,5)	243 (63,3)	141 (36,7)

Tabla XLVII: Frecuencia de la presencia de monómeros en el total de las muestras analizadas en cada marca de composite (%).

MARCA	BFA		EBFA		PBFA		BADGE		BisGMA		BisDMA	
	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
BRILLANT	13 (27,1)	35 (72,9)	48 (100)	-- --	48 (100)	-- --	27 (56,3)	21 (43,8)	33 (68,8)	15 (31,3)	33 (68,8)	15 (31,3)
CHARISMA	2 (4,2)	46 (95,8)	48 (100)	-- --	39 (81,3)	9 (18,8)	22 (45,8)	26 (54,2)	18 (37,5)	30 (62,5)	30 (62,5)	18 (37,5)
PEKALUX	-- --	48 (100)	37 (77,1)	11 (22,9)	18 (37,5)	30 (62,5)	5 (10,4)	43 (89,6)	12 (25,0)	36 (75,0)	25 (52,1)	23 (47,9)
POLOFIL	7 (14,6)	41 (85,4)	48 (100)	-- --	48 (100)	-- --	21 (43,8)	27 (56,3)	27 (56,3)	21 (43,8)	24 (50,0)	24 (50,0)
SILUX	-- --	48 (100)	27 (56,3)	21 (43,8)	48 (100)	-- --	24 (50,0)	24 (50,0)	39 (81,3)	9 (18,8)	40 (83,3)	8 (16,7)
TETRIC	3 (6,3)	45 (93,8)	30 (62,5)	18 (37,5)	48 (100)	-- --	15 (31,3)	33 (68,8)	25 (52,1)	23 (47,9)	32 (66,7)	16 (33,3)
Z-100	2 (4,2)	46 (95,8)	48 (100)	-- --	24 (50,0)	24 (50,0)	24 (50,0)	24 (50,0)	24 (50,0)	24 (50,0)	38 (79,2)	10 (20,8)
DELTON	5 (10,4)	43 (89,6)	33 (68,8)	15 (31,3)	27 (56,3)	21 (43,8)	9 (18,8)	39 (81,3)	12 (25,0)	36 (75,0)	21 (43,8)	27 (56,3)
TOTAL	32 (8,3)	352 (91,7)	319 (83,1)	65 (16,9)	300 (78,1)	84 (21,9)	147 (38,3)	237 (61,7)	190 (49,5)	194 (50,5)	243 (63,3)	141 (36,7)

2.2. ANALISIS DE LA VARIANZA

En el estudio estadístico de los composites en función a las variables analíticas consideradas se ha aplicado un test Anova y la comparación por parejas se realiza con el test Student Newmans Keuls, para $p < 0.05$.

La tabla XLVIII muestra los efectos principales así como los de segundo orden considerados en el análisis de la varianza al que se han sometido los datos del análisis cromatográfico de las muestras de composites y selladores.

Tabla XLVIII: Método del análisis de la varianza con las interacciones.

FUENTE	SC	gl.	MC	F	P
EFFECTOS PRINCIPALES	1731751,441	12	144312,620	20,142	0,000
Composite	613048,717	7	87578,388	12,224	0,000
Polimerización	141240,754	1	141240,754	19,713	0,000
Temperatura	491717,391	1	491717,391	68,630	0,000
pH	485744,580	3	161914,860	22,599	0,000
EFFECTOS DE 2º ORDEN	2028981,032	42	48309,072	6,743	0,000
Composite-Polimerización	600022,631	7	85717,519	11,964	0,000
Composite-Temperatura	682149,918	7	97449,988	13,601	0,000
Composite-pH	300535,367	21	14311,208	1,997	0,006
Polimerización-Temperatura	41631,258	1	41631,258	5,811	0,016
Polimerización-pH	25271,406	3	8423,802	1,176	0,319
Temperatura-pH	379370,453	3	126456,818	17,650	0,000
EXPLICADO	3760732,474	54	69643,194	9,720	0,000
RESIDUAL	2357202,075	329	7164,748		
TOTAL	6117934,549	383	15973,719		

Las tablas XLIX a LXVII corresponden a los resultados en las diferentes condiciones experimentales.

La tabla XLIX recoge las medias y las desviaciones estándar de la concentración de monómeros liberados por composite en las muestras polimerizadas. La comparación global se realiza mediante el análisis de la varianza con expresión del grado de significación en cada grupo, y la comparación por parejas se realiza con el test de Student Newman Keuls, para $p < 0.05$. Esta misma sistemática se aplicará en las tablas comentadas a continuación, es decir, en las tablas XLIX a LXVII.

La tabla L presenta el mismo contenido que la anterior pero en este caso los resultados se refieren a la concentración de cada componente en las muestras de composite sin polimerizar.

En la tabla LI se recogen los resultados, expresados en forma de media y desviación estándar, de la concentración de monómeros liberados en muestras polimerizadas de las distintas marcas comerciales estudiadas que fueron sometidas a 37 °C.

La tabla LII se refiere a la elución de monómeros desde muestras polimerizadas, pero esta vez sometidas a 100 °C.

La tabla LIII incluye los datos relativos a la concentración de monómeros liberados desde muestras sin polimerizar por los productos comerciales incubados a 37 °C. La tabla número LIV se refiere a estas mismas condiciones experimentales pero del grupo sometido a 100 °C.

Tabla XLIX: Influencia de la polimerización en la liberación de componentes en las marcas analizadas. Muestras polimerizadas.

	N	BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
BRILLANT (C ₁)	24	34,6±76,6	---	---	1,2±3,3	6,2±8,9	1,0±1,7
CHARISMA(C ₂)	24	17,1±17,8	---	14,2±28,1	24,6±55,2	15,6±35,8	2,1±2,9
PEKALUX (C ₃)	24	65,4±115,1	---	28,4±40,5	27,7±29,4	29,7±40,0	19,9±37,8
POLOFIL (C ₄)	24	49,7±119,2	---	---	1,6±2,6	7,9±13,2	4,7±6,4
SILUX (C ₅)	24	13,9±14,4	0,5±0,7	---	2,1±5,8	0,8±1,7	0,9±2,5
TETRIC (C ₆)	24	65,0±83,5	18,2±27,9	---	36,9±59,1	0,8±1,1	0,3±0,5
Z-100 (C ₇)	24	5,3±6,7	---	26,5±55,2	0,6±1,2	14,5±16,9	10,1±22,9
DELTON (C ₈)	24	44,9±35,9	8,5±12,6	39,5±79,6	72,2±106,1.	2,3±3,5	1,0±1,4
COMPARACION GLOBAL (a)		p<0,05	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
COMPARACION POR PAREJAS (b)		---	C _i <C ₆ (i=1,2,3,4,5,7,8)	C _i <C ₇ (i=6)	C _i <C ₈ (i=1,2,3,4,5,6,7)	C _i <C ₃ (i=1,2,4,5,6,7,8)	C _i <C ₃ (i=1,2,4,5,6,7,8)

(a): mediante análisis de la varianza. (b): mediante Student-Newman-Keuls (P<0,05).

Tabla L: Influencia de la polimerización en la liberación de componentes en las marcas analizadas. Muestras sin polimerizar.

	N	BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
BRILLANT (C ₁)	24	11,3±10,9	---	---	27,6±42,8	4,8±12,7	3,1±5,4
CHARISMA (C ₂)	24	109,3±65,6	---	---	6,7±10,7	60,3±107,1	0,4±0,7
PEKALUX (C ₃)	24	24,2±33,8	3,2±5,2	4,8±3,5	27,7±37,7	4,1±4,8	11,8±31,6
POLOFIL (C ₄)	24	9,5±11,7	---	---	35,6±81,3	5,0±8,6	0,6±1,1
SILUX (C ₅)	24	177,3±298,3	12,7±13,6	---	32,2±58,9	32,2±87,0	1,9±5,0
TETRIC (C ₆)	24	215,1±251,5	---	---	9,9±11,4	7,4±12,2	4,9±13,0
Z-100 (C ₇)	24	18,0±11,0	---	5,1±8,3	88,2±145,5	31,7±68,5	0,6±1,5
DELTON (C ₈)	24	38,2±83,0	---	7,3±10,6	505,2±542,8	127,7±244,4	6,4±10,9
COMPARACION GLOBAL (a)		p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,05
COMPARACION POR PAREJAS (b)		C _i <C ₅ (i=1,3,4,7,8)	C _i <C ₃ (i=8)	C _i <C ₃ (i=1,2,4,5,6)	C _i <C ₈ (i=1,2,3,4,5,6,7)	C _i <C ₈ (i=1,2,3,4,5,6,7)	C _i <C ₃ (i=4,7)
		C _i <C ₆ (i=1,2,3,4,7,8)	C _i <C ₅ (i=1,2,3,4,6,7,8)	C _i <C ₇ (i=1,2,4,5,6)			
				C _i <C ₈ (i=1,2,4,5,6)			

(a): mediante análisis de la varianza. (b): mediante Student-Newman-Keuls (P<0,05).

Tabla LI: Liberación de monómeros en muestras polimerizadas y mantenidas a 37 °C.

	N	BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
BRILLANT (C ₁)	12	3,0±5,0	---	---	2,5±4,5	5,7±10,3	---
CHARISMA (C ₂)	12	7,8±7,5	---	---	7,5±5,4	1,7±1,9	4,2±2,8
PEKALUX (C ₃)	12	5,0±7,8	---	---	14,5±22,6	3,5±3,9	36,1±49,0
POLOFIL (C ₄)	12	1,2±1,0	---	---	3,3±2,9	---	8,5±7,2
SILUX (C ₅)	12	8,2±6,2	1,0±0,6	---	4,3±7,7	---	---
TETRIC (C ₆)	12	40,0±46,2	4,6±4,8	---	31,1±45,0	0,9±0,8	0,1±0,2
Z-100 (C ₇)	12	2,8±3,9	---	---	1,2±1,5	1,3±2,3	20,3±29,6
DELTON (C ₈)	12	24,9±13,6	14,9±15,2	79,0±99,3	151,2±106,2	1,4±1,0	0,9±0,8
COMPARACION GLOBAL (a)		p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,05	p<0,001
COMPARACION POR PAREJAS (b)		C ₁ <C ₈ (i=1,3,4,5,7,) C ₁ <C ₆ (i=1,2, 3,4,5,7,8)	C ₁ <C ₈ (i=1,2,3,4,5,6,7)	C ₁ <C ₈ (i=1,2,3,4,5,6,7)	C ₁ <C ₈ (i=1,2,3,4,5,6,7)	C ₁ <C ₁ (i=2,4,5,)	C ₁ <C ₃ (i=1,2,4,5,6,8,)

(a): mediante análisis de la varianza. (b): mediante Student-Newman-Keuls. (P<0,05)

Tabla III: Liberación de monómeros en muestras polimerizadas y mantenidas a 100 °C.

	N	BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
BRILLANT (C ₁)	12	66,3±100,3	---	---	---	6,6±7,8	1,9±2,1
CHARISMA (C ₂)	12	26,5±20,3	---	28,4±34,8	41,6±75,6	29,5±47,4	0,1±0,2
PEKALUX (C ₃)	12	125,7±140,4	---	56,7±41,0	40,9±30,3	55,8±42,8	3,7±4,6
POLOFIL (C ₄)	12	98,2±156,0	---	---	---	15,8±15,2	1,0±1,2
SILUX (C ₅)	12	19,5±18,0	---	---	---	1,6±2,1	1,8±3,3
TETRIC (C ₆)	12	90,1±105,3	31,8±34,6	---	42,6±72,1	0,8±1,4	0,4±0,7
Z-100 (C ₇)	12	7,8±8,0	---	53,1±69,6	---	27,7±14,5	---
DELTON (C ₈)	12	64,9±40,5	2,0±3,7	---	1,2±2,2	3,2±4,8	1,1±1,9
COMPARACION GLOBAL (a)		p<0,05	p<0,001	p<0,001	p<0,005	p<0,001	p<0,005
COMPARACION POR PAREJAS (b)		C ₁ <C ₃ (i=7)	C ₁ <C ₆ (i=1,2,3,4,5,7,8)	C ₁ <C ₂ (i=8) C ₁ <C ₇ (i=1,4,5,6,8) C ₁ <C ₃ (i=1,4,5,6,8)	C ₁ <C ₃ (i=7,8) C ₁ <C ₂ (i=7,8) C ₁ <C ₆ (i=8)	C ₁ <C ₃ (i=1,2,4,5,6,7,8)	C ₁ <C ₃ (i=2,4,6,7,8)

(a): mediante análisis de la varianza. (b): mediante Student-Newman-Keuls. (P<0,05)

Tabla LIII: Liberación de monómeros en muestras sin polimerizar a 37 °C.

	N	BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
BRILLANT (C ₁)	12	2,7±4,0	---	---	4,9±6,4	9,4±17,0	---
CHARISMA (C ₂)	12	164,7±17,3	---	---	---	---	---
PEKALUX (C ₃)	12	12,1±4,9	6,3±5,9	6,1±4,0	13,9±8,2	1,2±2,2	---
POLOFIL (C ₄)	12	0,1±0,1	---	---	1,9±2,4	0,4±0,7	0,8±1,5
SILUX (C ₅)	12	24,4±15,2	25,4±6,1	---	13,7±9,8	---	---
TETRIC (C ₆)	12	1,3±1,1	---	---	10,3±6,3	---	---
Z-100 (C ₇)	12	96,6±6,6	---	---	32,6±34,5	63,4±87,2	---
DELTON (C ₈)	12	1,5±2,4	---	---	20,2±16,7	10,7±13,0	0,8±1,5
COMPARACION GLOBAL (a)		p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,01
COMPARACION POR PAREJAS (b)		C ₁ <C ₃ (i=1,4,6,8) C ₁ <C ₅ (i=1,3,4,6,8) C ₁ <C ₇ (i=1,3,4,6,8) C ₁ <C ₂ (i=1,3,4,6,7,8)	C ₁ <C ₃ (i=1,2,4,6,7,8) C ₁ <C ₅ (i=1,2,3,4,6,7,8)	C ₁ <C ₃ (i=1,2,4,5,6,7,8)	C ₁ <C ₈ (i=2,4) C ₁ <C ₇ (i=1,2,3,4,5,6,8)	C ₁ <C ₇ (i=1,2,3,4,5,6,8)	C ₁ <C ₄ (i=5,6,7) C ₁ <C ₈ (i=6,7)

(a): mediante análisis de la varianza. (b): mediante Student-Newman-Keuls. (P<0,05)

Tabla LIV: Liberación de monómeros en muestras sin polimerizar a 100 °C.

	N	BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
BRILLANT (C ₁)	12	19,8±8,6	---	---	50,2±51,7	0,2±0,4	6,3±6,4
CHARISMA (C ₂)	12	53,8±44,6	---	---	13,4±11,9	120,7±126,6	0,7±0,9
PEKALUX (C ₃)	12	36,3±45,2	---	3,4±2,4	41,6±49,9	6,9±5,0	23,5±42,2
POLOFIL (C ₄)	12	18,9±9,7	---	---	69,3±106,4	9,7±10,2	0,5±0,6
SILUX (C ₅)	12	330,2±367,2	---	---	50,8±80,1	64,3±116,4	3,7±6,7
TETRIC (C ₆)	12	428,9±180,2	---	---	9,4±15,3	14,8±13,9	9,8±17,3
Z-100 (C ₇)	12	9,4±6,6	---	10,2±9,3	143,8±190,6	---	1,2±2,1
DELTON (C ₈)	12	75,0±107,0	---	14,6±11,0	990,2±320,4	242,6±308,8	11,9±13,4
COMPARACION GLOBAL (a)		p<0,001	---	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,05
COMPARACION POR PAREJAS (b)		C _i <C ₅ (i=1,2,3,4,7,8)		C _i <C ₇ (i=1,2,3,4,5,6)	C _i <C ₈ (i=1,2,3,4,5,6,7)	C _i <C ₈ (i=1,2,3,4,5,6,7)	C _i <C ₃ (i=2,4,5,7)
		C _i <C ₆ (i=1,2,3,4,7,8)		C _i <C ₈ (i=1,2,3,4,5,6,7)			

(a): mediante análisis de la varianza. (b): mediante Student-Newman-Keuls. (P<0,05)

La serie de tablas LV a LVIII se refiere a la elución de monómeros desde muestras polimerizadas de los distintos productos comerciales valorando sucesivamente el pH al que fueron sometidas: pH 1, tabla LV; pH 7, tabla LVI; pH 9, tabla LVII; y finalmente, pH 12, tabla LVIII. Como en el resto de las tablas de este apartado el test de comparación global aplicado es el análisis de la varianza, con el grado de significación de cada grupo expresado a través del valor de "p", mientras que la comparación por parejas se realizó mediante el Student Newman Keuls para $p < 0.05$.

Tabla LV: Liberación de monómeros en muestras polimerizadas sometidas a pH=1.

	N	BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
BRILLANT (C ₁)	6	---	---	---	---	---	---
CHARISMA (C ₂)	6	17,3±16,0	---	15,3±16,9	1,8±2,0	3,4±1,0	1,9±2,1
PEKALUX (C ₃)	6	24,3±25,9	---	53,6±59,0	70,9±21,8	52,4±46,8	2,1±0,8
POLOFIL (C ₄)	6	0,4±0,4	---	---	---	10,4±11,4	2,1±2,3
SILUX (C ₅)	6	1,3±0,7	0,8±0,9	---	---	---	---
TETRIC (C ₆)	6	20,6±12,1	8,8±0,5	---	4,9±5,4	2,5±0,7	---
Z-100 (C ₇)	6	2,7±2,7	---	83,1±91,2	1,7±1,9	24,4±26,8	---
DELTON (C ₈)	6	31,2±18,2	19,9±21,9	121,5±133,6	31,8±35,0	---	---
COMPARACION GLOBAL (a)		p<0,005	p<0,001	p<0,005	p<0,001	p<0,001	p<0,001
COMPARACION POR PAREJAS (b)		C _i <C ₈ (i=1,4,5,7)	C _i <C ₈ (i=1,2,3,4,5,6,7)	C _i <C ₈ (i=1,2,4,5,6)	C _i <C ₈ (i=1,2,4,5,6,7) C _i <C ₃ (i=1,2,4,5,6,7,8)	C _i <C ₃ (i=1,2,4,5,6,7,8)	C _i <C ₂ (i=5,6,7,8) C _i <C ₃ (i=1,5,6,7,8) C _i <C ₄ (i=1,5,6,7,8)

(a): mediante análisis de la varianza. (b): mediante Student-Newman-Keuls. (P<0,05)

Tabla LVI: Liberación de monómeros en muestras polimerizadas sometidas a pH=7.

	N	BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
BRILLANT (C ₁)	6	---	---	---	---	---	---
CHARISMA (C ₂)	6	4,5±3,4	---	40,9±45,0	84,6±90,3	55,3±57,9	3,1±3,1
PEKALUX (C ₃)	6	12,5±13,0	---	41,0±45,1	16,6±16,8	49,1±53,9	1,1±1,2
POLOFIL (C ₄)	6	5,7±5,4	---	---	3,9±4,3	0,9±1,0	---
SILUX (C ₅)	6	13,4±3,7	0,5±0,6	---	---	2,5±2,7	---
TETRIC (C ₆)	6	24,6±12,9	11,7±2,3	---	6,4±3,5	0,2±0,4	---
Z-100 (C ₇)	6	1,7±1,6	---	3,4±3,8	---	9,8±5,1	---
DELTON (C ₈)	6	26,4±18,1	4,2±4,6	15,4±16,9	156,9±166,8	6,8±4,7	3,0±1,4
COMPARACION GLOBAL (a)		p<0,001	p<0,001	p<0,005	p<0,005	p<0,005	p<0,001
COMPARACION POR PAREJAS (b)		C _i <C ₆ (i=1,2,4,5,7)	C _i <C ₆ (i=1,2,3,4,5,7,8)	C _i <C ₂ (i=4,5,6,7)	C _i <C ₈ (i=1,3,4,5,6,7)	C _i <C ₂ (i=1,4,5,6,7,8)	C _i <C ₂ (i=1,3,4,5,6,7)
		C _i <C ₈ (i=1,2,4,7)	C _i <C ₈ (i=1,2,3,4,5,7)	C _i <C ₃ (i=5,6,7)		C _i <C ₃ (i=3,4,6,7,8)	C _i <C ₈ (i=1,3,4,5,6,7)

(a): mediante análisis de la varianza. (b): mediante Student-Newman-Keuls. (P<0,05)

Tabla LVII: Liberación de monómeros en muestras polimerizadas sometidas a pH=9.

	N	BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
BRILLANT (C ₁)	6	17,5±18,4	---	---	---	9,0±9,9	1,9±2,0
CHARISMA (C ₂)	6	9,5±6,6	---	---	7,9±8,7	1,2±1,4	3,5±3,8
PEKALUX (C ₃)	6	38,3±41,2	---	9,1±10,2	10,8±11,9	7,3±5,6	13,3±14,6
POLOFIL (C ₄)	6	13,8±12,2	---	---	1,3±1,4	18,7±20,5	9,4±9,2
SILUX (C ₅)	6	12,1±7,4	---	---	8,5±9,4	0,8±0,8	---
TETRIC (C ₆)	6	24,7±4,0	44,5±48,8	---	133,5±32,8	0,7±0,8	0,9±0,7
Z-100 (C ₇)	6	1,8±0,4	---	17,9±19,7	0,7±0,8	15,5±17,0	6,4±7,0
DELTON (C ₈)	6	50,0±30,2	3,7±4,1	11,2±12,3	85,7±94,1	0,9±1,0	0,7±0,7
COMPARACION GLOBAL (a)		p<0,005	p<0,005	p<0,005	p<0,001	p<0,05	p<0,05
COMPARACION POR PAREJAS (b)		C _i <C ₃ (i=7) C _i <C ₈ (i=1,2,4,5,7)	C _i <C ₆ (i=1,2,3,4,5,7,8)	C _i <C ₇ (i=1,2,4,5,6)	C _i <C ₆ (i=1,2,3,4,5,7,8) C _i <C ₈ (i=1,2,3,4,5,7)	C _i <C ₄ (i=2,8)	C _i <C ₃ (i=1,5,6,8)

(a): mediante análisis de la varianza. (b): mediante Student-Newman-Keuls. (P<0,05)

Tabla LVIII: Liberación de monómeros en muestras polimerizadas sometidas a pH=12.

	N	BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
BRILLANT (C ₁)	6	121,1±120,3	---	---	4,9±5,4	15,6±7,9	2,1±2,3
CHARISMA (C ₂)	6	37,3±19,7	---	0,5±0,6	4,1±4,5	2,5±2,7	---
PEKALUX (C ₃)	6	186,4±185,9	---	9,8±10,8	12,5±8,4	9,9±8,6	63,1±57,3
POLOFIL (C ₄)	6	178,9±195,8	---	---	1,5±1,6	1,6±1,8	7,5±5,1
SILUX (C ₅)	6	28,9±20,4	0,6±0,7	---	---	---	3,6±4,0
TETRIC (C ₆)	6	190,2±81,8	7,6±8,4	---	2,7±3,0	---	0,1±0,2
Z-100 (C ₇)	6	15,1±6,4	---	1,6±1,8	---	8,3±9,1	34,2±37,6
DELTON (C ₈)	6	72,3±48,8	6,1±2,2	9,9±11	30,4±33,4	1,4±0,4	0,3±0,2
COMPARACION GLOBAL (a)		p<0,05	p<0,001	p<0,005	p<0,005	p<0,001	p<0,001
COMPARACION POR PAREJAS (b)		---	C _i <C ₆ (i=1,2,3,4,5,7)	C _i <C ₃ (i=2,4,5,6,7)	C _i <C ₈ (i=1,2,3,4,5,6,7)	C _i <C ₁ (i=2,4,5,6,8) C _i <C ₃ (i=4,5,6)	C _i <C ₃ (i=1,2,4,5,6,7,8)

(a): mediante análisis de la varianza. (b): mediante Student-Newman-Keuls. (P<0,05)

Las tablas LIX a LXII recogen las diferentes medias y desviaciones encontradas para la concentración de monómeros eluidos desde las muestras de los distintos productos comerciales, que no habían sido sometidas a polimerización, para cada uno de los "pHs" considerados: pH 1, tabla LIX; pH 7, tabla LX; pH 9, tabla LXI; y pH 12, tabla LXII.

Tabla LIX: Liberación de monómeros en muestras sin polimerizar sometidas a pH=1.

	N	BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
BRILLANT (C ₁)	6	9,5±10,1	---	---	---	---	---
CHARISMA (C ₂)	6	114,3±72,6	---	---	14,1±15,6	14,8±16,3	0,4±0,5
PEKALUX (C ₃)	6	14,0±9,0	0,8±1,2	2,8±3,1	70,0±59,0	4,0±4,4	---
POLOFIL (C ₄)	6	6,9±7,5	---	---	122,6±134,8	---	---
SILUX (C ₅)	6	48,4±37,0	15,2±16,6	---	17,0±15,5	---	0,1±0,1
TETRIC (C ₆)	6	147,4±159,8	---	---	---	0,5±0,6	0,1±0,2
Z-100 (C ₇)	6	13,8±8,5	---	12,6±13,9	229,3±251,7	102,4±112,3	---
DELTON (C ₈)	6	7,6±8,4	---	9,4±10,3	755,3±777,7	46,8±40,3	0,2±0,3
COMPARACION GLOBAL (a)		p<0,001	p<0,001	p<0,005	p<0,001	p<0,005	p<0,05
COMPARACION POR PAREJAS (b)		C ₁ <C ₂ (i=3,7) C ₁ <C ₆ (i=1,3,4,5,7,8)	C ₁ <C ₅ (i=1,2,3,4,6,7,8)	C ₁ <C ₇ (i=1,2,3,4,5,6) C ₁ <C ₈ (i=6)	C ₁ <C ₈ (i=1,2,3,4,5,6,7)	C ₁ <C ₇ (i=1,2,3,4,5,6,8)	C ₁ <C ₂ (i=3,4,7)

(a): mediante análisis de la varianza. (b): mediante Student-Newman-Keuls. (P<0,05)

Tabla LX: Liberación de monómeros en muestras sin polimerizar sometidas a pH=7.

	N	BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
BRILLANT (C ₁)	6	5,5±5,8	---	---	4,4±3,2	---	0,5±0,5
CHARISMA (C ₂)	6	96,2±72,1	---	---	0,8±1,3	1,8±2,0	---
PEKALUX (C ₃)	6	7,3±6,6	2,3±2,5	7,9±2,8	16,5±8,4	1,5±1,7	---
POLOFIL (C ₄)	6	6,0±6,5	---	---	7,1±1,9	---	0,2±0,3
SILUX (C ₅)	6	19,8±3,4	9,5±10,4	---	4,0±4,4	---	---
TETRIC (C ₆)	6	190,0±208,5	---	---	24,0±11,8	18,3±20,1	0,1±0,2
Z-100 (C ₇)	6	15,0±10,5	---	3,9±4,3	45,4±21,7	---	---
DELTON (C ₈)	6	11,4±12,0	---	14,3±15,7	336,9±366,4	392,5±395,9	17,4±15,4
COMPARACION GLOBAL (a)		p<0,005	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
COMPARACION POR PAREJAS (b)		C _i <C ₆ (i=1,2,3,4,5,7,8)	C _i <C ₅ (i=1,2,3,4,6,7,8)	C _i <C ₈ (i=1,2,4,5,6,7)	C _i <C ₈ (i=1,2,3,4,5,6,7)	C _i <C ₈ (i=1,2,3,4,5,6,7)	C _i <C ₈ (i=1,2,3,4,5,6,7)

(a): mediante análisis de la varianza. (b): mediante Student-Newman-Keuls. (P<0,05)

Tabla LXI: Liberación de monómeros en muestras sin polimerizar sometidas a pH=9.

	N	BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
BRILLANT (C ₁)	6	8,9±8,7	---	---	38,5±39,4	0,4±0,5	4,7±5,2
CHARISMA (C ₂)	6	91,8±84,2	---	---	10,2±11,2	155,6±170,8	1,0±1,1
PEKALUX (C ₃)	6	15,2±3,7	7,9±8,7	4,6±2,1	7,4±5,3	3,6±1,4	0,3±0,5
POLOFIL (C ₄)	6	7,7±8,4	---	---	5,2±5,7	8,7±9,6	0,7±0,8
SILUX (C ₅)	6	177,9±141,6	10,2±11,1	---	15,0±2,1	---	---
TETRIC (C ₆)	6	360,9±395,0	---	---	7,0±7,7	6,3±6,9	0,2±0,2
Z-100 (C ₇)	6	21,4±17,2	---	2,2±2,4	54,2±19,1	2,3±2,5	0,1±0,1
DELTON (C ₈)	6	7,9±2,8	---	---	400,8±421,7	24,4±25,1	7,6±8,4
COMPARACION GLOBAL (a)		p<0,005	p<0,005	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,005
COMPARACION POR PAREJAS (b)		C ₁ <C ₆ (i=1,2,3,4,5,7,8)	C ₁ <C ₃ (i=6,7,8) C ₁ <C ₅ (i=1,2,4,6,7,8)	C ₁ <C ₃ (i=1,2,4,5,6,7,8) C ₁ <C ₇ (i=1,2,4,5,6,8)	C ₁ <C ₈ (i=1,2,3,4,5,6,7)	C ₁ <C ₂ (i=1,3,4,5,6,7,8)	C ₁ <C ₈ (i=2,3,4,5,6,7)

(a): mediante análisis de la varianza. (b): mediante Student-Newman-Keuls. (P<0,05)

Tabla LXII: Liberación de monómeros en muestras sin polimerizar sometidas a pH=12.

	N	BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
BRILLANT (C ₁)	6	21,2±13,1	---	---	67,4±57,2	18,8±20,6	7,3±8,0
CHARISMA (C ₂)	6	138,4±21,9	---	---	1,7±1,8	69,0±75,8	---
PEKALUX (C ₃)	6	60,4±54,6	1,6±1,8	3,7±4,2	16,9±5,3	7,1±7,8	46,7±51,3
POLOFIL (C ₄)	6	17,4±19,0	---	---	7,4±5,9	11,4±10,8	1,6±1,7
SILUX (C ₅)	6	462,9±490,2	15,9±17,4	---	93,0±98,9	128,6±140,1	7,4±8,1
TETRIC (C ₆)	6	162,1±175,4	---	---	8,6±6,0	4,4±4,8	19,3±21,2
Z-100 (C ₇)	6	21,8±2,1	---	1,6±1,8	24,0±26,5	22,2±24,4	2,3±2,5
DELTON (C ₈)	6	126,3±138,3	---	5,5±6,1	527,9±561,9	43,1±47,3	0,2±0,3
COMPARACION GLOBAL (a)		p<0,005	p<0,001	p<0,005	p<0,001	p<0,05	p<0,005
COMPARACION POR PAREJAS (b)		C _i <C ₅ (i=1,2,3,4,6,7,8)	C _i <C ₅ (i=1,2,3,4,7,8)	C _i <C ₃ (i=6) C _i <C ₈ (i=1,2,4,5,6,7)	C _i <C ₈ (i=1,2,3,4,5,6,7)	C _i <C ₅ (i=1,3,4,6,7,8)	C _i <C ₃ (i=1,2,4,5,6,7,8)

(a): mediante análisis de la varianza. (b): mediante Student-Newman-Keuls. (P<0,05)

La tabla LXIII recoge de forma resumida las medias de concentración de los grupos experimentales "polimerizado" y "sin polimerizar" sometidos a 37 y 100 °C.

Tabla LXIII: Comparación de componentes polimerizados y sin polimerizar a 37 °C y 100 °C.

Temperatura		N	BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
37 °C	Polimerizados	96	11,6±21,4	2,6±73,0	9,8±42,8	26,9±62,7	1,8±4,3	8,7±23,2
	Sin Polimerizar	96	29,2±	3,9±8,8	0,7±2,4	12,2±17,3	10,6±36,7	0,2±0,8
	COMPARACION GLOBAL (a)		p<0,005	p=0,2337	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,001
100 °C	Polimerizados	96	62,3±96,9	4,2±15,8	17,3±38,2	15,8±42,2	17,6±29,3	1,3±2,5
	Sin Polimerizar	96	121,6±221,2	---	3,5±7,3	171,1±342,3	57,4±145,0	7,2±18,1
	COMPARACION GLOBAL (a)		p<0,05	p<0,01	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,005

(a): mediante análisis de la varianza.

Las tablas LXIV y LXV muestran las medias y desviaciones estándar de las concentraciones de monómeros eluidos desde muestras polimerizadas y sometidas a 37 y 100 °C, respectivamente según el pH al que se hubiera expuesto la muestra.

Finalmente, las tablas LXVI y LXVII contienen los resultados equivalentes a las dos tablas anteriores, pero en este caso referidas a las muestras sin polimerizar.

Tabla LXIV: Liberación de monómeros en muestras polimerizadas a 37 °C, según el pH.

pH	N	BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
1	24	2,7±3,4	6,3±13,3	30,4±82,3	16,6±24,7	2,0±3,3	1,4±1,8
7	24	9,4±14,3	2,4±3,9	3,8±10,4	41,3±103,5	1,3±1,8	1,0±2,0
9	24	7,8±8,6	0,9±2,5	2,8±7,6	39,2±61,3	0,7±0,9	8,2±9,6
12	24	26,6±35,5	0,6±1,4	2,5±6,7	10,8±19,7	3,3±7,6	24,5±41,7
COMPARACION GLOBAL (a)		p<0,001	p<0,05	p<0,06	p=0,2202	p=0,1912	p<0,001
COMPARACION POR PAREJAS (b)		i<12 (i=1,7,9)	i<1 (i=7,9)	i<1 (i=7)	---	---	i<12 (i=1,7,9)

(a): mediante análisis de la varianza. (b): mediante Student-Newman-Keuls. (P<0,05)

Tabla LXV: Liberación de monómeros en muestras polimerizadas a 100 °C, según el pH.

pH	N	BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
1	24	21,8±21,9	1,1±3,1	38,0±61,1	11,3±30,6	21,3±32,8	0,2±0,5
7	24	12,7±11,4	1,7±4,7	21,3±35,9	25,8±55,5	29,8±43,6	0,8±1,5
9	24	34,5±27,1	11,1±30,1	6,8±12,9	22,9±54,3	12,9±14,1	0,8±1,3
12	24	180,9±133,0	2,9±5,5	3,0±6,5	3,2±6,7	6,6±6,8	3,2±4,0
COMPARACION GLOBAL (a)		p<0,05	p=0,0985	p<0,005	p=0,2169	p<0,05	p<0,001
COMPARACION POR PAREJAS (b)		i<12 (i=1,7,9)	---	i<1 (i=7,9)	---	i<7 (i=12)	i<12 (i=1,7,9)

(a): mediante análisis de la varianza. (b): mediante Student-Newman-Keuls. (P<0,05)

Tabla LXVI: Liberación de monómeros en muestras sin polimerizar a 37 °C, según el pH.

pH	N	BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
1	24	28,0±59,3	4,0±10,2	---	11,3±16,8	26,9±68,8	---
7	24	26,4±51,1	2,9±6,4	1,3±3,5	14,3±19,0	3,9±10,6	0,4±1,1
9	24	35,0±54,5	4,5±8,1	0,8±2,2	15,4±22,7	1,4±2,0	---
12	24	27,2±50,2	4,4±10,7	0,9±2,6	7,8±6,8	10,4±18,1	0,4±1,1
COMPARACION GLOBAL (a)		p=0,94	p=0,93	p=0,30	p=0,42	p=0,069	p=0,0958
COMPARACION POR PAREJAS (b)		---	---	---	---	---	---

(a): mediante análisis de la varianza. (b): mediante Student-Newman-Keuls. (P<0,05)

Tabla LXVII: Liberación de monómeros en muestras sin polimerizar a 100 °C, según el pH.

pH	N	BFA	EBFA	PBFA	BADGE	BisGMA	BisDMA
1	24	62,5±92,3	---	6,2±9,7	290,9±478,8	15,3±28,1	0,2±0,3
7	24	60,5±124,1	---	5,2±9,5	95,4±222,8	99,6±252,9	4,1±10,6
9	24	137,9±245,9	---	0,9±1,6	119,1±258,3	49,0±102,5	3,7±5,4
12	24	225,4±284,3	---	1,8±3,7	178,9±338,4	65,7±87,7	20,8±30,7
COMPARACION GLOBAL (a)		p<0,05	---	p<0,05	p=0,1978	p=0,24	p<0,001
COMPARACION POR PAREJAS (b)		i<12 (i=1,7)	---	---	---	---	i<12 (i=1,7,9)

(a): mediante análisis de la varianza. (b): mediante Student-Newman-Keuls. (P<0,05)

3. ANALISIS CROMATOGRAFICO DE LAS MUESTRAS DE SALIVA

De acuerdo con el diseño experimental de colección de las muestras de saliva, es preciso diferenciar 3 grupos de muestras tomadas durante un periodo de 1 hora pero en tres momentos diferentes:

Grupo A: Muestras tomadas con antelación a la colocación del sellador.

Grupo B: Muestras recogidas de forma inmediata tras la aplicación del sellador.

Grupo C: Muestras recogidas a los 6 meses de la colocación del sellador.

El procesamiento de las muestras supone una nueva filtración a través de filtros de diámetro de poro $0,22 \mu\text{m}$ y la inyección en el cromatógrafo de alícuotas de $20 \mu\text{l}$, bajo las condiciones de trabajo descritas en el apartado "Método" para el análisis de las resinas compuestas. Todos los análisis recogidos en las tablas de este capítulo se han realizado por triplicado.

3.1. ANALISIS DE LAS MUESTRAS "GRUPO A"

Los valores medios de la concentración de BFA y derivados obtenidos en las muestras positivas están consignados en la tabla LXVIII. Sólo en las muestras 19 y 20 se detectó la presencia de alguno de los oligómeros estudiados. En el resto de las muestras ninguno de ellos fue detectable.

El cromatograma de la figura 48 corresponde a la muestra n° 19.

Las figuras 49 y 50 muestran el cromatograma por CG y los espectros de masas correspondientes de las muestras n° 19 y 20.

Tabla LXVIII: Cuantificación de monómeros en salivas del Grupo A.

Muestra n°	Volumen ml	BFA $\mu\text{g/ml}$	BADGE $\mu\text{g/ml}$	BisGMA $\mu\text{g/ml}$	BisDMA $\mu\text{g/ml}$
19	40	15,4	---	---	---
20	10	6,6	---	---	7,4

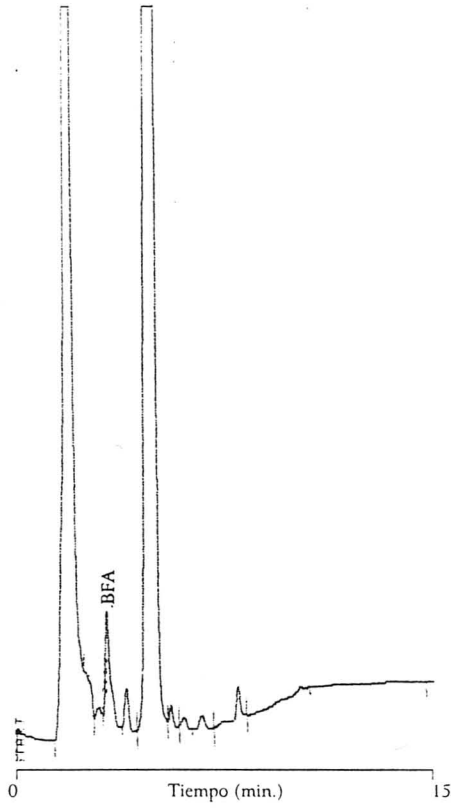


Figura 48: Cromatograma en HPLC de la muestra de saliva 19 del grupo A.

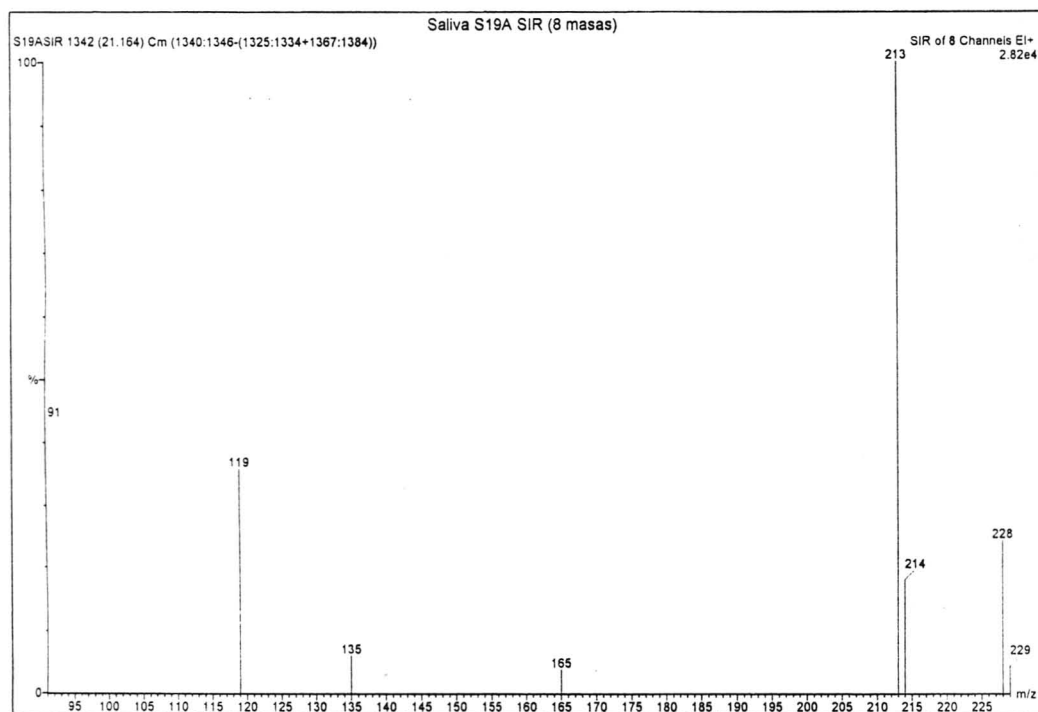
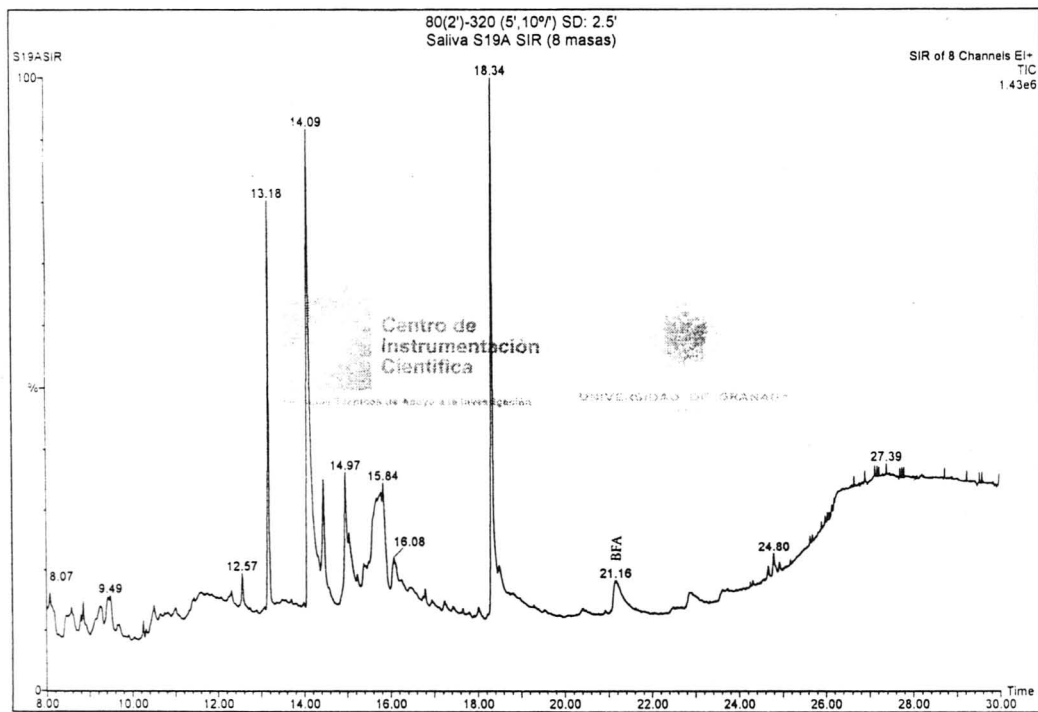


Figura 49: Cromatograma en CG de la muestra 19A y espectro de masas del BFA.

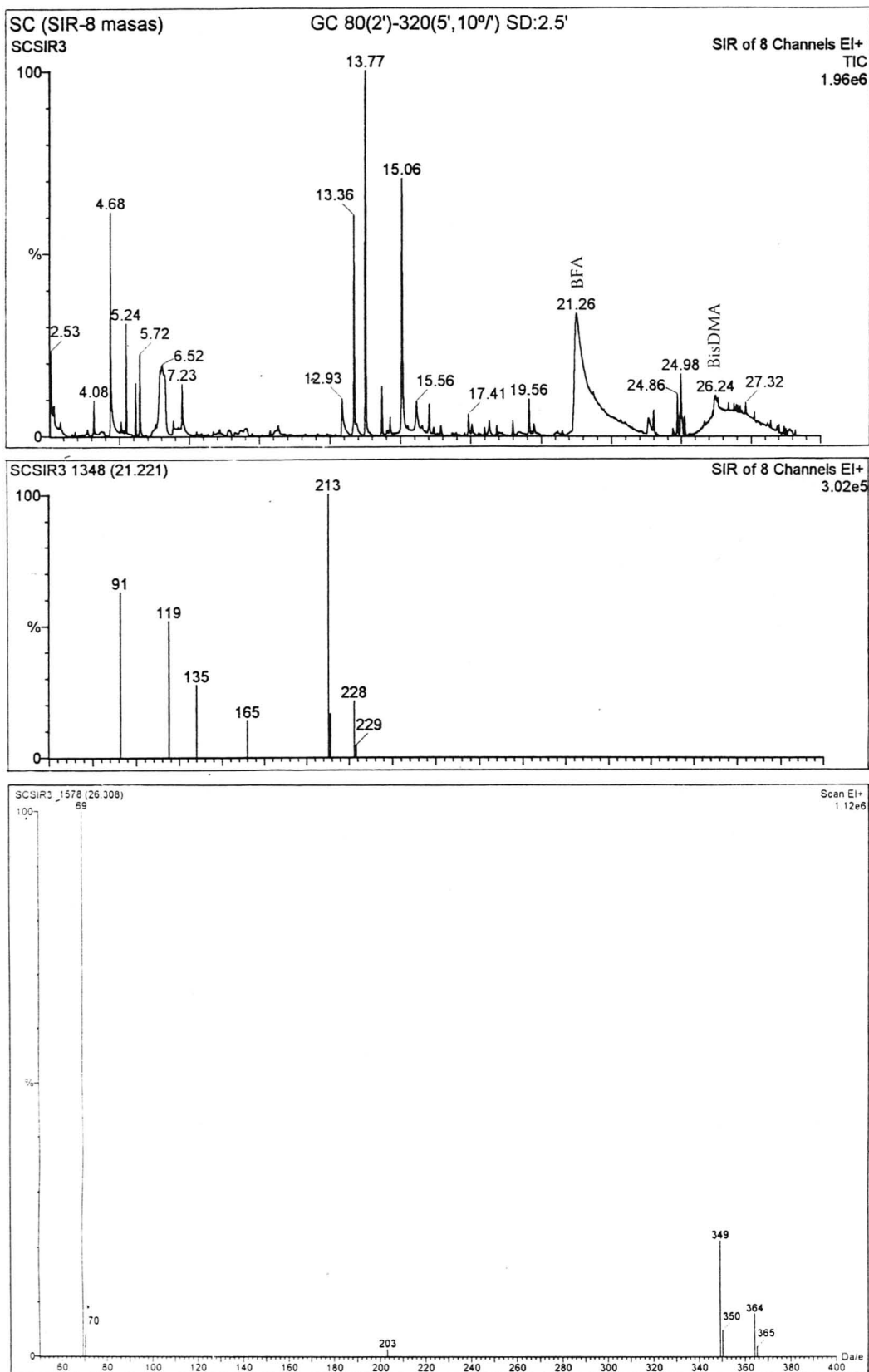


Figura 50: Cromatograma de la muestra 20 y espectros de masas del BFA y BisDMA.

3.2. ANALISIS DE LAS MUESTRAS "GRUPO B"

La tabla LXIX corresponde a los valores medios de las concentraciones de los monómeros encontrados en las muestras de saliva recogidas de forma inmediata tras la aplicación del sellador. En algunos casos, no se llegó a identificar el producto (señalado en la tabla como "---"), mientras que en otros, si bien era detectable, su concentración era inferior al límite de cuantificación del cromatógrafo para esa sustancia en cuestión (indicado en la tabla LXIX como "Detec").

Los cromatogramas de las figuras 51-54 corresponden a las muestras de saliva nº 2, 8, 10 y 19b, respectivamente. Se observa la presencia de BFA y compuestos afines identificados en función a los tiempos de retención relativos calculados para cada producto.

La figura 55 corresponde a algunos de los cromatogramas de salivas de esta serie obtenidos mediante CG/EM, técnica mediante la cual se confirma la presencia de BFA y otros oligómeros. El espectro de masas de los picos señalados ha servido para identificar el monómero del que se trata. La figura 56 corresponde al cromatograma en CG de la muestra 19b.

Tabla LXIX: Cuantificación de monómeros en salivas del Grupo B.

Muestra n°	Volumen ml	BFA $\mu\text{g/ml}$	BADGE $\mu\text{g/ml}$	BisGMA $\mu\text{g/ml}$	BisDMA $\mu\text{g/ml}$
1	29	11,1	---	16,0	4,42
2	31	30,0	---	---	---
3	35	4,9	---	---	3,06
4	33	26,2	---	---	Detec
5	26	3,5	---	3,1	---
6	31	8,1	---	---	Detec
7	27	6,1	---	---	---
8	38	6,9	---	---	1,7
9	32	3,3	---	---	---
10	27	8,5	---	---	---
11	36	5,0	---	---	---
12	35	9,3	Detec	---	0,6
13	29	12,2	---	2,5	---
14	39	20,8	---	---	---
15	32	7,2	---	---	0,76
16	27	4,8	---	---	---
17	27	3,3	---	---	---
18	29	3,9	---	---	---
19	45	4,3	---	---	1,0

--- : No identificado

Detec : Detectable

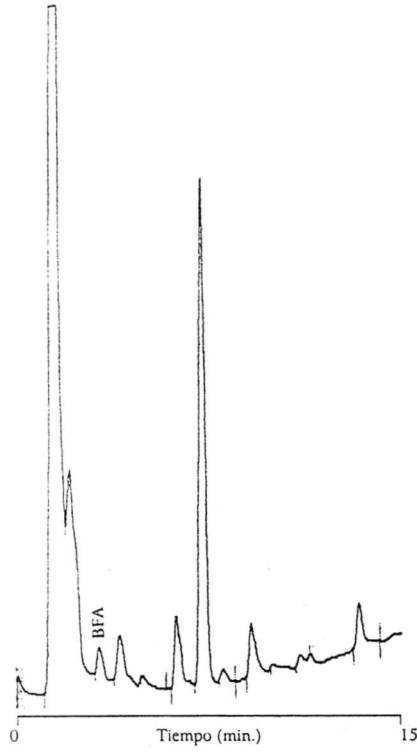


Figura 51: Cromatograma en HPLC de la muestra de saliva 2 del grupo B

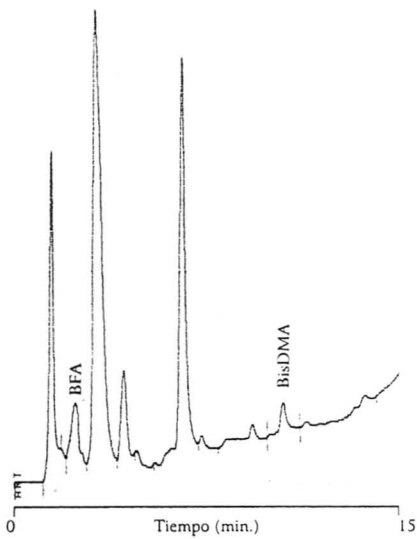


Figura 52: Cromatograma en HPLC de la muestra de saliva 8 del grupo B

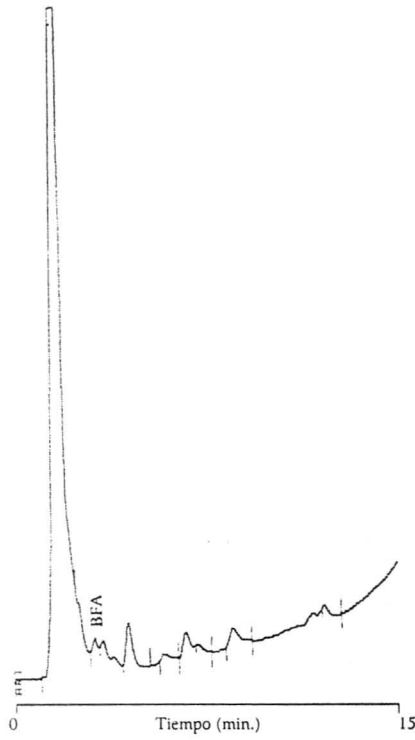


Figura 53: Cromatograma en HPLC de la muestra de saliva 10 del grupo B

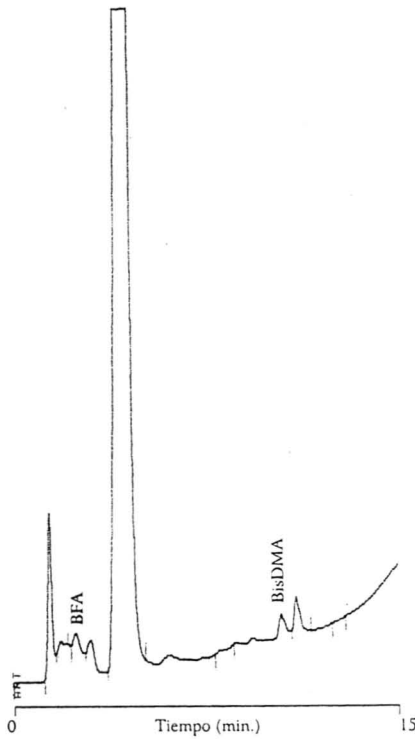


Figura 54: Cromatograma en HPLC de la muestra de saliva 19 del grupo B

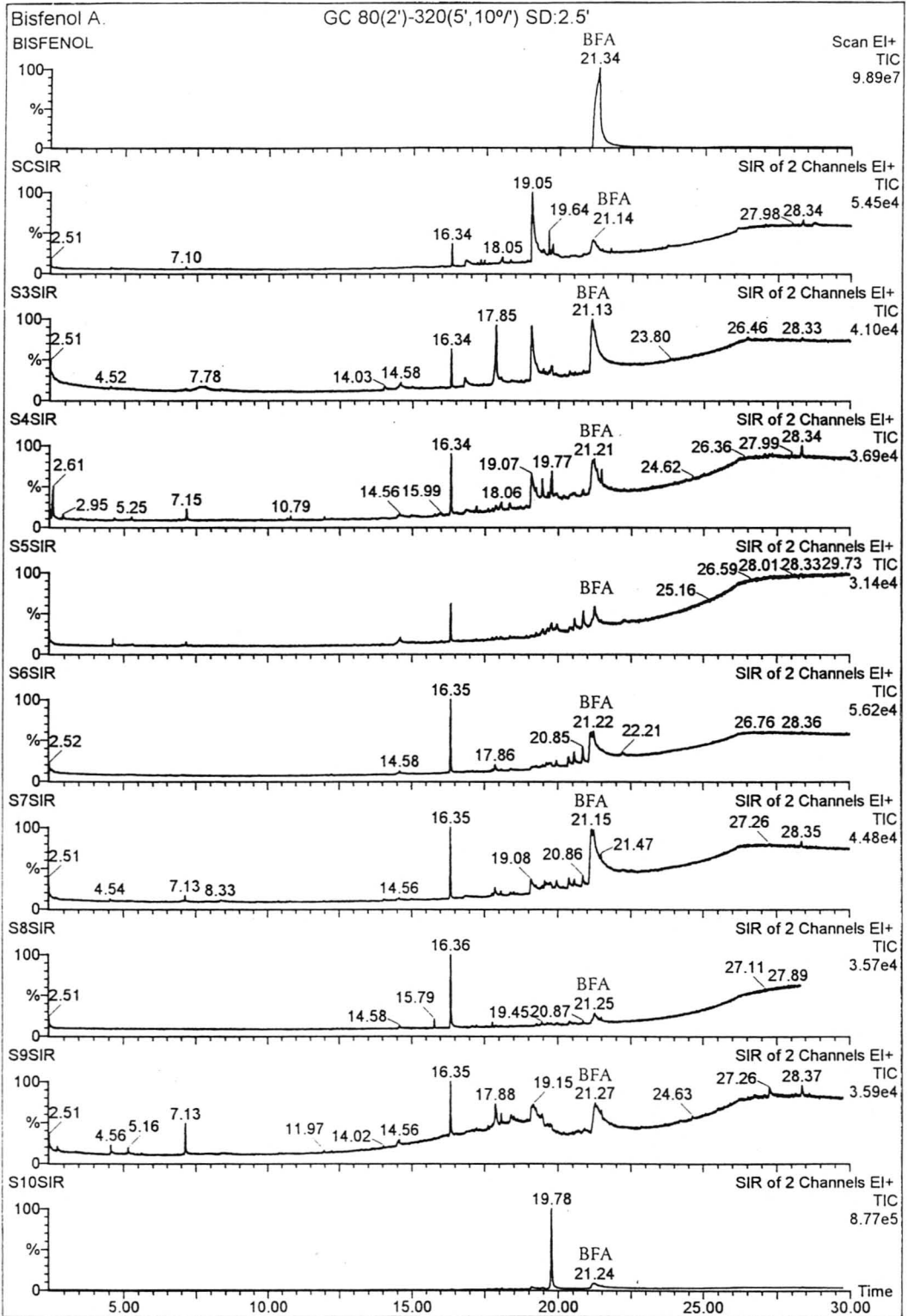


Figura 55: Cromatogramas en CG del BFA y de varias muestras de saliva del grupo B

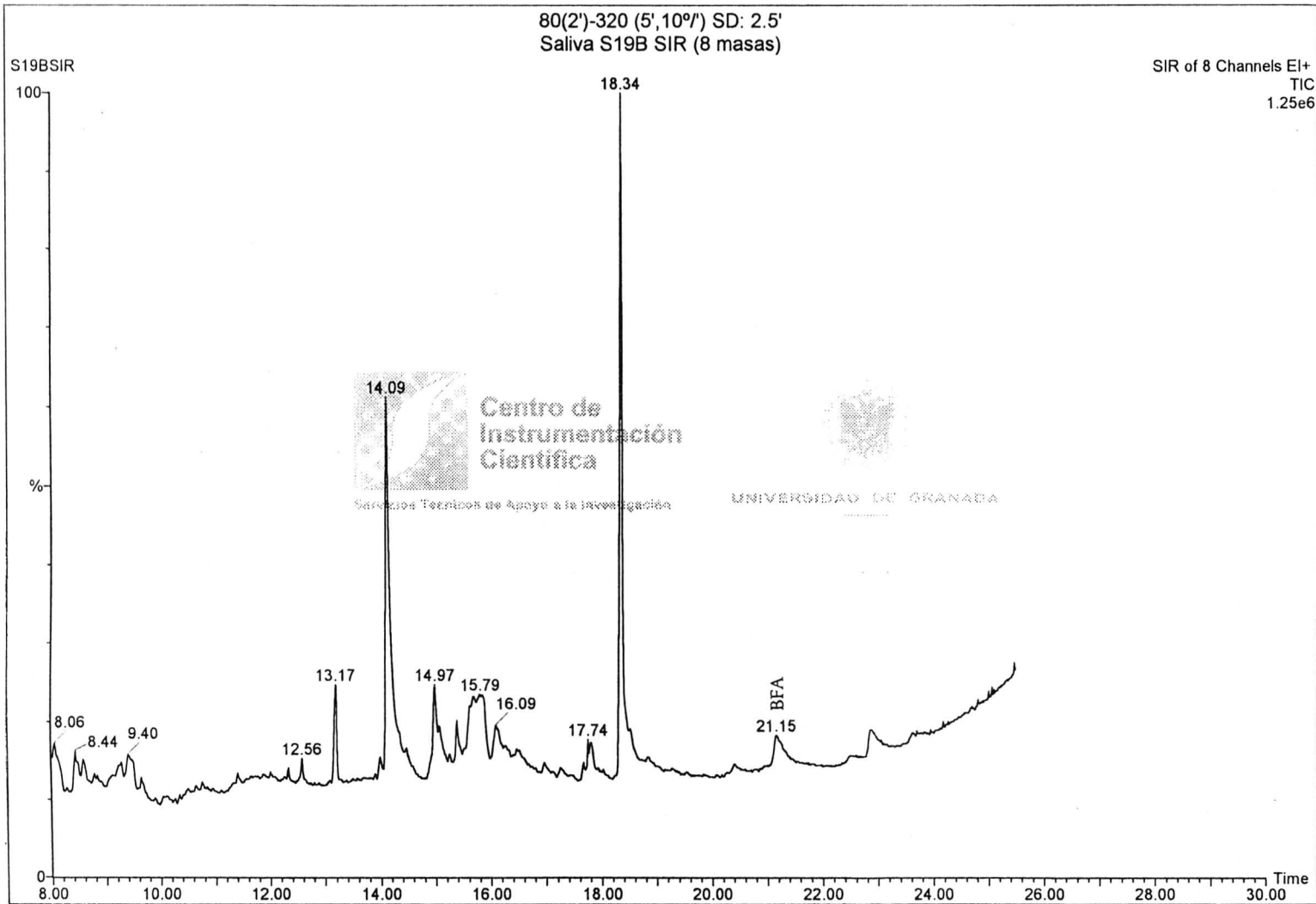


Figura 56: Cromatograma en CG de la muestra de saliva nº 19 del grupo B

Análisis de las muestras "Grupo C"

La tabla LXX se ha construido con los productos identificados por CG/EM y cuantificados por HPLC en cada muestra analizada a los 6 meses de la aplicación del sellador.

Tabla LXX: Cuantificación de monómeros en salivas del Grupo C.

Muestra n°	Volumen ml	BFA $\mu\text{g/ml}$	BADGE $\mu\text{g/ml}$	BisGMA $\mu\text{g/ml}$	BisDMA $\mu\text{g/ml}$
1	15	2,6	---	---	---
2	15	Detec	---	---	---
3	10	Detec	---	---	---
4	35	59,5	---	---	---
5	38	Detec	---	---	---
6	27	---	---	---	---
7	35	---	---	---	---
8	30	6,17	---	---	---
9	50	14,25	---	---	---
10	20	---	---	Detec	---
11	50	17,87	---	Detec	---
12	18	50,36	---	Detec	---
13	25	28,4	---	---	---
14	10	---	---	---	---
15	20	---	---	---	---
16	25	---	---	Detec	---
17	15	13,84	---	---	---
18	25	Detec	---	Detec	---
19	55	61,54	---	Detec	---

--- : No identificado

Detec.: Detectable

Las figuras 57,58 y 59 presentan el perfil cromatográfico en HPLC de las salivas correspondientes a las muestras n° 2, 5, y 19 del grupo C. Las figuras 60, 61 y 62, corresponden a los cromatogramas en CG de las muestras 1, 8 y 13 de este grupo.

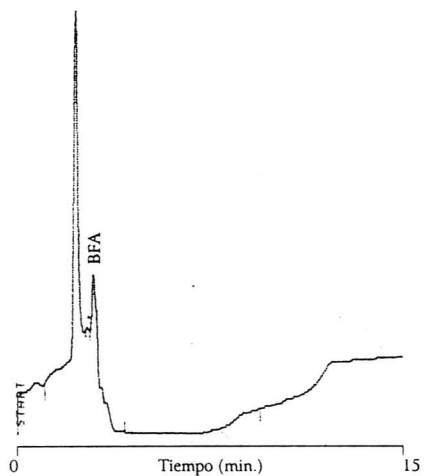


Figura 57: Cromatograma en HPLC de la muestra de saliva 2 del grupo C

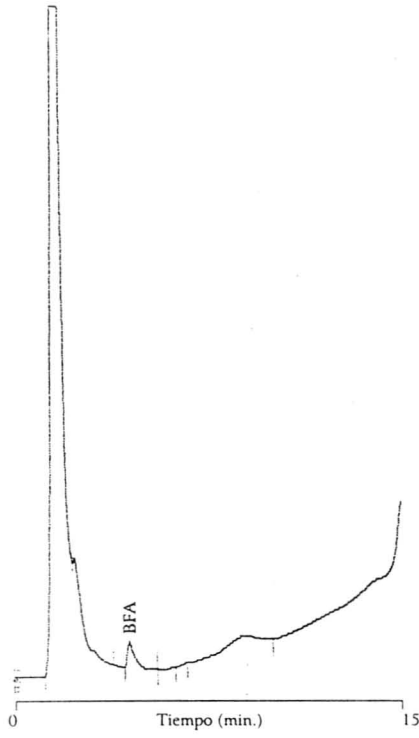


Figura 58: Cromatograma en HPLC de la muestra de saliva 5 del grupo C

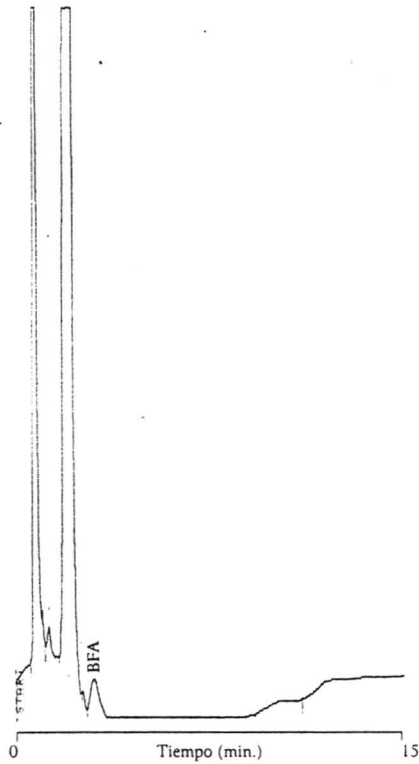


Figura 59: Cromatograma en HPLC de la muestra de saliva 19 del grupo C

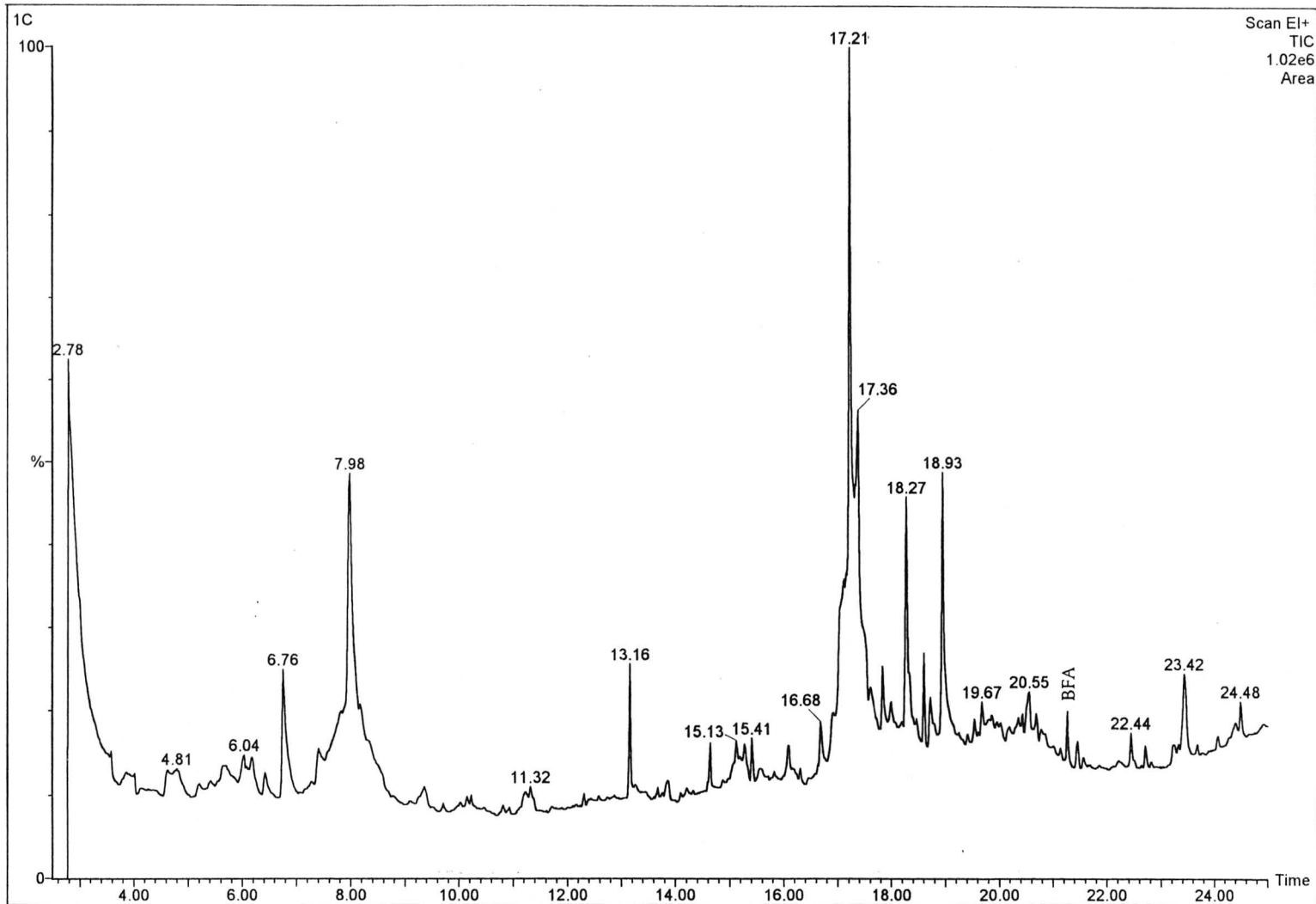


Figura 60: Cromatograma en CG de la muestra de saliva n° 1 del grupo C. Identificación de la presencia de BFA

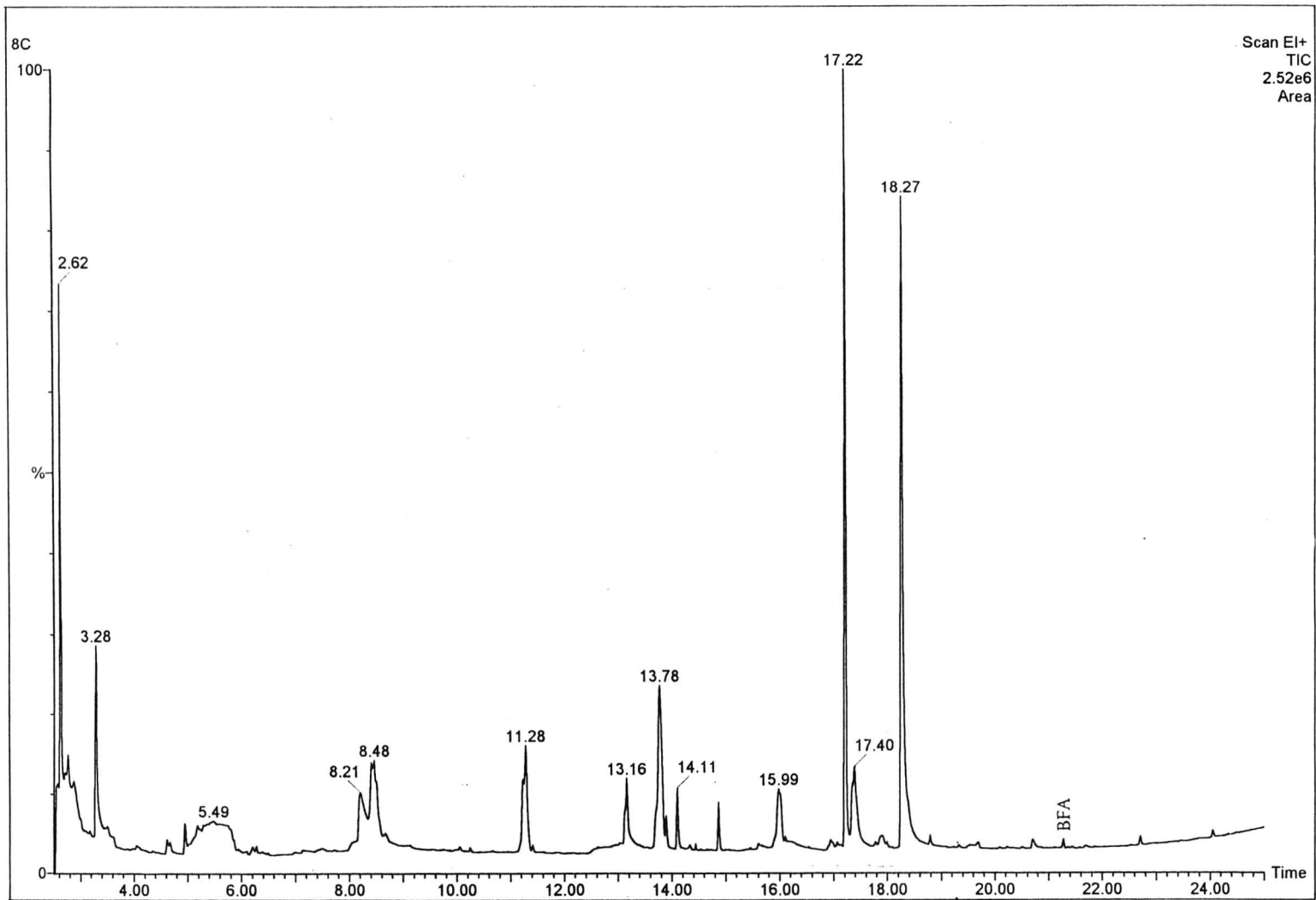


Figura 61: Cromatograma en CG de la muestra de saliva n° 8 del grupo C. Identificación de la presencia de BFA

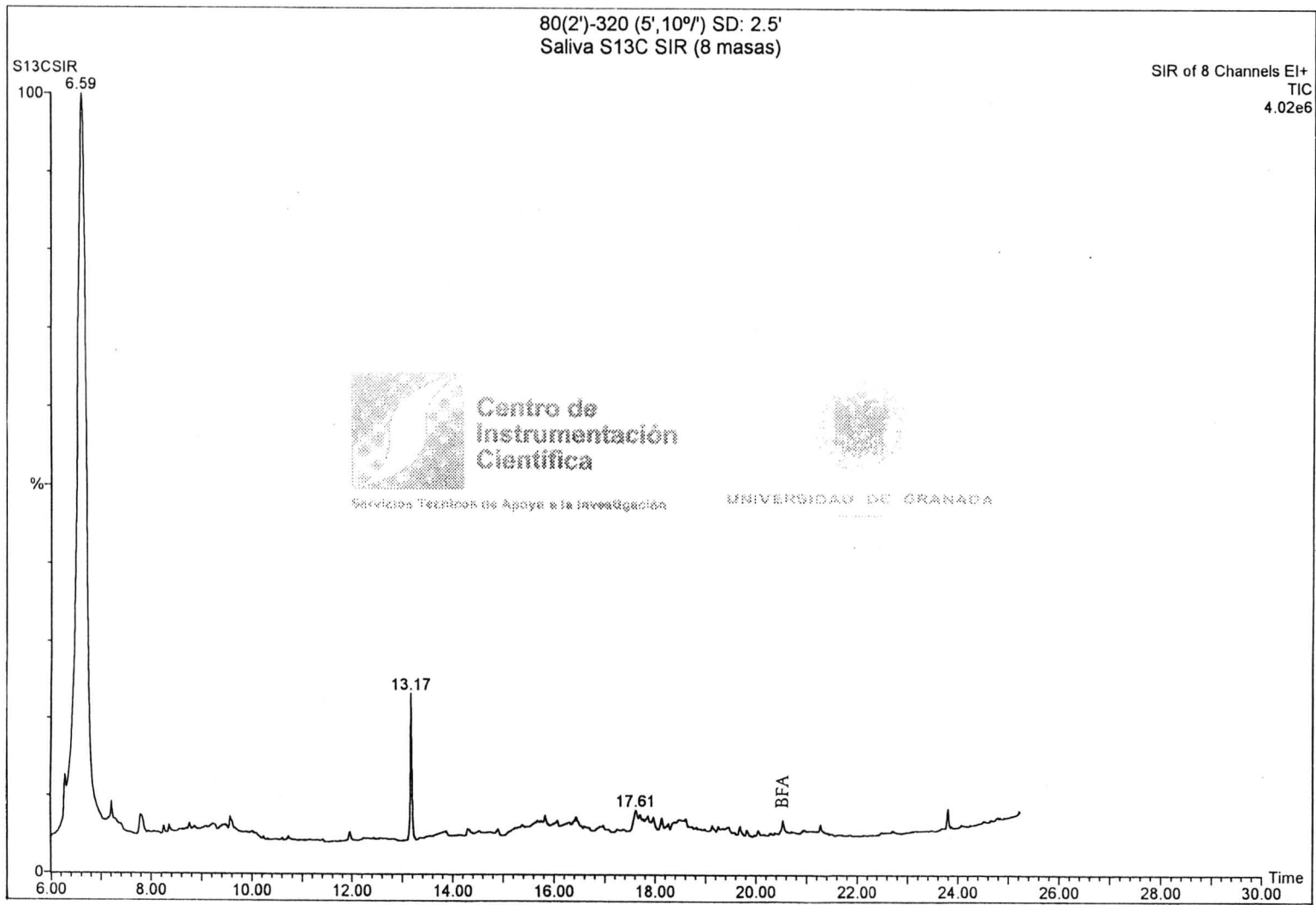


Figura 62: Cromatograma de 1 muestra de saliva n° 13 del grupo C. Identificación de la presencia de BFA

RESULTADOS DEL TEST E-SCREEN. PROLIFERACION CELULAR

Siguiendo la metodología descrita en el apartado de "Métodos" para el test de proliferación E-SCREEN, se valoró el crecimiento celular en presencia de estradiol-17 β , en grupos celulares no tratados (controles) y en el grupo de células expuestas durante las 144 horas que dura el ensayo a concentraciones variables de cada uno de los compuestos químicos identificados como constituyentes de los composites y selladores comerciales estudiados. Cada ensayo queda estandarizado a un valor de crecimiento 1 para los controles y se expresa la media, desviación estándar y error estándar de la media, del incremento del número de células frente al control. Estos datos están recogidos en las tablas LXXI a la LXXVII.

Los valores medios de los resultados obtenidos en las distintas condiciones experimentales fueron comparadas mediante el test estadístico *t* de Student. La significación estadística de las diferencias queda indicada en las tablas como + ($p < 0,01$) y * ($p < 0,001$).

Tabla LXXI: Efecto proliferativo del Estradiol-17 β

Concentración [M]	10 ⁻¹³	10 ⁻¹²	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁹
Media (M)	1,12	4,93*	6,09*	6,53*	6,61*
D. Estándar (DE)	0,12	0,38	0,55	0,27	0,30
Error E. (EEM)	0,06	0,19	0,27	0,13	0,15

Tabla LXXII: Efecto proliferativo del Bisfenol-A

Concentración [M]	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media (M)	1,01	1,04	3,38+	5,99*	6,03*
D. Estándar (DE)	0,02	0,12	0,10	0,06	0,51
Error E. (EEM)	0,01	0,06	0,05	0,03	0,25

Tabla LXXIII: Efecto proliferativo del Etoxilato de Bisfenol-A

Concentración [M]	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media (M)	0,97	0,87	0,96	0,94	0,95
D. Estándar (DE)	0,07	0,063	0,021	0,098	0,007
Error E. (EEM)	0,05	0,045	0,015	0,07	0,005

Tabla LXXIV: Efecto proliferativo del Propoxilato de Bisfenol-A

Concentración [M]	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media (M)	0,87	0,97	0,97	0,96	0,94
D. Estándar (DE)	0,042	0,028	0,028	0,007	0,098
Error E. (EEM)	0,03	0,02	0,02	0,005	0,07

Tabla LXXV: Efecto proliferativo del Diglicidil Eter de Bisfenol-A

Concentración [M]	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media (M)	1,04	1,18	0,99	1,18	1,99+
D. Estándar (DE)	0,16	0,25	0,05	0,13	0,21
Error E. (EEM)	0,13	0,20	0,04	0,11	0,17

Tabla LXXVI: Efecto proliferativo del Dimetacrilato del Diglicidileter de Bisfenol-A

Concentración [M]	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media (M)	1,13	1,08	0,96	1,09	1,10
D. Estándar (DE)	0,19	0,60	0,59	0,51	0,74
Error E. (EEM)	0,16	0,52	0,51	0,44	0,64

Tabla LXXVII: Efecto proliferativo del Dimetacrilato de Bisfenol-A

Concentración [M]	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media (M)	2,56+	3,08+	4,83*	5,57*	5,34*
D. Estándar (DE)	0,46	0,28	1,05	1,04	1,61
Error E. (EEM)	0,40	0,24	0,85	0,90	1,14

La figura 63 representa gráficamente el crecimiento celular relativo para diferentes concentraciones de estradiol-17 β y se incluye el crecimiento de los grupos celulares control, expresada por una línea de puntos en tasa de crecimiento uno.

Las figuras 64-66 representan gráficamente el crecimiento celular relativo tras la exposición a los compuestos testados a distintas concentraciones en relación con el estradiol-17 β y el grupo control.

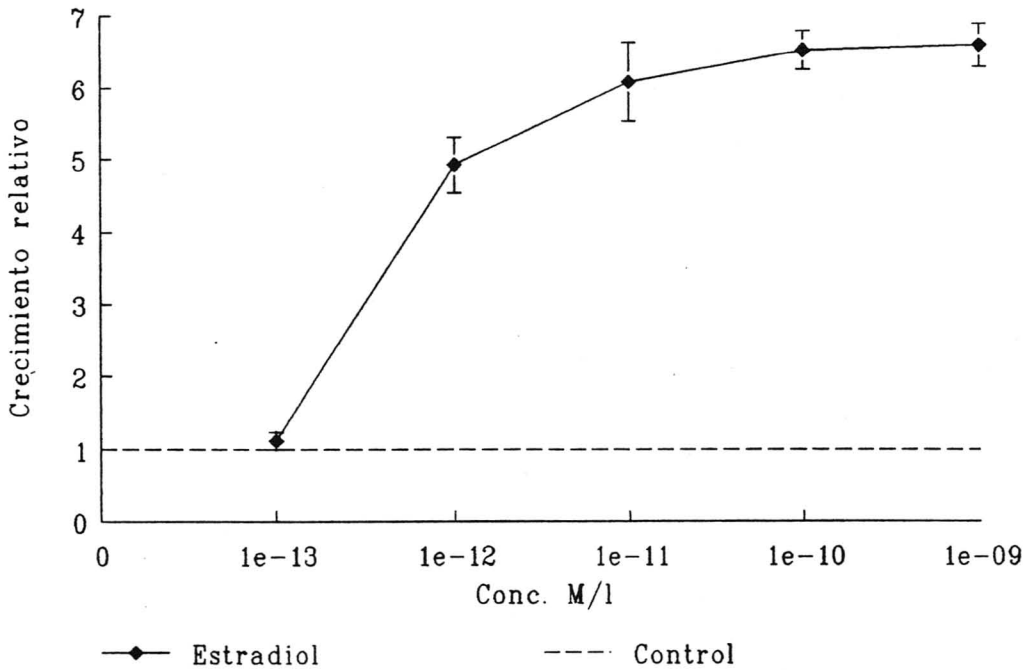


Figura 63: Curva de proliferación del Estradiol-17 β y grupo control

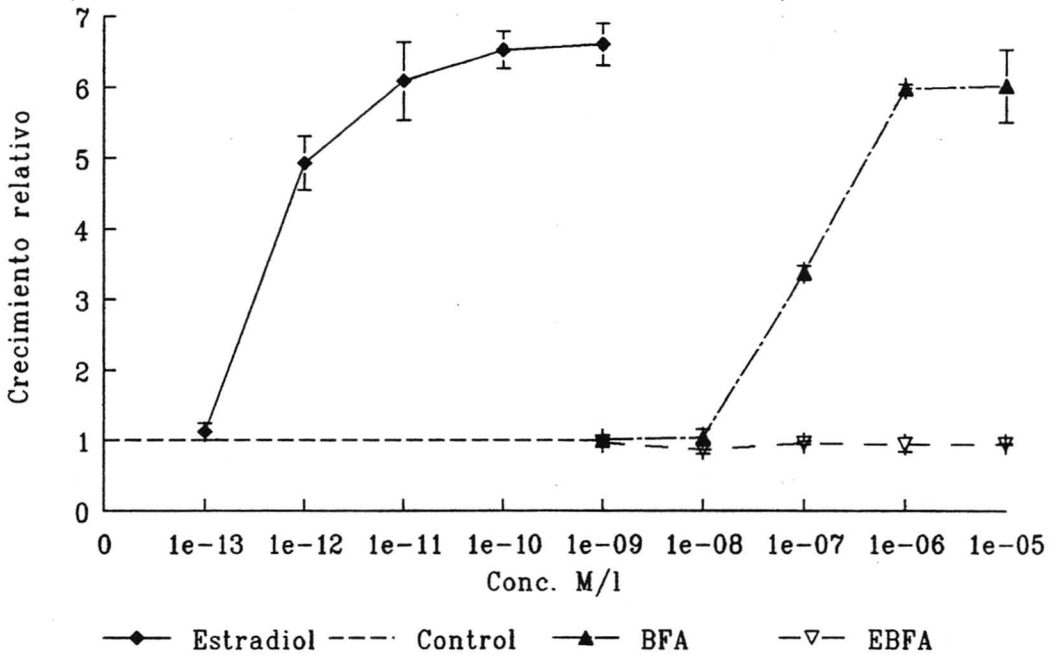


Figura 64: Curvas de proliferación del BFA y EBFA frente a Estradiol-17β y control

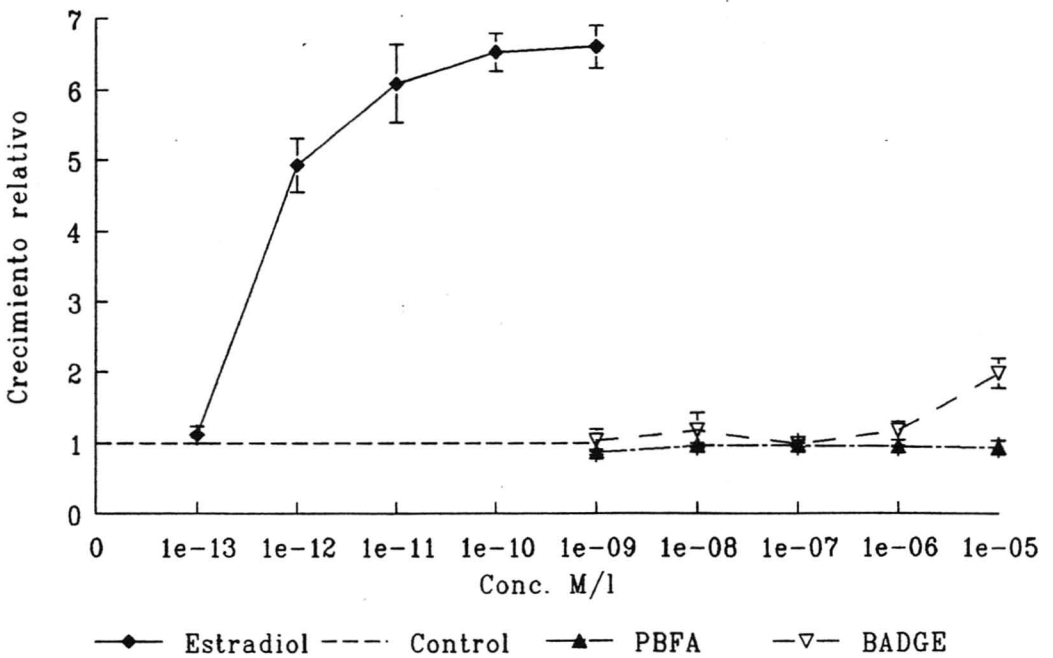


Figura 65: Curvas de proliferación del PBFA y BADGE frente a Estradiol-17β y control

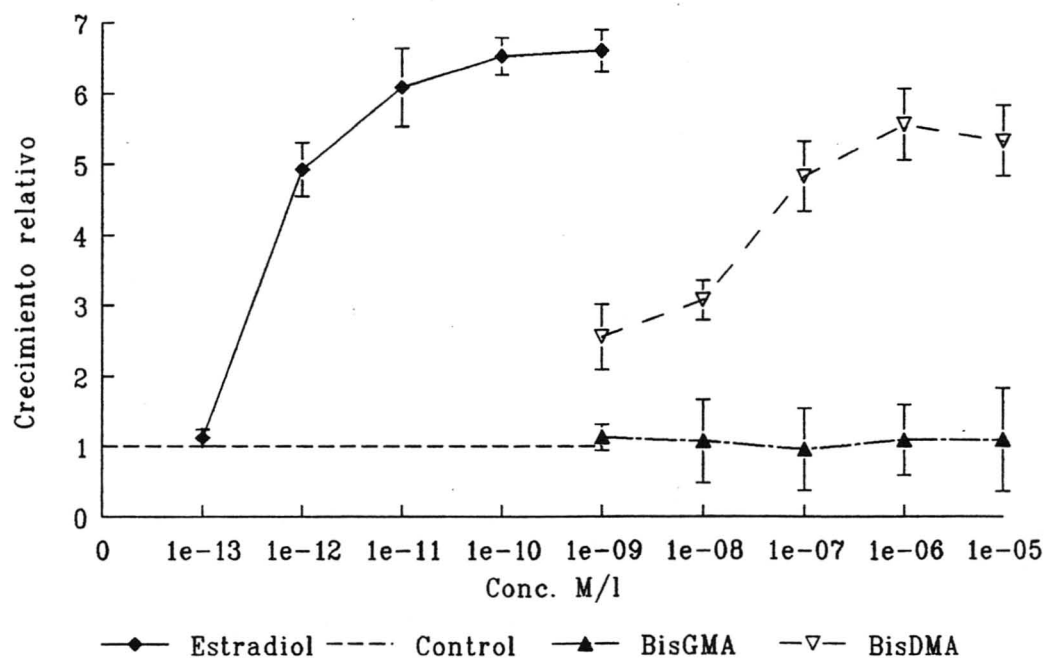


Figura 66: Curvas de proliferación del BisGMA y BisDMA frente a Estradiol-17 β y control

De igual modo, siguiendo la metodología utilizada para la valoración del efecto proliferativo de los monómeros en estado puro y a distintas concentraciones, se consideró de interés el estudio de la influencia sobre la proliferación de MCF7 de los hidrolizados de los monómeros BADGE y BisGMA. Las tablas LXXVIII-LXXXI muestran el efecto proliferativo de la exposición de las células a los productos resultantes de la hidrólisis ácida (ClH, 1N) e hidrólisis alcalina (NaOH, 1N) de ambos monómeros.

Tabla LXXVIII: Efecto proliferativo: BADGE tratado con CIH 1N

Concentración [M]	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media (M)	0,92	1,20	1,98+	2,19+	2,30+
D. Estándar (DE)	0,37	0,27	0,44	0,4	0,32
Error E. (EEM)	0,33	0,23	0,40	0,36	0,28

Tabla LXXIX: Efecto proliferativo: BADGE tratado con NaOH 1N

Concentración [M]	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media (M)	1,10	1,80	2,3+	1,90	2,00+
D. Estándar (DE)	0,23	0,65	0,29	0,45	0,69
Error E. (EEM)	1,40	1,39	1,15	0,58	0,20

Tabla LXXX: Efecto proliferativo: BisGMA tratado con CIH 1N

Concentración [M]	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media (M)	1,20	1,10	1,00	1,20	2,20*
D. Estándar (DE)	0,34	0,26	0,17	0,13	0,59
Error E. (EEM)	0,24	0,18	0,125	0,095	0,41

Tabla LXXXI: Efecto proliferativo: BisGMA tratado con NaOH 1N

Concentración [M]	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Media (M)	1,00	0,95	1,10	1,00	3,10+
D. Estándar (DE)	0,50	0,65	0,43	0,56	0,45
Error E. (EEM)	0,61	0,73	0,89	0,83	2,08

Las figuras 67 y 68 muestran las representaciones gráficas de los resultados contenidos en las tablas LXXV, LXXVI y LXXVIII-LXXXI. En ellas se comparan las curvas de proliferación de los productos puros y de sus respectivos hidrolizados ácidos y alcalinos. La figura 67 se refiere al BADGE y la 68 al BisGMA.

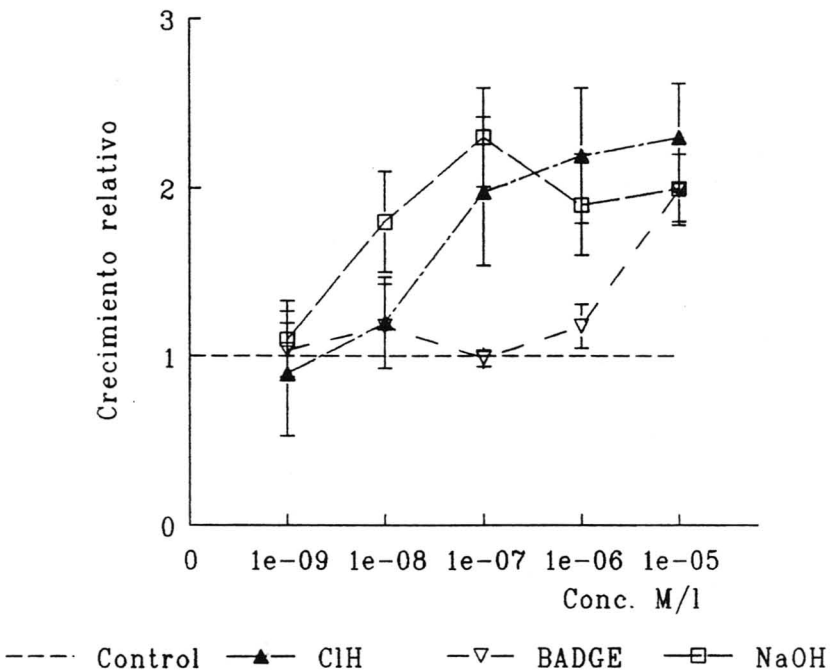


Figura 67: Curvas de proliferación del BADGE y sus hidrolizados.

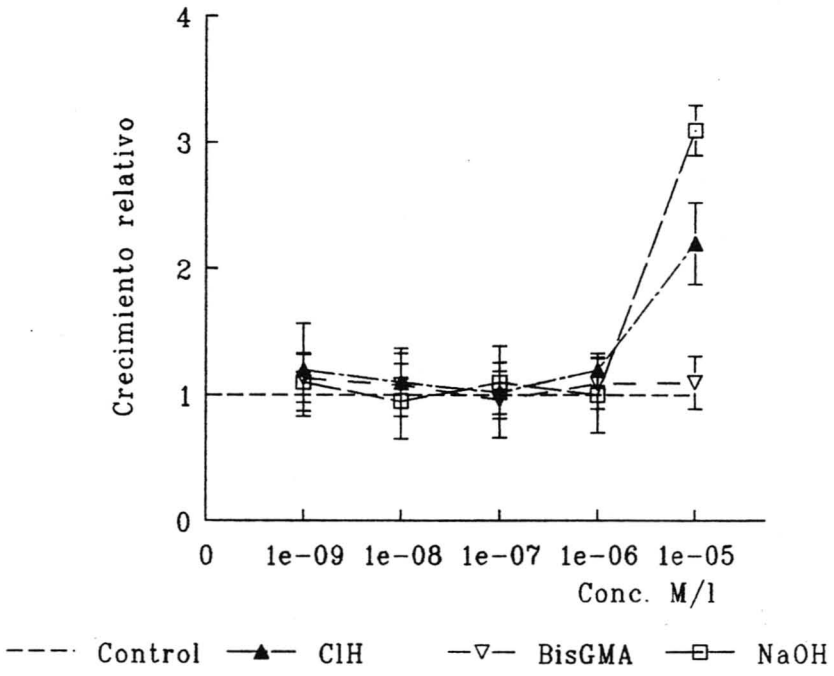


Figura 68: Curvas de proliferación del BisGMA y sus hidrolizados

ESTIMACION DE LA EFICACIA Y DE LA POTENCIA PROLIFERATIVA

La tabla LXXXII recoge los datos de la concentración en la cual cada producto testado mostró el máximo efecto proliferativo en el E-SCREEN (Concentración), la tasa máxima de proliferación para cada compuesto a la concentración óptima (Efecto proliferativo) y los valores estimados de la potencia proliferativa relativa (PPR) y eficacia proliferativa relativa (EPR).

Tabla LXXXII: Eficacia Proliferativa Relativa y Potencia Proliferativa Relativa del Bisfenol-A y derivados.

SUSTANCIA	CONCENTRACION [nM]	EFECTO PROLIFERATIVO	PPR (%)	EPR (%)
ESTRADIOL-17 β	0,01	6,61 \pm 0,30	100	100
BFA	100	6,03 \pm 0,51	0,001	95,2
EBFA	-	0,94 \pm 0,09	-	-
PBFA	-	0,95 \pm 0,30	-	-
BADGE	10.000	1,99 \pm 0,21	0,0001	30,1
BisGMA	-	1,10 \pm 0,07	-	-
BisDMA	100	5,57 \pm 0,57	0,001	91,4

5. PROCESAMIENTO DEL RECEPTOR ESTROGENICO (RE)

Utilizando la línea celular MCF7-BUS, se procedió al estudio del efecto de los compuestos químicos sobre la expresión del receptor de estrógenos. Estos se ensayaron a la concentración en que presentan máxima eficacia proliferativa.

La tabla LXXXIII muestra los resultados obtenidos tras la exposición durante 72 horas a 1 nM de estradiol-17 β y/o la concentración en que presentaron máxima actividad proliferativa los productos testados.

Tabla LXXXIII: Concentración de receptor estrogénico (RE) en Bisfenol-A y sus derivados.

PRODUCTO [Conc.]	[Prot.] (mg/ml)	RE (fmol/ml)	RE/[Prot.] (fmol/mg)	Variación (%)
CONTROL [0]	1,1±0,1	202,3±15,1	183,9±59,0	100,0
ESTRADIOL-17β [1 nM]	1,5±0,1	138,5±7,3	92,6±13,1*	50,4
BISFENOL-A [1 μM]	1,3±0,2	313,2±18,7	240,9±19,6+	131,0
EBFA [10 μM]	1,1±0,1	204±6,9	182,2±17,2	99,10
PBFA [10 μM]	1,1±0,1	188,2±7,3	171,7±7,3	93,90
BADGE [10 μM]	1,1±0,1	212,4±7,3	193,1±4,5	105,10
BisGMA [10 μM]	1,1±0,1	220,4±9,3	200,1±4,5	108,70
BisDMA [10 μM]	1,2±0,3	267,3±23,9	222,5±19,9	120,70

La figura 69 muestra gráficamente las variaciones en la concentración del receptor estrogénico para las células MCF7 BUS, tras el tratamiento con cada uno de los compuestos químicos ensayados.

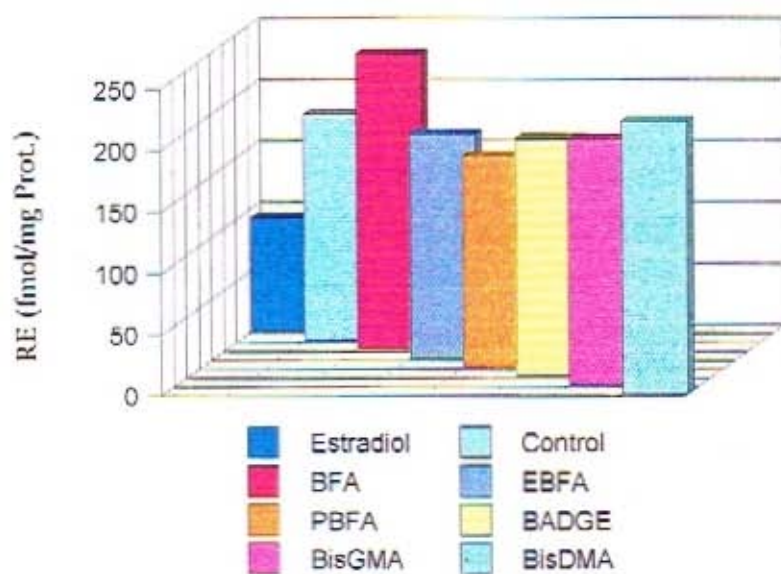


Figura 69: Diagrama de barras del RE en BFA y oligómeros frente a Estradiol-17 β y control

6. INDUCCION DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA (RPg)

Se han realizado experimentos en los que se cuantifican, siguiendo un método inmunoenzimático, las tasas de receptor de progesterona (RPg). Para ello, las células una vez adheridas al soporte plástico, son mantenidas durante 72 horas en el medio experimental (DME+10%CDHuS) desprovisto de suplemento alguno (control) o suplementado con estradiol-17 β .

La tabla LXXXIV muestra los resultados obtenidos en este tipo de experimentos. Se indica el crecimiento celular, expresado como cantidad de proteína extraída del tapiz celular, la concentración bruta de receptor de progesterona y el cociente entre ambas magnitudes para células tratadas con cada uno de los productos estudiados a concentración en que presentan máxima actividad proliferativa. Además, se indica el porcentaje de variación de la concentración de receptor de progesterona tomando como referencia el 100% para el grupo celular control.

Los valores medios de los resultados obtenidos en las distintas condiciones experimentales fueron comparadas mediante el test estadístico t de Student. La significación estadística de las diferencias queda indicada en la tabla como + ($p < 0,01$) y * ($p < 0,001$).

Se incluye en la tabla los resultados obtenidos tras la exposición durante 72 horas a 1 nM de estradiol-17 β .

Tabla LXXXIV: Concentración de receptor de progesterona (RPg) en Bisfenol-A y derivados.

PRODUCTO [Conc.]	[Prot.] (mg/ml)	RPg (fmol/ml)	RPg/[Prot.] (fmol/mg)	Variación (%)
CONTROL [0]	1,1±0,1	18,0±5,2	16,4±3,0	100,0
ESTRADIOL-17β [1 nM]	1,5±0,1	229,7±6,9	153,1±10,5 *	900,30
BISFENOL-A [1 μM]	1,3±0,2	313,2±18,7	240,9±19,6*	1.310,00
EBFA [10 μM]	1,1±0,1	19,8±2,9	18,0±7,2	110,00
PBFA [10 μM]	1,1±0,1	18,5±2,5	16,8±2,3	103,00
BADGE [10 μM]	1,1±0,1	18,5±6,1	16,9±5,5	105,00
BisGMA [10 μM]	1,1±0,1	17,1±4,9	15,5±4,5	95,00
BisDMA [10 μM]	1,2±0,3	147,6±10,6	123,5±8,9+	750,00

La figura 70 muestra gráficamente las variaciones en la concentración del receptor de progesterona para la línea celular MCF7 BUS, tras el tratamiento con cada uno de los compuestos químicos ensayados.

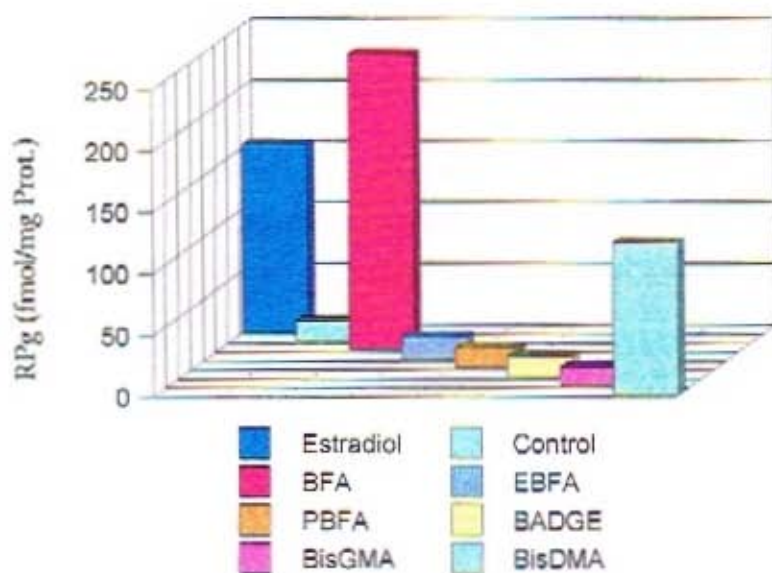


Figura 70: Diagrama de barras del RPg en BFA y oligómeros frente a Estradiol-17 β y control

7. SECRECIÓN DE pS2

De forma paralela a los ensayos de proliferación celular (test E-SCREEN), se ha cuantificado en el medio de cultivo extracelular, el acúmulo de la proteína secretada estrógenodependiente pS2, en presencia y en ausencia de estradiol-17 β , así como en presencia de los distintos productos objeto del estudio. Los resultados experimentales quedan recogidos en la tabla LXXXV.

Los valores medios de los resultados obtenidos en las distintas condiciones experimentales fueron comparadas mediante el test estadístico *t* de Student. La significación estadística de las diferencias queda indicada en las tablas como + ($p < 0,01$) y * ($p < 0,001$).

Tabla LXXXV: Secreción de pS2 en Bisfenol-A y derivados.

PRODUCTO [Conc.]	Nº Céls./poc. (x10 ³)	pS2 (ng/ml)	pS2/nºCéls. (ng/10 ⁶)	Variación
CONTROL [0]	63,2±1,4	3,4±1,1	53,6±8,7	1,00
ESTRADIOL-17β [1 nM]	378,3±11,1	67,9±7,3	179,4±13,1*	3,30
BISFENOL-A [1 μM]	381,1±21,3	67,3±5,1	176,8±17,1*	3,30
EBFA [10 μM]	37,9±7,9	2,2±1,2	58,9±6,1	1,10
PBFA [10 μM]	59,4±4,1	3,5±1,1	58,9±9,7	1,10
BADGE [10 μM]	127,7±7,9	7,7±2,3	61,9±3,1	1,10
BisGMA [10 μM]	132,1±13,1	7,6±1,7	57,8±6,4	1,10
BisDMA [1 μM]	352,0±21,9	60,1±5,8	171,5±11,9*	3,20

La figura 71 presenta los resultados numéricos en forma gráfica, para el incremento de la secreción de pS2 tras 144 horas de subcultivo.

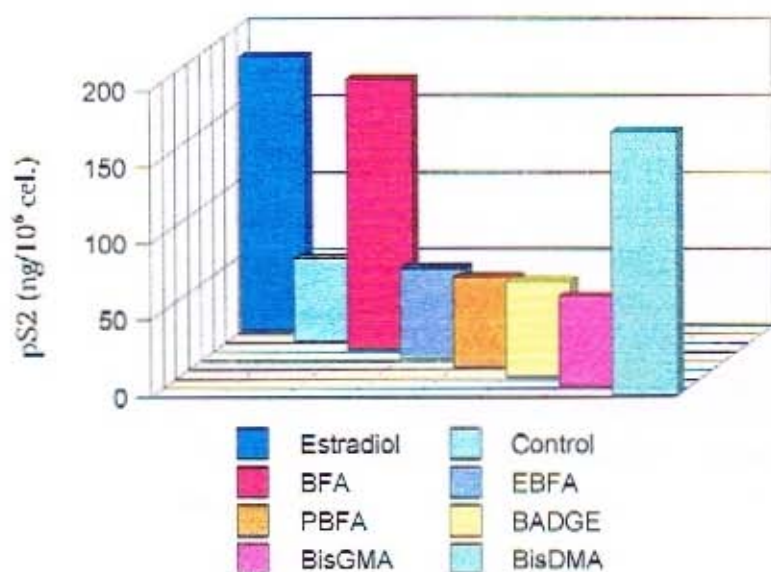


Figura 71: Diagrama de barras del PS2 en BFA y oligómeros frente a Estradiol-17 β y control

8. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE ENLACE AL RECEPTOR ESTROGENICO

Se han realizado experimentos en los que se estudia la capacidad de los diferentes compuestos químicos considerados en este trabajo para competir con el estradiol-17 β en su unión al receptor estrogénico. Para ello, se ha estimado la concentración de cada uno de estos compuestos capaz de desplazar el 50% de la unión del estradiol a su receptor. Esto permite conocer la afinidad relativa entre estos compuestos y el receptor hormonal.

La tabla LXXXVI muestra los resultados de tal tipo de ensayos. Se indica para cada compuesto la afinidad relativa por el receptor estrogénico (RBA), considerando el 100% para la unión del estradiol-17 β a dicho receptor. Además se muestran la Potencia Proliferativa Relativa (PPR) y Eficacia Proliferativa Relativa (EPR) para comparación de actividad y afinidad.

Tabla LXXXVI: Afinidad relativa por el RE del BFA y oligómeros

COMPUESTO	RBA	PPR (%)	EPR (%)
ESTRADIOL-17 β	100	100	100
BFA	0,001	0,001	95,2
EBFA	---	---	---
PBFA	---	---	---
BADGE	---	0,0001	30,1
BisGMA	---	---	---
BisDMA	0,00001	0,001	91,4

La figura 72 es una representación gráfica de las curvas de desplazamiento de la unión estradiol-17 β /receptor estrogénico para cada uno de los compuestos considerados. La concentración de éstos en la cual se observa un desplazamiento del 50% del enlace del estradiol tritiado al receptor sirve para estimar la afinidad relativa.

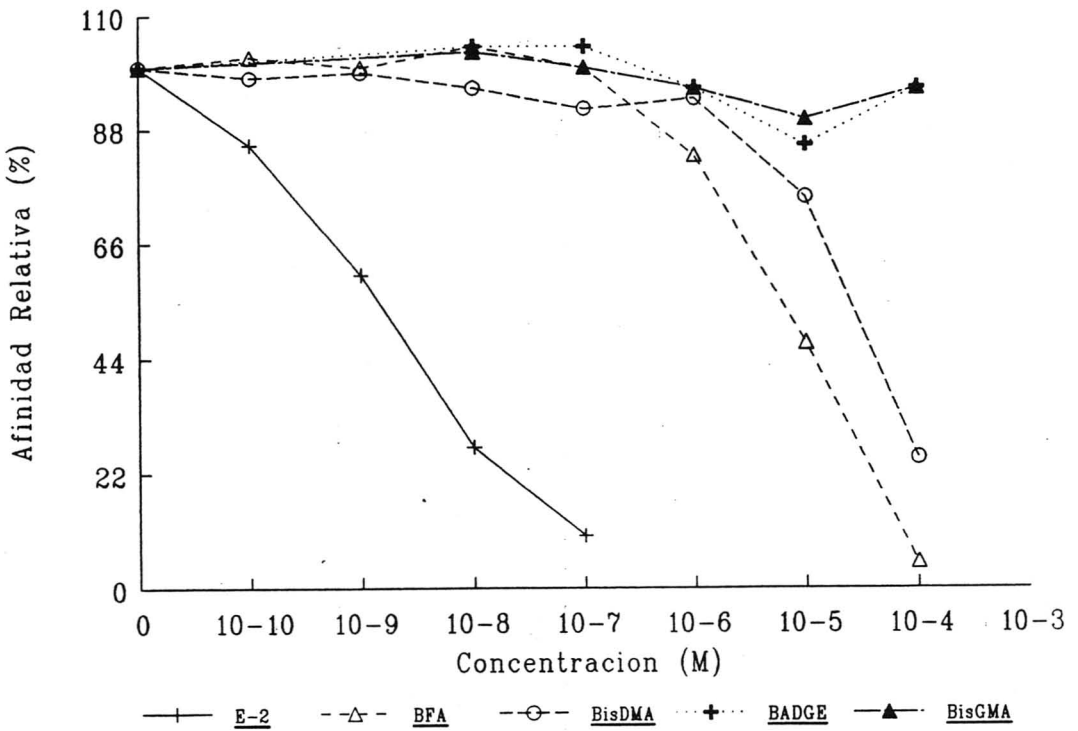


Figura 72: Afinidad relativa por el RE del BFA y oligómeros frente a Estradiol-17 β

9. EFECTO BIOLÓGICO DE COMPOSITOS Y SELLADORES

Siguiendo la secuencia de trabajo planteada, se comprobado el efecto proliferativo que pudieran presentar los composites en estudio. A título de ejemplo se recogen en las tablas LXXXVII-XCIV los resultados correspondientes al estudio de algunos composites representativos de la totalidad de los incluidos en la Memoria así como el efecto proliferativo que manifiesta el sellador. El estudio se ha realizado sometiendo 100 mg de muestra al efecto de 1 ml de etanol. A partir de esta suspensión se hacen diluciones decrecientes en suero (10^{-2} - 10^{-6}). Ante el comportamiento manifestado por los oligómeros sometidos a pH ácido y alcalino, se han realizado ensayos similares con los productos comerciales. Las tablas incluidas en este apartado corresponden a los resultados más significativos de todos los obtenidos.

Tabla LXXXVII: Efecto proliferativo del composite Tetric

Dilución	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
Media(M)	1,37	1,42	1,38	1,16	0,94
D. Estándar (DE)	0,27	0,67	0,50	0,43	0,30
Error E. (EEM)	0,22	0,58	0,44	0,24	0,24

Tabla LXXXVIII: Efecto proliferativo de la suspensión de Tetric tratada con CIH 1N

Dilución	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
Media(M)	1,29	1,40	1,27	1,44	0,30
D. Estándar (DE)	0,30	0,63	0,44	0,65	---
Error E. (EEM)	0,24	0,54	0,37	0,56	---

Tabla LXXXIX: Efecto proliferativo de la suspensión de Tetric tratada con NaOH 1N

Dilución	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
Media(M)	2,10+	1,85	1,76	1,55	0,30
D. Estándar (DE)	0,74	0,35	0,42	0,04	---
Error E. (EEM)	0,68	0,30	0,30	0,03	---

Tabla XC: Efecto proliferativo de la suspensión de composite Polofil

Dilución	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
Media(M)	0,72	1,00	1,11	0,96	1,07
D. Estándar (DE)	0,19	0,33	0,04	0,20	0,20
Error E. (EEM)	0,13	0,23	0,03	0,14	0,15

Tabla XCI: Efecto proliferativo de la suspensión de composite Pekalux

Dilución	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
Media(M)	2,32+	2,61+	2,60+	2,53+	0,30
D. Estándar (DE)	1,01	0,47	0,82	0,70	---
Error E. (EEM)	0,71	0,33	0,58	0,59	---

Tabla XCII: Efecto proliferativo de la suspensión del sellador Delton

Dilución	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
Media(M)	1,88+	3,36+	4,39+	3,61+	2,75+
D. Estándar (DE)	0,35	0,54	0,93	0,04	0,32
Error E. (EEM)	0,28	0,44	0,81	0,03	0,23

Tabla XCIII: Efecto proliferativo de la suspensión de Delton tratada con CIH 1N

Dilución	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
Media(M)	1,50	3,72+	4,62+	0,30	0,30
D. Estándar (DE)	0,20	0,61	0,89	---	---
Error E. (EEM)	0,15	0,50	0,70	---	---

Tabla XCIV: Efecto proliferativo de la suspensión de Delton tratada con NaOH 1N

Dilución	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
Media(M)	4,72+	4,64+	5,05*	1,16	0,30
D. Estándar (DE)	0,93	0,91	1,20	0,19	---
Error E. (EEM)	0,85	0,80	0,90	0,13	---

10. EFECTO SOBRE LA PROLIFERACION DE MCF7 DE LAS MUESTRAS DE SALIVA

Una vez comprobado por HPLC la presencia de monómeros y oligómeros en la saliva de los pacientes tratados con selladores de fisuras se ha procedido a comprobar el efecto proliferativo de las muestras en el test E-SCREEN. Las salivas del grupo A resultaron negativas para cualquier dilución. Los resultados obtenidos en el ensayo para las salivas del grupo B en diluciones 1/10 y 1/50 se recogen en la tabla XCV. En dicha tabla se señalan con el signo "+" los resultados estadísticamente significativos frente al control ($p < 0,01$).

Tabla XCV: Efecto proliferativo de las muestras de saliva ($x \pm \sigma$) del grupo B

Nº MUESTRA	FACTOR DE DILUCION	
	SALIVA	
	1/10	1/50
1	2,80±0,50+	5,76±1,20+
2	3,50±0,70+	4,96±0,95+
3	1,10±0,52	0,90±0,45
4	3,75±1,02+	2,38±1,00+
5	1,40±0,61	2,34±0,69+
6	1,60±0,01	1,36±0,24
7	1,34±0,32	1,23±0,25
8	0,96±0,40	1,68±0,79
9	1,20±0,39	1,10±0,62
10	1,49±0,25	1,20±0,38
11	1,31±0,39	1,78±0,45
12	2,67±0,46+	2,97±1,63+
13	4,43±1,33+	3,75±0,64+
14	4,19±1,37+	2,73±1,90+
15	2,96±0,54+	1,61±0,59
16	3,60±0,28+	2,54±1,23+
17	1,03±0,25	0,98±0,15
18	1,30±0,42	1,10±0,25
19	2,89±0,98+	1,96±0,96+

DISCUSSION

DISCUSION

XENOBIOTICOS ESTROGENICOS

Una gran variedad de compuestos químicos con estructuras moleculares muy diversas tienen actividad estrogénica, esto es, mimetizan la acción de las hormonas ováricas cuando son administrados a la hembra ovariectomizada. La procedencia de tales compuestos es muy variada pues en unos casos son de origen natural y en otros han sido sintetizados por la industria química.

La demostración de la actividad hormonal estrogénica en tan amplio grupo de compuestos químicos y de tan distinta conformación, ha hecho pensar que mediante la simple observación de la estructura molecular es imposible la predicción del carácter hormonal. Se ha señalado que quizás sea sólo la presencia de un grupo fenólico, o un grupo funcionalmente equivalente, el requisito imprescindible que comparten todos los compuestos químicos con tal actividad estrogénica. Este grupo de sustancias hormonalmente activas se conocen hoy día como xenoestrógenos.

Entre los estrógenos de origen natural se incluyen no sólo los compuestos hormonales producidos por el ovario de la hembra, sino también las sustancias sintetizadas por plantas y hongos, las cuales son identificadas como fito y micoestrógenos, respectivamente. Por otra parte, los estrógenos sintéticos tienen una procedencia y origen aún más variado, ya que puede tratarse de las hormonas sintéticas no esteroideas, como es el caso de los estilbenos, de derivados fenólicos como los alquifenoles, de compuestos bifenólicos o de una gran variedad de compuestos organoclorados algunos de los cuales son empleados, o han sido utilizados en el pasado, como pesticidas en las prácticas agrícolas.

Además de la diversidad estructural, otras dos observaciones de muy diferente índole pueden añadir complejidad al problema de los xenoestrógenos: i)

los tests de detección de la actividad hormonal, en sus diferentes formas (tests biológicos, tests "in vitro", tests de expresión génica) han demostrado la extraordinaria actividad de tales compuestos pues, en algunos casos, la actividad hormonal está presente en el rango de las concentraciones picomolares y nanomolares, y este rango de actividades cubre hasta concentraciones micromolares; y ii) una gran parte de los xenoestrógenos tienen carácter lipofílico, es decir, afinidad por el tejido y estructuras grasas, y por tanto resistentes al metabolismo y susceptibles de ser bioacumulados.

Es evidente que el objetivo principal de cualquier aproximación médica al problema de la exposición humana a los xenoestrógenos debería ser la evaluación de los efectos sobre la salud humana. Las tres observaciones indicadas en apartados anteriores (diversidad estructural, actuación a concentraciones realmente insignificantes y bioacumulación) no hacen sino dificultar cualquier estudio que persiga esa meritoria tarea.

Antes de iniciar cualquier diseño experimental para hacer una aproximación al problema, creemos que deberían ser consideradas las siguientes observaciones: i) Mientras que la exposición excesiva y aberrante a ciertos xenoestrógenos puede originar consecuencias graves para la salud, lo cierto es que la exposición a xenoestrógenos naturales endógenos o exógenos tiene carácter universal y es inevitable; ii) Los estrógenos -en el sentido más amplio- de orígenes diversos pueden ejercer sobre el organismo humano efectos benéficos o perjudiciales; iii) La acción de los xenoestrógenos puede ser específica y especialmente importante para ciertos órganos blanco/diana; y iv) Los xenobióticos estrogénicos pueden ejercer además de su acción hormonal otros efectos muy diversos no dependientes de su carácter estrogénico.

Durante años se han presentado informes sobre la impregnación animal y humana por compuestos químicos con actividad hormonal. Se ha especulado, además, con el origen de tal exposición y con las consecuencias biológicas del acúmulo de tales sustancias. Las pruebas más o menos claras de los efectos sobre salud humana y animal se han ido progresivamente acumulando y hoy día la

hipótesis que liga xenoestrógenos con los trastornos del desarrollo, reducción de la fertilidad, desmasculinización/feminización o, incluso, incremento en la frecuencia de presentación de ciertos cánceres hormonodependientes, ha dejado de ser una anécdota para convertirse en una de las más potentes asociaciones etiopatogénicas (Lancet, 1995).

El objetivo subyacente del presente trabajo es la identificación de nuevas fuentes de exposición humana a los xenobióticos estrogénicos. Para dar respuesta a tal compromiso: i) Hemos estudiado en profundidad la estrogenicidad de los composites y selladores usados de forma rutinaria en la práctica odontológica; ii) Hemos aislado, caracterizado e identificado los compuestos químicos responsables de tal actividad hormonal iii) Hemos probado que la saliva de los individuos tratados con tales productos dentales es activa en los ensayos biológicos de estrogenicidad y, por último, iv) Hemos identificado los monómeros presentes en la saliva responsables del efecto hormonal.

ANALISIS CROMATOGRAFICO DE LOS COMPOSITES Y SELLADORES DENTALES

Una vez revisados los antecedentes bibliográficos que hacen referencia a determinaciones de bisfenoles y moléculas afines, tal como se recoge en el capítulo "Introducción", se ha considerado conveniente, en este trabajo, el desarrollo y puesta a punto de un método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) que se adaptara estrictamente tanto a los productos puros como a las muestras que posteriormente iban a ser analizadas (composites, selladores y salivas). Por este motivo, se propone un método HPLC en fase reversa con una columna C-18 y un detector UV, fijando la detección a una longitud de onda de 280 nm. Esta longitud de onda parece la más adecuada, ya que los grupos funcionales presentes en las moléculas objeto de nuestro estudio absorben de modo más específico a dicha longitud, evitando así interferencias de otros monómeros. En este sentido cabe citar los trabajos de Ruyter y Oysaed (1987) y Munksgaard y Freund (1990) en los que se utilizan longitudes de onda de 210 y 215 nm, respectivamente para la determinación de BisGMA y TEGDMA, pero que

en ningún caso detectan otros monómeros de interés para nosotros, es decir, el resto de los derivados aromáticos BFA, BADGE o BisDMA. El método propuesto en el presente trabajo se ha desarrollado en gradiente con una duración total del cromatograma de 17 minutos, lo cual permite la elución de los productos BFA, EBFA, PBFA, BADGE, BisGMA y BisDMA con unos tiempos de retención comprendidos entre 2.76 y 10.3 min (Tabla III).

Cabría recordar que nuestro grupo de trabajo ya ha publicado la separación y determinación de BFA en muestras de alimentos con anterioridad al desarrollo de esta Tesis Doctoral (Brotons y cols, 1995). En ese momento, se consideró oportuno trabajar en fase directa utilizando como eluyentes disolventes apolares ya que se lograba muy buena resolución en la separación de pesticidas organoclorados y bisfenoles. Desde el punto de vista del trabajo actual, en el supuesto de haber utilizado esta técnica se habrían alargado los cromatogramas innecesariamente puesto que el BFA eluye con un tiempo de retención de 19,3 minutos en esas condiciones.

La cuantificación de los compuestos considerados de interés se ha llevado a cabo mediante el desarrollo de curvas de calibrado. Para ello, se han utilizado disoluciones de patrones puros a concentraciones comprendidas entre 10^{-3} y 10^{-7} M/l, método habitual en este tipo de estudios y puesto que el ajuste de las curvas presenta, en todos los casos, valores del coeficiente de correlación área de pico/concentración de $r=0.99$, no se ha considerado necesario la utilización de un estándar interno. Este hecho se confirma en la alta reproducibilidad del método, considerando valores medios de la curva de calibrado, como queda demostrado en el capítulo correspondiente del apartado "Métodos", (Tablas XVI-XXI). Para establecer los límites de detección y cuantificación del método cromatográfico propuesto se han seguido, para cada uno de los productos analizados, las directrices de la IUPAC. Los límites de detección están comprendidos entre 0,3 y 9,1 $\mu\text{g/ml}$, para el BisGMA y BADGE, mientras que los límites de cuantificación se sitúan entre 0,5 y 10,2 $\mu\text{g/ml}$ para estos mismos productos (Tablas VII y VIII).

Una vez puesta a punto la técnica cromatográfica para las disoluciones de patrones puros, se ha aplicado al análisis de muestras de composites y selladores en los que se presupone la presencia de BFA como monómero base, así como de los oligómeros BADGE, BisGMA y BisDMA, por ser productos basados en la resina BisGMA y haber sido estudiados previamente por autores como Vankerckhoven y col, (1981), Inoue y Hayashi, (1982), Hanks y col, (1991), Van Noorth, (1994). Por otra parte, las especificaciones comerciales de la composición de las resinas suelen expresar, aunque de forma escueta, cuál es la composición de la fracción orgánica del material. Afortunadamente, a partir de la entrada en vigor del Real Decreto 414/1996 de 1 de marzo, los fabricantes tendrán la obligación de detallar pormenorizadamente la composición de todos los materiales de uso en Odontología, lo que sin duda alguna, favorecerá la realización de estudios como el que aquí se presenta.

Las muestras de composites y selladores analizadas se han seleccionado al azar entre las productos comerciales de uso habitual con la única premisa de que en su composición el fabricante indicara que se trataba de resinas BisGMA. Así, se han analizado un total de 7 composites y un sellador, tal como queda recogido en el capítulo "Material" de esta Memoria.

Para dar respuesta al primero de nuestros objetivos, la demostración y confirmación de la migración de monómeros a partir de las muestras polimerizadas, se han realizado análisis tras la polimerización "in vitro" siguiendo las instrucciones del fabricante. Sin embargo, difícilmente se puede establecer el comportamiento del proceso de polimerización del material en estudio sin analizar, de forma comparativa el contenido de las muestras antes de su polimerización, tal como éstas se presentan en el preparado comercial. El planteamiento analítico se ha hecho, por tanto, a través de dos protocolos diferentes: análisis de las muestras antes y tras la polimerización "in vitro".

La revisión bibliográfica ha permitido conocer que con anterioridad a este trabajo se han utilizado diversos medios para el estudio de la forma y cuantía en que los monómeros eluyen a partir del material original. Es posible el uso como

medio de elución de metanol (Vankerckhoven y col, 1981; Taira y col, 1989) agua (Inoue y Hayashi 1982; Tanaka y col, 1991), agua/etanol (Pham y Ferracane, 1988; Ferracane, 1994), o incluso un simulador de una bebida tónica (Thompson y col, 1982). La elución en alguno de estos medios podría considerarse artificial debido al empleo de solventes orgánicos. El medio oral es fundamentalmente acuoso y suele fluctuar en un margen pequeño de pH y con variaciones de temperatura de varios grados en torno a 37 °C. Por ello, nuestro planteamiento inicial fue el de someter al composite, tanto sin polimerizar como polimerizado, para conocer las condiciones de partida del producto y la situación en la que se encuentra en su uso clínico habitual, respectivamente, a elución con agua destilada (pH próximo a 7) y 37°C. En una segunda aproximación se consideró imprescindible el someter la resina polimerizada a condiciones de temperatura y pH algo más forzadas con objeto de demostrar el efecto del estrés físico sobre la integridad del material. Por ello, cada muestra estudiada se ha analizado a dos niveles de temperatura, 37 y 100 °C, emparejadas con distintos valores de "pH" (1, 7, 9, y 12).

La utilización de agua como medio de elución conlleva unos niveles de extracción de monómeros inferiores a los obtenidos cuando el solvente es orgánico, condiciones en las que trabajan otros autores ya señalados. Esto trae como consecuencia que nuestros resultados pueden diferir, desde el punto de vista cuantitativo, de los presentes en la literatura. No obstante, la decisión de utilizar agua como medio, como ya se ha comentado, se basó fundamentalmente en el intento de simular el medio acuoso oral al que se exponen estos compuestos, sin forzar las condiciones de extracción, ya que se estima de más interés el comprobar la presencia y el consiguiente paso al medio, de determinados monómeros que realizar una cuantificación exhaustiva de su contenido.

Es importante la preparación de las muestras previa a su análisis, puesto que la eficacia de la reacción de polimerización, de la que depende en última instancia la cantidad de monómero libre que queda sin reaccionar, está regida por una serie de factores relacionados con la forma de preparación de las muestras (Koda y col., 1989). Por ello, en el diseño de los experimentos se incluyó la

estandarización de las condiciones de polimerización para conseguir que las distintas muestras comerciales estudiadas fueran evaluadas siguiendo un protocolo similar.

Ya ha quedado expuesto en el capítulo "Métodos" el control de factores tales como forma geométrica de la muestra, semejanza en el área de polimerización o distancia foco-muestra, sin olvidar otros parámetros que afectan en mayor o menor grado al resultado final, tales como tamaño de partícula y carga de la misma, color del material, calidad del foco de luz, fotoiniciadores, tiempo de polimerización etc. Algunas de estas variables han podido ser controladas en el trabajo; así todos los composites se seleccionaron en el mismo tono de color, la intensidad del foco de luz fue medida previa a su empleo, siendo controlada de forma periódica durante la realización del trabajo experimental. De igual forma, el tiempo de polimerización que recibieron las muestras fue idéntico (40 seg) en todos los casos. Tanaka y col. (1991) y Ferracane (1994) describieron diferencias significativas en la elución de monómeros cuando los tiempos de polimerización son variables en el rango de 30, 50 ó 60 seg. Nosotros hemos tomado 40 seg por ser éste el procedimiento estándar aceptado en la mayoría de los estudios clínicos y que coincide con las recomendaciones del fabricante. Por otra parte, el tamaño de partícula y el tipo y concentración del fotoiniciador vienen determinados por el fabricante, por lo que son variables que escapan al control de este trabajo, pero que posiblemente influyan en los valores de monómeros cuantificados y recogidos en las tablas de resultados.

El análisis de los composites y selladores se ha realizado, como ya se viene indicando, por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, con una columna C-18 y en gradiente. La cantidad de muestra inyectada ha sido de 20 μ l procedentes del sobrenadante de la suspensión en la que se encontraban las muestras, ya fueran polimerizadas o no. La cuantificación de los componentes eluidos se realizó ajustando siempre el volumen final a 1 ml. El análisis detallado de los cromatogramas generados permite identificar, a partir de los tiempos de retención, los componentes BFA, BADGE, BisGMA, BisDMA, EBFA y PBFA. Nuestro estudio, ha incluido la confirmación mediante Cromatografía de Gases y

Espectrometría de masas de todos y cada uno de los productos eluidos e identificados en los cromatogramas HPLC. En las figuras 45-47 se muestran los cromatogramas en CG y algunos de los espectros de los monómeros identificados en muestras de composites y sellador.

El comportamiento analítico de estos materiales difiere, el punto de vista cuantitativo, en función a las condiciones físicoquímicas a las que se sometieron las muestras. De una parte, hemos creído conveniente expresar los resultados en grupos en función de la polimerización y según el pH y la temperatura. Las tablas XXVII-XLII presentan la concentración media y la desviación estándar de cada uno de los monómeros eluidos por cada muestra de producto comercial y según las condiciones de trabajo a la que se han sometido las muestras. El análisis de los resultados permite indicar que el pH y la temperatura influyen en la elución de BFA, fundamentalmente en las muestras polimerizadas. Es patente la elevada elución de BFA en las muestras polimerizadas y sometidas calentamiento a 100 °C (Figura 34), mientras que es menor a 37 °C, temperatura a la cual se observa una clara influencia del pH: la elución de BFA se ve favorecida en el medio alcalino.

En las muestras sin polimerizar, de forma general, la elución de BFA es más constante en función al pH. Por ejemplo, tal como se aprecia en la tabla XXX sin polimerizar a 37 °C, salvo excepciones que se ponen de manifiesto en el análisis estadístico, la elución para el Charisma del BFA se mueve en un rango entre 155 y 179 $\mu\text{g/ml}$ o bien para el Tetric (Tabla XXXVIII), que oscilan entre 0 y 2,5 $\mu\text{g/ml}$. Aunque se han comentado, como más sobresalientes los datos obtenidos para el BFA, el comportamiento es muy similar para otros monómeros, si bien es interesante destacar que el BisDMA se presenta, para la mayoría de los composites, de una forma destacable, a pH francamente alcalino.

Los datos analíticos obtenidos se han sometido a un estudio estadístico para poner de manifiesto las diferencias existentes entre las distintas marcas comerciales y la influencia de las variables químicoanalíticas que han intervenido en la obtención de los resultados. El estudio estadístico se llevó a cabo en dos fases: un primer acercamiento puramente descriptivo, y que dio paso, posteriormente,

al estudio analítico comparativo de los resultados en función al comportamiento que presentan los composites sometidos a las diferentes condiciones experimentales.

La presencia de monómeros en el total de muestras analizadas se ha evaluado considerando, en primer lugar, la polimerización o no de los composites, en cuyo caso se observa un 90% de muestras positivas para el BFA entre las polimerizadas frente al 93% en las no polimerizadas, lo que demuestra la alta probabilidad que existe de encontrar un análisis positivo para la presencia de BFA eluído al medio, independientemente de las condiciones a las que sea sometida la muestra. En el otro extremo, se podría encontrar, desde este punto de vista, el BADGE, ya que sólo el 45,8% de las muestras polimerizadas estudiadas resultó positivo frente al 77,6% de las no polimerizadas. El resto de los monómeros, tal como se recoge en la tabla XLIV, presentan unos valores de positividad más bajos y más próximos entre las muestras polimerizadas y sin polimerizar.

En cuanto a la variable "Temperatura" para el total de las muestras analizadas, de nuevo no se observan grandes diferencias en cuanto al número de muestras positivas para el BFA. A 37°C el 89% de las muestras son positivas, frente al 94% de las que fueron sometidas a 100°C, independientemente del pH y de la polimerización. La temperatura, sin embargo, parece afectar de forma más patente a los demás oligómeros contituyentes. Cualquiera que sean las condiciones de temperatura y polimerización podría ser lógico esta alta presencia de BFA si se considera a esta molécula como el punto final de la degradación de los oligómeros principales.

En la misma línea, pero considerando sólo el pH como variable, se comprueba un ligero aumento de las muestras positivas para el BFA a medida que el pH se alcaliniza. Sin embargo, para el BisDMA, el número de muestras positivas a pH 12 supone un 49% de las analizadas frente al 22% registrado a pH 1. Los rangos de muestras positivas para el resto de los monómeros son bastante constantes e independientes del pH si bien, en todos los casos, a pH 12 el número de muestras que ceden monómeros al medio siempre es superior (Tabla XLVI).

El comportamiento global de las muestras de productos comerciales en estudio oscila entre unos márgenes no muy amplios, ya que el 73% de los análisis realizados para Brillant resultaron positivos al BFA frente al 100% de las muestras de Silux y Pekalux analizadas. Estas muestras, no obstante, no mantienen un comportamiento similar para el resto de los monómeros ya que mientras que el Pekalux resulta positivo para el 89,5% de las determinaciones de BADGE, el producto comercial que le sigue en elución para este monómero es el Delton con un 81,3% de las muestras analizadas. El resto de las marcas se mueven en unos rangos muy dispares en cuanto a la elución de monómeros (Tabla XLVII). Como era de esperar, y en función a la composición de cada una de las presentaciones comerciales analizadas, no siempre se van a encontrar los oligómeros que supuestamente pueden constituir estos composites. Así, las moléculas identificadas con frecuencias más bajas son propoxilato, que no se ha detectado nunca en Brillant, Polofil, Silux, y Tetric, y EBFA, que tampoco se ha identificado en Brillant, Charisma, Polofil y Z-100.

Una vez observado, desde el punto de vista estadístico, un panorama global de la presencia o ausencia de monómeros eluidos al medio, es importante comentar los resultados del análisis estadístico al comparar el comportamiento de los composites entre sí y en función a las variables polimerización, pH y temperatura, objeto de nuestro estudio. Referente a los resultados consignados en las tablas (XLIX-LXVII) sobre la liberación de componentes podría llamar la atención la magnitud de las desviaciones estándar obtenidas para los valores medios de cada uno de los monómeros valorados. Este dato es lógico, si se considera que se han evaluado conjuntamente todas las posibilidades de elución, y se debe tener en cuenta que desde el punto de vista químico, el pH o la temperatura pueden dar lugar a una agresión drástica permitiendo una elevada cesión al medio de un monómero mientras que el mismo composite, en otras condiciones físico-químicas, no presente ese nivel de elución para el monómero considerado, llegando incluso a ser 0. Así por ejemplo, en el análisis de Brillant, de las 24 muestras analizadas en total, se pueden encontrar valores comprendidos entre 0 y 231 $\mu\text{g/ml}$ para el BFA (Tabla XXVII), lo cual da lugar a un dato medio de $34,6 \pm 76,6$ (Tabla XLIX). Esta observación se repite en el resto de las marcas

comerciales y con respecto a todos los monómeros. Por tanto, si bien desde el punto de vista del estudio estadístico, estos valores son correctos y permiten una aproximación "global" para deducir las diferencias existentes entre los grupos experimentales considerados, desde un punto de vista estrictamente químico-analítico se deben expresar los resultados tal como se recoge en las tablas XXVII-XLII, en las que figuran los datos obtenidos experimentalmente en el análisis cromatográfico.

Del estudio estadístico recogido en las tablas LI-LXII en las cuales se expresan las medias y desviaciones de la concentración de monómeros eluidos al medio desde los distintos productos comerciales, así como la comparación entre estos valores, considerando las variables polimerización/temperatura y no polimerización/temperatura (Tablas LI-LIV) y de otra parte polimerización/pH y no polimerización/pH (Tablas LV-LXII) se deduce, al aplicar en la comparación global el test de análisis de la varianza, que en todos los casos aparecen diferencias estadísticamente significativas con valores de significación comprendidos entre $p < 0.05$ a $p < 0.001$. La comparación por parejas realizada mediante el test de Student Newman Keuls para $p < 0.05$ establece las diferencias entre marcas comerciales por monómeros. El valor específico de cada resultado está consignado en las tablas ya mencionadas.

Las tablas XLIX-L, LXIII y LXIV-LXVII recogen el estudio estadístico correspondiente a las variables físico-químicas a que se han sometido los diferentes composites. Es importante mencionar de forma aislada estos resultados ya que se refieren específicamente al estudio de la influencia de los factores que pueden ser establecidos por el analista al plantear un trabajo experimental. Las tablas XLIX y L hacen mención a la influencia de la polimerización en la liberación de monómeros, y de ella se deduce que en todos los análisis realizados se determina BFA en márgenes que van desde $5,5 \pm 6,7$ hasta los $65,4 \pm 115,1 \mu\text{g/ml}$, aunque el estudio estadístico aplicado no permite establecer diferencias significativas entre los composites analizados. En este sentido, se demuestra, como era de esperar, que el producto 8, el Delton, que es un sellador, presenta un nivel de BADGE muy superior a los composites estudiados; la explicación posiblemente se encuentre en

el hecho de que a igualdad de peso de producto analizado el contenido en material polimérico es superior en los selladores que en los composites. Los productos que presentan diferencias estadísticamente significativas para la elución de monómeros son el producto 3 (Pekalux) para BisGMA y BisDMA con mayores niveles de elución; el producto 6 (Tetric) que permite la determinación en niveles elevados de Etoxilato de BFA y por último, se comporta de forma apreciablemente diferente el producto 8 (Delton), tanto para el BADGE, ya comentado, como para el propoxilato de BFA.

Los productos analizados sin polimerizar (Tabla L), presentan de nuevo diferencias significativas cuando se comparan por parejas. Es interesante observar los elevados niveles de BFA encontrados y que incluso permiten establecer diferencias estadísticamente significativas para algunos productos comerciales como es el 5 (Silux) y 6 (Tetric) con valores medios de $177,3 \pm 298,3$ y $215,1 \pm 251,5$ $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

La tabla LXIII correspondiente al estudio estadístico de comparación de resultados de las muestras polimerizadas y sin polimerizar cuando se someten a elución en función a la temperatura del medio, independientemente del pH. Se observa la diferencia significativa que se presenta con respecto al BFA. En las muestras sin polimerizar existe mayor concentración media de este monómero, hecho que se repite para el BisGMA, mientras que para el BADGE y el BisDMA se presentan mayores niveles en las muestras sin polimerizar a 100°C .

Las tablas LXIV y LXV presentan el estudio estadístico considerando la liberación de monómeros en muestras polimerizadas a 37 y 100°C en función al pH. Se deduce con este análisis que el pH 12 afecta a la liberación de BFA y BisDMA sea cual sea la temperatura y aparece siempre un nivel, estadísticamente significativo y más elevado de estos productos. No parecen verse afectados los valores medios de BADGE y BisGMA por el pH y la temperatura.

De las tablas LXVI y LXVII "Muestras sin polimerizar a 37 y 100°C en función al pH", se deduce que no hay diferencias estadísticamente significativas

para ningún producto cuando se analizan a 37°C. Sin embargo a 100°C, el pH 12 permite una mayor presencia en el medio de BFA y BisDMA, posiblemente el aumento de BFA se debido a factores tales como la elución al medio junto con la hidrólisis de otros oligómeros, mientras que la presencia de BisDMA es posible que se deba a mayores niveles de extracción en estas condiciones de pH.

A modo de conclusión de este capítulo analítico cabe resaltar el hecho de que los componentes de los materiales dentales no son estables ya que, dependiendo de la agresión del medio siempre es posible poner de manifiesto la elución de monómeros en mayor o en menor proporción. Esta no es una observación original de este trabajo; la bibliografía aporta suficiente información en este sentido poniendo de manifiesto, de una parte, que el grado de polimerización no es del 100% y de otra, que las agresiones físico-químicas pueden dañar al producto ya polimerizado (Rueggeberg y Craig, 1988;). No hemos pretendido con el protocolo de análisis seguido, hacer una evaluación exhaustiva de los monómeros no reaccionados del material analizado, y que potencialmente eluirían al medio tras la polimerización, ni de aquellos que por alteración química o física de la red polimérica podrían irse liberando en el tiempo, ya que las resinas polimerizadas o sin polimerizar se han dejado en reposo, sometidas exclusivamente a las variables "Temperatura" y "pH" de forma que emigren al sobrenadante los monómeros sin someterlos a un tratamiento más drástico como sería la extracción con disolventes orgánicos. Pero nuestro trabajo ilustra con claridad la facilidad con la cual algunos componentes de los composites eluyen a partir del material original, lo cual obliga a considerar la exposición humana a tales compuestos y valorar sus efectos, tanto local como sistémicamente.

Si comparamos este estudio con los antecedentes bibliográficos existentes es conveniente hacer algún comentario sobre los monómeros encontrados así como los niveles establecidos. Generalmente los autores que trabajan en este campo se han limitado al análisis de las resinas composite para la identificación de BisGMA en el eluido, y a lo sumo, algún autor pone de manifiesto la presencia de BisDMA (Vankerckhoven y col, 1981). Es frecuente, así mismo, la identificación del trietilenglicol dimetacrilato (TEGMA) (Tanaka y col, 1991) en aquellos

composites que lo contienen. En general, el objetivo básico de estos trabajos ha sido la valoración de la fracción no polimerizada de la resina base tras el fraguado, principalmente por las repercusiones que trae consigo el déficit de polimerización. Por una parte, la falta de fraguado va en detrimento de las cualidades físico-mecánicas del material, y por tanto, empeora el comportamiento clínico del mismo. Por otra, en la práctica odontológica ha sido una preocupación constante, desde un punto de vista toxicológico, las repercusiones que la salida de monómeros desde el material puedan inducir sobre el tejido pulpar dental. Resulta extraña la parquedad de estudios referentes a la toxicología de los componentes de los materiales dentales referidos. Por esta razón, se hacen realmente oportunos los trabajos del grupo de Hanks y col (1991) y Jontell y col (1995) sobre la valoración de la citotoxicidad en cultivo de componentes habituales, BFA, BisGMA, BADGE, EBFA etc. de las resinas compuestas.

Es de interés, por tanto, el comentar la primicia que suponen los datos presentados en esta Memoria junto con la imposibilidad de contrastar los resultados con la bibliografía. Como referencia de la exactitud y reproducibilidad de los resultados habrá que remitirse a lo reseñado para el método analítico propuesto que demuestra claramente la fiabilidad del mismo cuando se trabaja con productos puros. Además la confirmación de la presencia de las moléculas encontradas ha quedado demostrada por CG/EM en todos los composites analizados.

DERIVADOS BIFENOLICOS CON ACTIVIDAD ESTROGENICA

Las resinas epoxi que contienen bisfenol-A como uno de sus componentes tienen múltiples aplicaciones por si solas o formando parte de los materiales plásticos (Paseiro y col., 1993). Así por ejemplo, este tipo de resinas se emplean en el recubrimiento interior de las latas de conserva y en materiales dentales, quirúrgicos o protésicos diversos. En este trabajo hemos demostrado que el bisfenol-A y el dimetacrilato de bisfenol-A, componentes de los composites y selladores basados en Bis-GMA y usados en Odontología, son estrogénicos y representan una forma adicional de exposición a los xenobióticos hormonales.

Nuestros resultados experimentales han confirmado la estrogénicidad del monómero bisfenol-A. El carácter hormonal de tal compuesto químico había sido puesto de manifiesto en 1936 por Dodds y Lawson en una corta presentación publicada en la revista *Nature*. Tal información se había visto confirmada en 1944 en otra publicación de Reid y Wilson y posteriormente, comentada en diversas ocasiones por aquellos investigadores que estudian mecanismos de acción hormonal (Gyglin y Leclercq, 1992) o metabolitos de algunos antiestrógenos (Jordan 1994).

A pesar del conocimiento de la estrogénicidad del bisfenol-A, durante todos estos años no se había asociado el carácter hormonal estrogénico de los derivados bifenólicos con su empleo creciente en la industria química de síntesis. Ha sido muy recientemente, en 1993, cuando se presenta el primer trabajo sobre la contaminación de cultivos de levaduras con un compuesto hormonal que finalmente es identificado como bisfenol-A (Krishnan y col., 1993). El origen de tal monómero resultó ser el policarbonato constituyente de los envases plásticos en los que se esterilizaba agua de forma rutinaria para preparar el medio de cultivo para las levaduras. El calentamiento del policarbonato provocaba la liberación del bisfenol-A desde las paredes del contenedor plástico al agua contenida. A raíz de tal informe, nuestro grupo tuvo la oportunidad de trabajar en la liberación de bisfenol-A a partir de las resinas epoxi empleadas en el recubrimiento interior de los envases de conservas metálicos (Brotons y cols. 1995). Se demostró que los alimentos contenidos en envases de conservas recubiertos interiormente con resinas epoxi podían resultar contaminados con el monómero bisfenol-A que eluía a partir de las paredes del envase en el momento de la esterilización de los alimentos.

La estrogénicidad de bisfenol-A fue demostrada mediante la aplicación del ensayo biológico E-SCREEN. Este test, de utilidad para la comprobación de la eficacia y la potencia estrogénica de cualquier compuesto bajo sospecha de tal actividad hormonal, ha sido suficientemente validado de tal manera que ocupa un lugar prominente entre los ensayos de estrogénicidad (Soto y col., 1991, 1995; Villalobos y col, 1995).

En el test E-SCREEN la potencia y eficacia proliferativa puede además ser confirmada por la capacidad de inducción génica. Así, en el presente trabajo hemos presentado, para cada uno de los compuestos estudiados, no sólo su habilidad para hacer proliferar las células estrógeno dependientes sino también la capacidad para inducir la síntesis del receptor de progesterona y la proteína estrógeno inducida pS2. Además del bisfenol-A, el dimetacrilato de bisfenol-A ha resultado ser estrogénico, como lo demuestran su capacidad para inducir la proliferación de las células MCF7 en el test E-SCREEN y la eficacia en la síntesis de las proteínas estrógeno inducidas pS2 y el receptor de progesterona (RPg).

El presente trabajo no se ha limitado a la demostración de la capacidad estrogénica haciendo uso de las células de cáncer mamario MCF7. Se ha estudiado, además, la afinidad de unión al receptor estrogénico de cada uno de los compuestos bifenólicos identificados en el análisis químico de los composites y selladores. Se ha podido demostrar, en este caso, la buena correlación existente entre la actividad proliferativa, inducción de proteínas estrógenos inducidas y la afinidad por el receptor de estrógenos, tanto para el bisfenol-A y sus derivados dimetacrilatos, como para aquellos compuestos sin actividad en el E-SCREEN que demostraron no tener afinidad por el receptor estrogénico.

Es interesante, a este respecto, resaltar un hallazgo experimental de nuestro trabajo. El oligómero BADGE resultó ser débilmente estrogénico a concentraciones 10 μM en el ensayo E-SCREEN. A pesar de ello, en los ensayos de competencia por el receptor estrogénico no se pudo poner de manifiesto capacidad alguna de desplazamiento de la unión del estradiol a su receptor específico. Esta disparidad entre ambos resultados podría tener una explicación sencilla si se consideran las condiciones en las que se desarrollan ambos tipos de experimentos. Mientras que en el ensayo de proliferación el compuesto químico a testar, en este caso BADGE, se encuentra disuelto en el medio de cultivo celular, a 37 °C, y por tanto sometido a la degradación química y metabólica de las condiciones de cultivo y la actividad enzimática de las células MCF7, en el caso de los test de competencia, éstos se realizan "in vitro" a 4°C durante 18 horas. Es posible imaginar que en el primero de los casos pueda ocurrir la transformación del BADGE en alguno de sus

componentes de menor tamaño, los cuales están dotados de actividad hormonal.

Por su parte, el oligómero Bis-GMA demostró no tener actividad estrogénica en el ensayo E-SCREEN en el rango de concentraciones ensayado, que llegó hasta 10 μ M. No obstante, tal compuesto, al igual que el BADGE, fue estrogénico tras tratamiento hidrolítico en medio ácido o básico. El análisis cromatográfico de las muestras hidrolizadas puso de manifiesto la presencia de bisfenol-A y de dimetacrilato de bisfenol-A, liberados del producto tras el tratamiento. Es cierto que esta forma de demostración de actividad hormonal de los constituyentes de los oligómeros Bis-GMA y BADGE puede ser calificada, cuando menos, de inapropiada aduciendo que tales circunstancias difícilmente van a darse "in vivo". Por esta razón, parece necesario comentar la información disponible sobre la degradación metabólica de los constituyentes de los composites y selladores basados en Bis-GMA.

Las vías metabólicas de degradación sistémica de algunas resinas epoxi y derivados bifenólicos han sido estudiadas en el ratón (Climie y col. 1981a y 1981b; Steiner y col. 1992). Así por ejemplo, se sabe que el BADGE es metabolizado mediante dealquilación oxidativa para dar un derivado fenol diol. Se ha prestado gran atención a los fragmentos de degradación de pequeño tamaño derivados de tal proceso metabólico debido al conocimiento de las propiedades mutagénicas de la porción de glicidilaldehído, hecho que ha motivado el olvido accidental de que el fragmento difenólico resultante podría estar dotado de actividad hormonal estrogénica.

También se ha estudiado la degradación de bisfenol-A por ciertas cepas bacterianas que utilizan este compuesto como fuente principal de carbono. Lobos y col. (1992) aislaron una especie bacteriana a partir del sedimento de los pozos de desagüe de la industria que trabaja en la síntesis de bisfenol-A y otros productos plásticos; el nuevo microorganismo es capaz de degradar bisfenol-A para dar el ácido 4-hidroxibenzoico y 4-hidroxiacetofenona --productos monofenólicos-- y el 2,2-bis(4-hidroxifenil)-1-propanol, y finalmente dar lugar a 2,3-bis(4-hidroxifenil)-1,2-propanodiol. La estrogénicidad de tales compuestos no ha sido estudiada pero

dada la similitud del último compuesto indicado, el cual posee la estructura característica de los estilbenos, como el potente estrógeno sintético dietilestilbestrol, tal estudio bien merece ser realizado con profundidad y urgencia.

Es evidente, en definitiva, que nuestro trabajo va más allá de la confirmación inocente de que el bisfenol-A es estrogénico en un determinado ensayo biológico, en nuestro caso en test de estrogenicidad E-SCREEN. Se trata de una prueba clara de exposición humana de forma selectiva a un compuesto químico dotado de actividad hormonal. Presenta además una peculiaridad propia y extremadamente preocupante. Hasta la fecha los informes sobre la exposición humana a los xenoestrógenos se limitaban a describir ya sea las fuentes de exposición o la presencia de algunos xenoestrógenos, fundamentalmente residuos de pesticidas organoclorados, en alimentos destinados a consumo humano.

A pesar del acúmulo de datos experimentales el hecho de que la exposición descrita es de carácter indirecto, esto es, sin relación entre el individuo que aplica el xenoestrógeno y el consumidor que lo recibe de forma inadvertida, tiene connotaciones de muy diversa índole: el desconocimiento de la exposición por parte del consumidor, la candidez por parte del aplicador. Con el trabajo que se presenta ahora, una gran responsabilidad recae sobre el cuerpo sanitario que emplea con carácter farmacológico un producto cuya actividad hormonal está comprobada y la fuente de exposición claramente identificada.

La identificación de componentes hormonales estrogénicos en los composites y selladores dentales, los cuales representan una fuente de exposición, obliga al que emplea tales productos a demostrar que de su uso no se derivan consecuencias deletorias para la salud humana. No se trata de una exposición casual, inadvertida y originada por un aplicador inconsciente. Estamos tratando de una aplicación médica, de carácter farmacológico, hecha por un profesional sanitario, responsable, por tanto, de la demostración de la inocuidad de todas y cada una de sus acciones y que ha ponderado el riesgo/beneficio derivado de su intervención.

Se han presentado informes demostrando la toxicidad de bisfenol-A para peces e invertebrados en el rango de concentraciones de 1,1 a 10 mg/l ($\geq 4 \mu\text{mol/l}$) (Alexander y col. 1988). En modelos de mamíferos, caso del ratón, el bisfenol-A induce una dermatitis de contacto de carácter fotoalérgico (Maguire, 1988). Además, si tal producto es administrado durante la organogénesis resulta ser tóxico para el feto en hembras preñadas. Un estudio sobre los efectos reproductivos de bisfenol-A demostró la reducción significativa del peso de las vesículas seminales y la caída en la motilidad espermática en los ratones machos tratados (Reed y col., 1985). Estos efectos fueron patentes tanto en los padres tratados como en las generaciones siguientes cuando la exposición se matuvo en unos niveles estandarizados (4.37 a 17.5 mg/kg de peso). Además, el tratamiento con bisfenol-A dio lugar a una reducción de carácter significativo en el número de crias por parto y en la viabilidad de éstas.

En el hombre se han descrito con frecuencia lesiones de muy diferente tipo tras la aplicación farmacológica o la exposición profesional a los composites. Así por ejemplo, se conoce que la aplicación directa de los composites sin una preparación adecuada puede dar lugar a lesiones irritativas (Stanley y col. 1979; Inoue y Hayashi, 1982). Aunque no se sabe a ciencia cierta cuál es el nivel de concentración a la que se produce la toxicidad celular directa en los tejidos "in vivo" (Hanks y col., 1991) se ha estimado que de siete componentes, entre los que se incluye bisfenol-A, la toxicidad "in vitro/en cultivo" se mueve en el rango 10-100 $\mu\text{mol/l}$ (Hanks y col. 1991). El sellador estudiado en nuestro trabajo resultó ser tóxico para las células MCF7 a concentraciones superiores a 50 $\mu\text{g/ml}$ ($\approx 200 \mu\text{mol/l}$ de bisfenol-A), aunque no se ha podido determinar cuál es el componente de la muestra de producto comercial responsable de la citotoxicidad.

ESTUDIO DE MONOMEROS EN SALIVA

En la actualidad está mundialmente aceptado el sellado de fisuras como procedimiento habitual para prevención de la caries dental, sobre todo en población en edad escolar (Ripa, 1993). Por esta razón, se eligió esta técnica en el diseño experimental de nuestro estudio clínico prospectivo, que utiliza una metodología rutinaria realizada por todos los dentistas del mundo y recomendada por las distintas organizaciones de salud (N.I.H., 1991)

La elección de un sellador descansa además en su propia composición y uso ya que, por una parte, carecen de carga mineral en la mayoría de las marcas disponibles comercialmente y, por otra, se aplican sobre una amplia superficie, lo que permite el intercambio con el medio oral y una fácil elución de monómeros a la saliva.

Finalmente, destacamos el hecho de que se trata de un procedimiento aplicado generalmente a un grupo de población muy amplio -niños en edad escolar- a nivel mundial y que desde un punto de vista toxicológico podría ser considerado de alto riesgo, por encontrarse en una etapa del desarrollo especialmente susceptible a la influencia de sustancias químicas con actividad hormonal, que pueden dar lugar a alteraciones en sus funciones biológicas.

Nuestros propios resultados experimentales nos han permitido conocer que a pesar de que las condiciones de polimerización eran las ideales, parece darse el caso de una polimerización incompleta, lo cual puede resultar en la migración de los monómeros residuales. Por esta razón, uno de los objetivos del presente trabajo era el investigar la presencia de estos monómeros en muestras de saliva de individuos expuestos a ellos a través de las restauraciones dentales.

Desde el punto de vista ético, no es criticable la realización de este estudio sobre un grupo de individuos sanos, ya que está debidamente estandarizado y aceptado el procedimiento odontológico; además se aplicó a individuos adultos a

los que previamente se informó del potencial riesgo y aceptaron voluntariamente colaborar en el trabajo.

Para llevar a cabo esta parte del estudio fue preciso la selección de personas sin tratamiento previo con composites y selladores. El estudio se ha realizado sobre 18 personas en edades comprendidas entre 20 y 24 años. La toma de las muestras de saliva se ha realizado de acuerdo con un protocolo diseñado por nosotros. El recipiente de recogida fue, en todos los casos, de vidrio para evitar interferencias en los análisis con algunos componentes del material plástico. La muestra se recogió sobre 5 ml de etanol haciendo escupir a los individuos seleccionados, durante una hora, antes de la colocación del sellador y en la propia consulta odontológica. Estas muestras se han identificado en el trabajo experimental como "muestras Grupo A". Una vez colocados los selladores y tras enjuagado con agua el paciente colectó la saliva durante la hora inmediata a la aplicación del sellador, en iguales condiciones que la primera vez, obteniéndose las "muestras del Grupo B". Las muestras clasificadas como "grupo C", se han recogido siguiendo el mismo protocolo de colección pero transcurridos 6 meses desde la colocación del sellador.

El tratamiento experimental de las muestras se realizó en las horas siguientes a la recogida, manteniéndose mientras tanto refrigeradas a 4°C. De esta forma se intentó prevenir la posible degradación de los monómeros, ya que tal como indican Baker y col (1988) la vida media de algunos de éstos a 37°C es de tan sólo 1,2 horas. El proceso a que se someten las muestras antes del análisis se ha intentado que fuese lo más cuidadoso posible en prevención de la degradación de los monómeros; por ello, sólo se ha filtrado a través de filtros de celulosa de diferentes tamaños de poro, con lo que se logra la eliminación de proteínas en los primeros pases e incluso, en la última filtración, se garantiza un medio suficientemente estéril como para poder realizar el estudio biológico. Las muestras filtradas se almacenaron congeladas a -20°C. Se consideró la posibilidad alternativa de separar la fase acuosa de los demás componentes de la saliva mediante centrifugación de forma similar al procedimiento descrito por Larsen y Munksgaard (1991), pero no aportaba ventajas analíticas y hacía preciso, como último paso previo al ensayo biológico, la filtración para mantener el medio estéril.

El análisis cromatográfico de las salivas se ha realizado aplicando la metodología desarrollada para los monómeros puros. La identificación de los productos presentes en la saliva se ha realizado de dos formas: a partir de los tiempos de retención en HPLC, ya que el método es suficientemente reproducible, como ha quedado demostrado en los primeros capítulos de la Memoria, y mediante CG/EM, lo que ha permitido la confirmación de la presencia de los monómeros.

Nuestros resultados experimentales nos han permitido demostrar la ausencia de los componentes de los composites y selladores en las salivas colectadas antes de la aplicación de estos productos. Podría haberse dado el caso de la existencia en saliva de algunos de los productos buscados y cuyo origen fuese diverso, como, por ejemplo, la ingesta alimenticia de productos contaminados con resinas epoxi. No obstante, la metodología empleada no ha detectado ninguno de estos productos en las salivas del grupo A.

En las muestras "grupo B", obtenidas tras la aplicación del sellador se ha podido cuantificar el nivel de BFA presente en todas las muestras analizadas, con unos valores que oscilan entre 3,3 y 30.0 $\mu\text{g/ml}$. De igual modo se han determinado los componentes BADGE, BisGMA y BisDMA en algunas de las muestras (Tabla LXIX). Estos datos confirman la elución de monómeros del sellador a la saliva, además de demostrar que el material no es totalmente inerte, hecho que, de una parte, se había comprobado al trabajar previamente con el material "in vitro" y, de otra, confirma lo publicado por numerosos autores que vienen demostrando que la polimerización del material no es completa en ningún caso. A este respecto, Ferracane y Condon, (1990) encuentran niveles de polimerización entre el 50-75% y Kildar y Ruyter (1994) sólo logran niveles máximos de polimerización del 70% en composites para "inlays" y "onlays" sometidos a un curado adicional en horno. Además ciertos trabajos demuestran la existencia de una capa superficial de material polimérico que se ve inhibida en su curación por la presencia de oxidantes, principalmente el oxígeno del medio (Underbrick y Muessner, 1995). Así, este factor, junto con los ya mencionados de polimerización incompleta, incluso en condiciones óptimas de trabajo, podrían explicar la presencia de monómeros libres en saliva en las primeras horas tras la

aplicación del sellador. Es lógico pensar que los datos recogidos en la bibliografía, e incluso los nuestros obtenidos en el estudio "in vitro" deben ser considerados como niveles mínimos de elución, ya que está demostrado que en boca las condiciones de trabajo nunca son las óptimas y perfectamente reproducibles de los estudios "in vitro". Nuestro trabajo aporta en este punto algunos datos nuevos como es el confirmar la presencia de monómeros procedentes del sellador, como es el caso del BFA y, en algunos análisis, también de BisDMA o BisGMA (tabla LXIX)

El estudio de las muestras "grupo C", correspondientes a los mismos individuos y recogidas seis meses después de aplicar el sellador, demuestra que vuelven a ser positivas para estos monómeros. La tabla LXX recoge los valores medios correspondientes a las salivas de este ensayo. Como era de esperar, los resultados no presentan una correlación lineal con los encontrados en un primer momento, pero confirman una degradación continuada en el tiempo del material expuesto al medio oral. Las diferencias en la identificación y, en su caso, en la cuantificación de los productos se puede justificar por variados motivos como son los factores químicos y biológicos a que se encuentran sometidos los selladores en los distintos individuos, desde temperaturas, pH, desgaste mecánico etc. A este respecto, son interesantes los hallazgos reseñados por Gee y Pallav (1994), quienes indican como agentes de gran influencia la dureza y textura de los alimentos. También pueden influir sobre la estabilidad del polímero la agresión química de los sistemas enzimáticos que forman parte de la saliva. Larsen y Munksgaard (1991) han realizado un amplio trabajo con voluntarios en el que comprueban el efecto sobre la degradación de los composites que ejercen las hidrolasas. Además justifican las variaciones en los resultados según que las muestras procedan de voluntarios controlados o bien de pacientes recogidas al azar, con el grado de higiene bucal, ya que, en determinados casos, no son despreciables los efectos que podrían causar las hidrolasas bacterianas. La variabilidad de los resultados de la muestra quedaría, por tanto, justificada por los distintos niveles de actividad enzimática entre los individuos así como por las lógicas diferencias entre el tipo y cantidad de flora oral. En cualquier caso, concluyen que se produce un auténtico reblandecimiento de la superficie de la resina composite.

Es interesante considerar que la mayoría de los estudios sobre elución de monómeros encontrados en la bibliografía, extrapolan los resultados obtenidos "in vitro" (curvas asintóticas con respecto al tiempo, en referencia a liberación de algún monómero) a lo que podría ocurrir "in vivo" pero no se ha hecho por el momento, a nuestro conocimiento, un análisis continuado y demostrativo "in vivo" de algo que se viene sospechando durante años (Ferracane, 1994; Munksgaard y Freund, 1990). A partir de estos hechos, una de las conclusiones a deducir es que tras demostrar el riesgo potencial, habría que poner en marcha estudios "in vivo" sobre la liberación de monómeros.

Abundando en la liberación continuada e indefinida de monómeros hay que citar los análisis realizados sobre los individuos de nuestra serie consignados como 19 y 20. Hay constancia de que el individuo 19 había recibido un sellador con anterioridad al inicio del protocolo experimental; no obstante, decidimos incluirlo como caso independiente de nuestra serie. Se recogió su saliva previamente a la aplicación del sellador, se analizó resultando positiva para la presencia de BFA (Figura 48) siendo confirmado posteriormente por CG/EM (Figura 49). Se le aplicó sellador en un total de 11 piezas, hasta igualarlo con los demás voluntarios del trabajo. De nuevo se analizó la saliva, siguiendo el protocolo de las muestras "grupo B" y de nuevo resultó positiva para los monómeros ya estudiados. Continuó incluido en el estudio y la muestra correspondiente a los seis meses (Grupo C) ha resultado así mismo positiva.

Respecto a la muestra 20 corresponde a un voluntario que había recibido tres años antes al inicio de este estudio selladores en un total de 5 piezas; con posterioridad hay constancia de no haber recibido otro tipo de composite. La saliva recogida en las condiciones establecidas en nuestro protocolo resultó positiva y cuantificable la presencia de BFA y BisDMA. La figura 50 corresponde al cromatograma obtenido por CG y los espectros de masas que identifican la presencia de ambos monómeros.

Si bien es discutible el reducido número de individuos incluidos en este trabajo desde un punto de vista estrictamente epidemiológico, lo que sí ha

quedado demostrado es el hecho real de la liberación de monómeros tras la aplicación de estos materiales dentales, así como la confirmación de que no son estables, como hasta ahora se había considerado por diferentes grupos de trabajo. Finalmente, y como última consideración destacar, como se pone de manifiesto en los trabajos de revisión de Ripa (1993), dos observaciones importantes: i) Los selladores han demostrado su eficacia para prevenir la caries dental en los niños. ii) Un porcentaje elevado se desprende con el paso del tiempo, cifra que puede llegar a cerca del 50% a los 4 años de su colocación.

En este trabajo, por tanto, hemos tenido la oportunidad de demostrar que el bisfenol-A está presente en la saliva de los individuos sometidos a tratamiento con un sellador empleado de forma estándar. La saliva colectada inmediatamente tras el tratamiento resultó ser estrogénica en el mismo ensayo biológico en el cual probamos la estrogenicidad de los monómeros constituyentes de los composites y selladores (Tabla XCV). Además hemos identificado en las salivas dotadas de actividad hormonal otro derivado del bisfenol-A y constituyente de los productos empleados en Odontología Restauradora como es el dimetacrilato de bisfenol-A. Mientras que el bisfenol-A se encontraba en todas las muestras de saliva analizadas, este último estaba presente en concentraciones detectables en tan sólo 3 muestras de las 18 analizadas. Ambos compuestos fueron determinados por Cromatografía HPLC, identificados en Espectrometría de Masas y la actividad estrogénica evaluada mediante el test biológico E-SCREEN

Nuestros resultados experimentales vienen a confirmar hallazgos presentados con anterioridad ante la comunidad científica por múltiples autores: i) El bisfenol-A es un compuesto químico dotado de actividad estrogénica en varios modelos biológicos. En el ensayo E-SCREEN es estrogénico a concentraciones 0,1 μM ii) El bisfenol-A es un componente habitual de los composites y selladores dentales. Nuestro estudio revela su presencia en todas las muestras de productos comerciales, tanto antes como tras la polimerización; iii) El bisfenol-A es identificado en la saliva de individuos tratados. La cantidad de bisfenol-A presente en saliva tras la polimerización "in situ" se mueve en el rango de 0.1 a 2% de la cantidad inicialmente aplicada.

EXPOSICION HUMANA Y RIESGO PARA LA SALUD

Tras este razonamiento cartesiano la pregunta es evidente ¿Que significa en términos de estrogenicidad la exposición inadvertida a través de la aplicación dental de los composites y selladores que liberan bisfenol-A?. Cualquier opinión a este respecto sería especulativa pues la información que se dispone sobre absorción intestinal, distribución intracorporal y vida media biológica del bisfenol-A es muy escasa. Tan sólo dos trabajos realizados sobre un modelo de ratón en 1981 por Climie y col (1981 a y b) pueden servir para ilustrar las vias metabólicas de degradación del BADGE. Es llamativo encontrar en tal estudio la descripción pormenorizada de la ruptura del enlace del grupo glicidil con el bisfenol-A y posterior degradación del radical epóxido. La razón de fijar la atención en esa parte concreta de la molécula deriva de las sospechas del efecto mutagénico del grupo epoxi, capaz de formar aductos con los radicales de adenina del DNA (Atkinson y Roy, 1995a y 1995b). El trabajo deja claro, por otra parte que el bisfenol-A se elimina rápidamente, ya que el curso de las 72 horas más del 85% del mismo se ha recogido parcialmente metabolizado -sulfo y glucoconjugado- en heces y orina. Desgraciadamente no se prestó atención a la captación específica del bisfenol-A sobre algún órgano estrógeno dependiente, posibilidad que no debe ser descartada si se tiene en cuenta la afinidad de esta molécula por el receptor estrogénico.

En nuestro trabajo hemos demostrado que durante la primera hora de colección de saliva tras la aplicación del sellador la cantidad de bisfenol-A recogida es del orden de los 200 μg (Tabla LXIX). Como bien se indica en el trabajo, bisfenol-A da una respuesta proliferativa total a una concentración de 0.1 μM , que corresponde a 22.8 $\mu\text{g/l}$, o lo que es lo mismo 22.8 ng en el 1-ml de medio de cultivo en el cual se mantienen las células MCF7. Esto significa que la cantidad de bisfenol-A colectada en la saliva inmediatamente tras la administración del sellador es 10.000 veces superior a la cantidad necesaria para hacer las células MCF7 proliferar, o dicho de otra manera, se trata de una dosis de estrógeno 10.000 veces superior a aquella que tiene efecto biológico de forma directa.

Si comparamos la potencia proliferativa de bisfenol-A y estradiol-17 β ,

podemos asumir que 22.8 $\mu\text{g/l}$ de bisfenol-A tienen el mismo efecto en el E-SCREEN que 2.72 ng/l de estradiol-17 β , es decir, que podríamos calcular qué concentración de bisfenol-A corresponde a una dosis equivalente de estradiol. En ese caso, será de interés conocer que la concentración media de bisfenol-A en saliva es de alrededor de 70 mg/l , es decir 30.000 veces superior a la concentración en que estradiol-17 β es efectivo.

Finalmente, es necesario advertir que el concepto de estrógeno débil, aplicado a bisfenol-A y otros xenoestrógenos, debe ser considerado con extraordinaria cautela. De una parte, por la habilidad que tienen algunos de éstos compuestos en bioacumularse al ser liposolubles. De otra, por la posibilidad de que sus efectos sean sumatorios o sinérgicos. La primera cualidad no es propia del bisfenol-A. No se conoce que exista un acúmulo contragradiante del compuesto en tejido adiposo. No ocurre lo mismo con el efecto aditivo, ya que se ha descrito muy recientemente (Soto y cols. 1995) que concentraciones subóptimas de varios xenoestrógenos pueden desencadenar una respuesta proliferativa total en el ensayo biológico.

En definitiva, lo que se quiere indicar es que si bien bisfenol-A es entre 1.000 y 10.000 veces menos potente que estradiol-17 β , las concentraciones a las que se encuentra expuesto el organismo humano tras determinados actos terapéuticos - uso de las resinas dentales- o hábitos alimenticios -consumo de alimentos impregnados con monómeros de resina- son lo suficientemente elevadas como para desencadenar "in vitro/en cultivo" una respuesta hormonal neta.

Si, como venimos comentando, el efecto en el organismo es aditivo o sinérgico, cabe hacerse la pregunta ¿Cuanto bisfenol-A es inofensivo?. ¿Que ocurre con el residuo de DDT, metoxicloro, endosulfán, dieldrín o toxafeno, pesticidas organoclorados de probada estrogenicidad, bioacumulados en grasa?. ¿Debemos de estar preocupados por la exposición concomitante a los alquilfenoles como el nonil u octilfenol?.

Muchas de estas preguntas no pueden ser contestadas en la actualidad,

Muchas de estas preguntas no pueden ser contestadas en la actualidad, pero nos obligan a considerar que en Salud Pública el principio de la Inferencia Causal y el principio de Precaución deben ser tenidos en cuenta, y aplicados cuando existan pruebas de orden biológico y analítico que demuestren la asociación entre la exposición a compuestos con una actividad determinada y con efectos biológicos potencialmente dañinos para la salud humana.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado un método original de Cromatografía Líquida de Alta Resolución, en fase reversa y con detector Ultravioleta, que ha permitido la determinación de Bisfenol A y sus oligómeros Etoxilato de BFA, Propoxilato de BFA, BADGE, BisGMA, y BisDMA, componentes habituales de resinas epoxídicas constituyentes de composites y selladores dentales.

2. El análisis cromatográfico de composites y selladores ha permitido la identificación y cuantificación de los monómeros citados, tanto en muestras sin polimerizar como polimerizadas. La confirmación de la presencia de estos componentes se ha realizado, en todos los casos, por Cromatografía de Gases y Espectrometría de masas. El 90% de las muestras analizadas resultaron positivas para el BFA, mientras que los otros componentes aparecían con una frecuencia promedio del 60%.

3. Mediante el estudio del efecto de las condiciones físico-químicas, temperatura (37 y 100 °C) y pH (rango 1-12) sobre la elución de los monómeros constituyentes de las resinas BisGMA, se ha demostrado que el medio alcalino favorece la elución de bisfenol A y dimetracrilato de bisfenol A.

4. Los composites y selladores constituidos mayoritariamente por el compuesto químico dimetacrilato del diglicidiléter de bisfenol-A (Bis-GMA), presentan estrogenicidad en un test biológico específico para la demostración de tal acción hormonal. Los componentes identificados que son responsables de tal efecto hormonal son el bisfenol-A y el dimetacrilato de bisfenol-A.

5. Tras la aplicación dental de las resinas BisGMA, se ha demostrado mediante HPLC y CG/EM la presencia de monómeros (BFA, BADGE, BisGMA y BisDMA) en la saliva recogida durante una hora después de su colocación. El bisfenol A fue también identificado en más del 50% de las muestras de saliva tomadas a los 6 meses del tratamiento. Esto permite concluir que estas resinas no

son estables y suponen una fuente permanente de exposición, al migrar parte de sus monómeros constituyentes al medio oral.

6. Las muestras de saliva colectadas durante una hora tras la aplicación del sellador que presentaban mayores concentraciones de los monómeros bisfenol A y dimetacrilato de bisfenol A, resultaron ser estrogénicas en el test E-SCREEN. Existe una buena correlación entre la cantidad de BFA cuantificada y la positividad en el test de estrogenicidad. La presencia de otros xenoestrógenos en saliva, en concentraciones biológicamente significativas, es descartada al demostrarse que la estrogenicidad está ausente en las salivas colectadas con anterioridad a la aplicación del sellador.

7. Ya que se ha demostrado la presencia de algunos de los monómeros estrogénicos en la saliva colectada en sujetos tratados seis meses después de la aplicación del producto odontológico, la exposición crónica a los componentes de los selladores y composites con actividad estrogénica debería ser considerada dentro del contexto global de la exposición a xenobióticos estrogénicos.

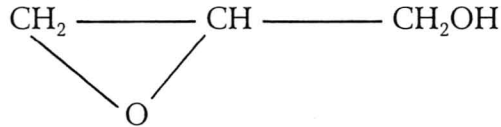
ANEXOS

ANEXO 1

FORMULAS QUIMICAS

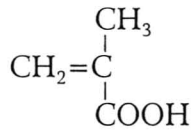
1. Alcohol Glicídico

(Pm = 74)



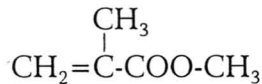
2. Acido Metacrílico

(Pm = 86)



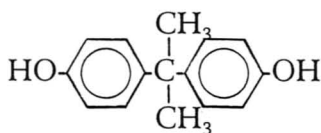
3. Metil metacrilato

(MMA)(Pm = 100)

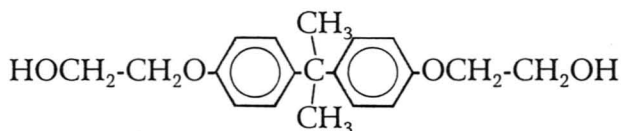


4. Bisfenol A

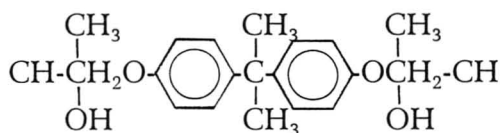
(BFA)(Pm = 228)

**5. Etoxilato de Bisfenol A**

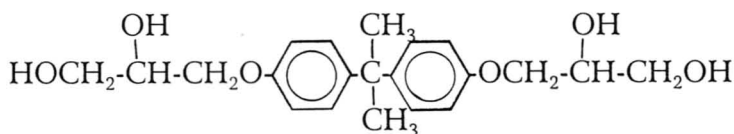
(EBFA)(Pm = 404)

**6. Propoxilato de Bisfenol A**

(PBFA)(Pm = 344)

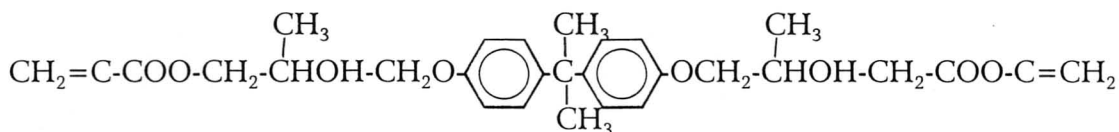
**7. Diglicidileter de BFA**

(BADGE)(Pm = 340)



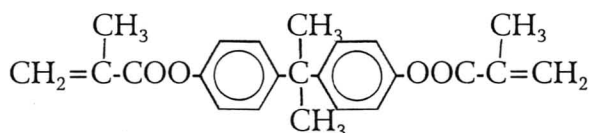
8. Glicidil Metacrilato de Bisfenol A

(BisGMA)(Pm = 514)



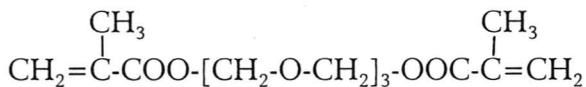
9. Metacrilato de BFA

(BisDMA Pm = 364)



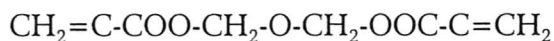
10. Trietilenglicol Dimetacrilato

(TEGDMA)(Pm = 302)



11. Etilenglicol Dimetacrilato

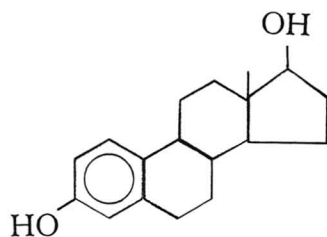
(EGDMA)(Pm = 214)



12. Dimetacrilato de Uretano



13. Estradiol-17 β



ANEXO 2

ABREVIATURAS EMPLEADAS

ADA: American Dental Association

BADGE: Diglicidil eter de Bisfenol A

BFA: Bisfenol A

BisGMA: Dimetacrilato del diglicidil eter de Bisfenol A

BisDMA: Metacrilato de Bisfenol A

CDHuS: Suero humano tratado con carbón dextrano

CDHuS-(PhR)DME: Medio de cultivo Dulbecco mínimo esencial sin rojo fenol y suplementado con suero humano tratado con carbón dextrano.

cels: Células

CG: Cromatografía de Gases

conc.: Concentración

CG/EM: Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas

CV : Coeficiente de variación

D.E.: Desviación estándar (σ)

Detec : Detectable

DES: Dietilelbestrol

DME: Medio de cultivo Dulbecco mínimo esencial

D.O.: Densidad óptica

DU: Dimetacrilato de Uretano

E₂: Estradiol-17 β

EDTA : Etilen diamino tetracético

EEM: Error estándar

EGDM: Etilenglicol dimetacrilato

EPR: Eficacia proliferativa relativa

EBFA : Etoxilato de Bisfenol A

ER : Error relativo

FBS: Suero fetal bovino

FR: Factor de respuesta

fmol: Fentomol

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

HuS : Suero humano

[M]: concentración molar (M/l)

mg: Miligramo

ml: Mililitro

MMA: Metil Metacrilato

MME : Medio Eagle Esencial Mínimo Modificado

Nº cels: número de células

PPR: Potencia proliferativa relativa

prot.: Proteína

PBFA : Propoxilato de Bisfenol A

RE: Receptor estrogénico

RPg: Receptor de progesterona

Rval (r^2): Coeficiente de correlación lineal

SRB: Sulforrodamina B

TEGMA: Trietilenglicol dimetacrilato

Tr: Tiempo de retención

UV: Detector Ultravioleta

v/v: volumen-volumen

x: Media

μ l: Microlitros

μ M: Micromolar

(+): Significación estadística $p < 0,01$

(*): Significación estadística $p < 0,001$

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Albers HF . Sistemas de resinas. En Odontología estética. 1ª Edición. Ed. Labor. Barcelona; 1988 ; pp.18-76.

Alen E, Doisy T. An ovarian hormone: preliminary report on its localization, extraction, and partial purification, and action in test animals. J Am Med Assoc 1923; 81: 819.

Astwood EB . Time relationships in the growth and water exchange of the uterus following estrogenic stimulation. Anat Rec 1938; 70: 5.

Aten RF, Eisenfeld AJ, Maclausky NJ, Hochberg RB. Separation of steroidal estrogens and their major unconjugated metabolites by high performance liquid chromatography. J Steroid Biochem 1982; 16: 447-449.

Atkinson A, Roy D. In vitro conversion of environmental estrogenic chemical bisphenol a to DNA-binding metabolites. Biochem Biophys Res Communicat 1995; 210: 424-433.

Atkinson A, Roy D. In vivo DNA adduct formation by Bisphenol A. Environ Mol Mutagen 1995b; 26: 60-66.

Austin AT, Basker RM . The levels of residual monomer in acrylic denture base materials. Br Dent J 1980; 149: 281-86.

Baker S, Brooks SC, Walker DM. The release of residual monomeric, ethyl methacrylate from acrylic appliances in the human mouth: An assay for monomer in saliva. J Dent Res 1988; 67: 1295-1299.

Baum L, Phillips RW, Lund MR. Tratado de operatoria dental. 2ª Ed. Interamericana. 1987. México.

Beck HN. Solubility characteristics of tetrabromobisphenol-A polycarbonate in various liquids. *Ind Eng Chem Res* 1992; 31: 2628-2631.

Bentley P, Bieri F, Kuster H, Muakkassah-Kelly S, Sagelsdorff P, Staubli W et al. Hydrolysis of bisphenol A diglycidylether by epoxide hydrolases in cytosolic and microsomal fractions of mouse liver and skin: inhibition by bisepoxycyclopentylether and the effects upon covalent binding to mouse skin DNA. *Carcinogenesis* 1989; 10: 321-327.

Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2496-2500.

Berthois Y, Dong XF, Martin PM, Cvitkovic E. Antagonism by suramin of the growth-inhibitory effect of hydroxitamoxifen and doxorubicin in human MCF-7 breast cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1438-1439.

Bond GP, McGinnis PM, Cheever KL, Harris SJ, Plotnick HB, Niemeier RW. Reproductive effects of Bisphenol A. 19th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 1980; Washington DC Paper n° 69. (Abstr.)

Bowen RL. Synthesis of a silica-resin direct filling material. *J Dent Res* 1958; 37: 90.

Branellec D, Decremoux P, Barreau P, Calvo F, Chouaib S. Tumor necrosis factor-mediated cell lysis in vitro: Relationship to cAMP accumulation and guanine nucleotide-binding proteins. *Eur J Immunol* 1992 22: 963-967.

Breslin WJ, Kirk HD, Johnson KA. Teratogenic evaluation of dyglycidil ether of bisphenol A (DGEBA) in New Zealand white rabbits following dermal exposure. *Fundam Appl Toxicol* 1988; 10: 736-743.

Bronzert DA, Triche TJ, Gleason P, Lippman ME. Isolation and characterization of an estrogen-inhibited variant derived from the MCF-7 breast cancer cell line. *Cancer Res* 1984; 44: 3942-3951.

Bronzert DA, Green GL, Lippman ME. Selection and characterization of a breast cancer cell line resistant to the antiestrogen LY 117018. *Endocrinology* 1985; 117: 1409-1417.

Brotons JA, Olea MF, Villalobos M, Pedraza V, Olea N. Xenoestrogens released from laquer coating in food cans. *Environ Health Perspect* 1995; 103: 608-612.

Brotons Oliver JA. Análisis químico y biológico (E-SCREEN) de contaminantes con actividad estrogénica. Tesis Doctoral. 1994. Universidad de Granada.

Browne RM. Animal tests for biocompatibility of dental materials. Relevance, advantages and limitations. *J Dent* 1994; 22 (Supl 2): 21S-24S.

Brunner N, Frandsen TL, Holst-Hansen C, Bei M, Thompson W, WakeLing AE et al. MCF7/LCC2: A 4-hydroxytamoxifen resistant human breast cancer variant that retains sensitivity to the steroidal antiestrogen ICI 182,780. *Cancer Res* 1993; 53: 3229-3232.

Bruze M, Almgren G. Occupational dermatoses in workers exposed to epoxy-impregnated fiberglass fabric. *Derm Beruf Umwelt* 1989; 37: 171-176.

Bumgardner JD, Lucas LC. Cellular response to metallic ions released from nickel-Chromium dental alloys. *J Dent Res* 1995; 74: 1521-1527.

Butler WB, Berlinski PJ, Hillman RM, Kelsey WH, Toenniges MM. Relation of in vitro properties to tumorigenicity for a series of sublines of the human breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Res* 1986; 46: 6339-6348.

Chevillat A, Blair O, Clarke R, Gelmann E, Kern FG. Regulation of epidermal growth factor receptor expression in MCF-7 cells EGFR transfectants. Abstract del 4th Annual Meeting on oncogenes. 1989.

Climie IJG, Hutson DH, Stoydin G. Metabolism of the epoxy resin component 2,2-bis[4-(2,3- epoxypropoxy)phenyl]propane, the diglycidyl ether of bisphenol A (DGEBA) in the mouse. Part I. A comparison of the fate of a single dermal application and of a single oral dose of ^{14}C -DGEBA. *Xenobiotica* 1981a 11: 391-399.

Climie IJG, Hutson DH, Stoydin G. Metabolism of the epoxy resin component 2,2-bis[4-(2,3- epoxypropoxy)phenyl]propane, the diglycidyl ether of bisphenol A (DGEBA) in the mouse. Part II: Identification of metabolites in urine and faeces following a single oral dose of ^{14}C -DGEBA. *Xenobiotica* 1981b 11: 401-414.

Correc P, Fondaneche MC, Bracke M, Burtin P. The presence of plasmin receptors on three mammary carcinoma MCF-7 sublines. *Int J Cancer* 1990; 46: 745-750.

Council on Dental Materials and Devices. Recommended standar practices for biological evaluation of dental materials. *JADA* 1972; 84: 382-387.

Cowan K, Aitaken SC, Goldsmith ME, Douglas E, Nienhuis AW, Lippman ME. Gene amplification and rearrangement in methotrexate resistant human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1982; 257: 15079-15086.

Craig RG. Restorative dental materials. 9^a Edición. Mosby. 1993. St. Louis.

Dahl JE, Becher R. Acute toxicity of carbamide peroxide and a commercially available tooth-bleaching agent in rats. *J Dent Res* 1995; 74: 710-714.

Dodds EC, Lawson W. Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* 1936; 137:996.

Feilzer AJ, De Gee AJ, Davison CL. Relaxation of polymerization contraction shear stress by hygroscopic expansion. *J Dent Res* 1990; 69: 36-39.

Ferracane JL, Condon JR. Rate of elution of leachable components from composites. *Dent Mat* 1990; 6: 282-288.

Ferracane JL, Condon JR. Post-cure heat treatment for composites: properties and fractography. *Dent Mat* 1992; 8: 290-298.

Ferracane JL. Elution of leachable components from composites. *J Oral Rehabil* 1994; 21: 441-452.

Freund M, Munksgaard EC. Enzymatic degradation of Bis-GMA/TEGDMA polymers causing decreased microhardness and greater wear in vitro. *Scan J Dent Res* 1990; 98: 351-357.

Fujisawa S, Imai I, Kojima K, Masuhara E. Studies on hemolytic activity of Bisphenol A Diglycidyl Methacrylate (Bis-GMA). *J Dent Res* 1978; 57: 98-102.

García Barbero J, Calderón García J. Odontología conservadora y estética. en *Manual de Odontología*. Masson 1ª edición. 1995 Barcelona pp. 645-665.

Gerberick GF, Ryan CA. A predictive mouse earswelling model for investigating topical photoallergy. *Food Chem Toxicol* 1990; 28: 361-368.

Goldberg M, Lasfargues JJ, Legrand JM. Clinical testing of dental materials. Histological considerations. *J Dent* 1994; 22 (Supl 2): 25S-28S.

Gottschlich R, Metzler M. High-pressure, reverse-phase partition chromatography separation of Diethylstilbestrol metabolites and analogs. *Anal. Biochem* 1979 92: 199-202.

Gyling M, Leclercq G. Estrogenic and antiestrogenic down-regulation of estrogen receptor levels: evidence for two different mechanisms. *J Recep Res* 1990; 10: 217-234.

Hanks CT, Craig RG, Diehl ML, Pashley DH. Cytotoxicity of dental composites and other materials in a new in vitro device. *J Oral Pathol* 1988; 17: 396-403.

Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res* 1991; 69: 1450-1455.

Harrison A, Huggett R. Effect of the curing cycle on residual monomer levels of acrylic resin denture base polymers. *J Dent* 1992; 20: 370-374.

Henriks-Eckerman ML, Laijoki T. Determination of oligomer 340 and polyamines in cured epoxy resins by extraction and high performance liquid chromatography. *Analyst* 1988; 113: 239-243.

Hensten-Pettersen A, Helgeland K. Sensitivity of different human cell lines in the biologic evaluation of dental resin-based restorative materials. *Scand J Dent Res* 1980; 89: 102-107.

Heppel SA, Denslow ND, Folmar LC, Sullivan CV. Universal assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. *Environ Health Perspect* 1995; 103 (Supl 7): 9-16.

Hongo T, Sato A. Simultaneous determination of leachable substances from denture base polymers. *J Dent Res* 1995; 74 Abs. n° 1478.

Hörsted-Bindslev P. Clinical testing of dental materials; general clinical aspects. *J Dent* 1994; 22 (Supl 2): 29S-32S.

Hume WR, Mount GJ. In vitro studies on the potential for pulpal cytotoxicity of glass ionomer cements. *J Dent Res* 1988; 67: 915.

Inoue K, Hayashi Y. Residual monomer (BisGMA) of composite resins. *J Oral Rehabil* 1982; 9: 493-497.

International Organization for Standardization. ISO 10993: Biological Evaluation of Medical Devices. London: ISO. 1992.

Jensen EV, Jacobson HI. Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog Horm Res.* 1962; 18: 387-414.

Jolanki R, Kanerva L, Estlander T, Tarvainen K, Kerkinen H, Henricks-Eckerman ML. Occupational dermatoses from epoxy resin compounds. *Contact Dermatitis* 1990; 23: 172-183.

Jontell M, Hanks CT, Bratel J, Bergenholtz S. Effects of unpolymerized resin components on the function of accessory cells derived from the rat incisor pulp. *J Dent Res* 1995; 74: 1162-1167.

Joost van T, Roesyanto ID, Satyawan I. Occupational sensitization to epichlorohydrin (ECH) and bisphenol-A during the manufacture of epoxy resin. *Contact Dermatitis* 1990; 22: 125-126.

Jordan VC. Metabolites of tamoxifen in animal and man: identification, pharmacology and significance. *Breast Cancer Res Treat* 1982; 2: 123-138.

Kanerva L, Jolanki R, Tupasela O, Halmepuro L, Kerskinen H, Estlander T, et al. Immediate and delayed allergy from epoxy resins based on diglycidyl ether of bisphenol A. *Scand J Work Environ Health* 1991; 17: 208-215.

Kaplan O, Navon G, Lyon RC, Faustino PJ, Straka EJ, Cohen JS. Effects of 2-deoxyglucose on drug-sensitive and drug-resistant human breast cancer cells: Toxicity and magnetic resonance spectroscopy studies of metabolism. *Cancer Res* 1990; 50: 544-551.

Karey KP, Sirbasku DA. Differential responsiveness of human breast cancer cell lines MCF-7 and T47D to growth factors and 17 β -estradiol. *Cancer Res* 1988; 48: 4083-4092.

Kawaguchi M, Fukushima T, Miyazaki K. The relationship between cure depth and transmission coefficient of visible-light-activated resin composites. *J Dent Res* 1994; 73: 516-521.

Kanawabe K, Tamura J, Yamamuro T, Nakamura T, Kokubo T, Yoshihara S. A new bioactive bone cement consisting of Bis-GMA resin and bioactive glass powder. *J Appl Biomater* 1993; 4: 135-141.

Kildar KK, Ruyter IE. How different curing methods affect the degree of conversion of resin-based inlay/onlay materials. *Acta Odontol Escan* 1994; 52: 315-322.

Koda T, Tsuchiya H, Yamauchi M, Hoshino Y, Takagi N, Kawano J. High-performance liquid chromatographic estimation of eluates from denture base polymers. *J Dent* 1989; 17: 84-89.

Koda T, Tsuchiya H, Yamauchi M, Ohtani S, Takagi N, Kawano J. Leachability of denture-base acrylic resins in artificial saliva. *Den Mat* 1990; 6: 13-18.

Korach KS. Editorial: Surprising places of estrogenic activity. *Endocrinology* 1993; 132: 2277-2278.

Kishnan AV, Starhis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D. Bisphenol A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 1993; 132: 2279-2286.

Laursen I, Briand P, Lykkesfeldt AE. Serum albumin as a modulator on growth of the human breast cancer cell line, MCF-7. *Anticancer Res* 1990; 10: 343-352.

Larsen IB, Munksgaard EC. Effect of human saliva on surface degradation of composite resins. *Scan J Dent Res* 1991; 99: 254-260.

Larroque M, Vian L, Blaise A, Brun S. Methodes de dosage des monomeres residuels des resines epoxydiques dans des simulants du vine. *J Chromatogr* 1988; 445: 107-117.

Lee SY, Greener EH, Mueller HJ. Effect of food and oral simulating fluids on structure of adhesive composite system. *J Dent* 1995; 23: 27-35.

Leinfelder KF. Posterior composite resins: The materials and their clinical performance. *JADA* 1995; 126: 663-676.

Leonessa F, Boulay WA, Thompson EW, Brunner N, Clarke R. The biology of breast tumor progression. *Acta Oncologica* 1992; 31: 115-123.

Liu E, Santos G, Lee WMF, Osborne CK, Benz CC. Effects of c-myc overexpression on the growth characteristics of MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene* 1989; 4: 979-984.

Llodra Calvo, J.C. Selladores de fisuras. en *Manual de Odontología*. 1ª edición. Barcelona. Masson. 1995. pp. 56-63.

Lobos JH, Leib TK, Su TM. Biodegradation of bisphenol A and other biphenols by a gram negative aerobic bacterium. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58: 1823-1831.

Maddedu L, Legros N, Decleeschouwer N, Bosman C, Piccart M, Leclercq G. Estrogen receptor status and estradiol sensitivity of MCF-7 cells in exponential growth phase. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988; 24: 385-391.

Maguire, HC Jr. Experimental fotoallergic contact dermatitis to bisphenol A. *Acta Derm Venereol* 1988; 68: 408-412.

Male reproductive health and enviromental oestrogens (Editorial). *The Lancet* 345: 933-935.

Manton DJ, Messer LB. Pit and fissure sealants: Another major cornerstone in preventive dentistry. *Aus Dent J* 1995; 40: 22-29.

Mc Cabe JF, Basker RM. Tissue sensitivity to acrylic resin. A method of measuring the residual monomer content and its clinical application. *Bri Dent J* 1976; 140: 347-350.

Mc Lachlan JA. Functional Toxicology: A new approach to detect biologically active xenobiotics. *Environ Health Perspect* 1993; 101: 386-387.

McLeskey SW, Honing S, Lippman ME, Kern FG. MCF-7 transfected with an expression vector for fibroblast growth factor 4 exhibit opposite responses to tamoxifen in vivo and in vitro. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1992; 33: 269.

Medina MB, Sherman JT. HPLC separation of anabolic oestrogens and ultraviolet detection of 17-beta oestradiol, zeranol, diethylstilboestrol or zearalenone in avian muscle tissue extracts. *Food Adit Contam* 1986; 3: 263-272.

Morrissey RE, George JD, Price CJ, Tyl RW, Marr MC, Kimmel CA. The

developmental toxicity of bisphenol A in rats and mice. *Fundam Appl Toxicol* 1987; 8: 571-582.

Müller J, Bruckner G, Kraft E, Hörz W. Reaction of cultured pulp cells to eight different cements based on glass ionomers. *Dent Mat* 1990; 6: 172-177.

Munksgaard EC, Freund M. Enzymatic hydrolysis of (di) methacrylates and their polymers. *Scan J Dent Res* 1990; 98: 261-266.

National Institute of Health. Seal out dental decay. Department of Health and Human Services. 1991; Publication n° 91-489.

Natoli C, Sica G, Natoli V, Serra A, Iacobelli S. Two new estrogen-supersensitive variants of the MCF-7 human breast cancer cell line. *Breast Cancer Res Treat* 1983; 3: 23-32.

Nawata H, Bronzert D, Lippman ME. Isolation and characterization of a tamoxifen-resistant cell line derived from MCF-7 human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1981; 256: 5016-5021.

Noort R van. Introduction to dental Materials. 1ª Edición. Mosby. 1994. London.

Olea N, Villalobos M, Ruiz de Almodovar JM, Pedraza V. MCF-7 Breast cancer cells grown as multicellular spheroids in vitro: Effect of 17 β -estradiol. *Int J Cancer* 1992; 50: 112-117.

Olea N, Pulgar R, Pérez P, Olea Serrano MF, Novillo Fertrell A, Pedraza V et al. Estrogenicity of resin-based composites and sealant used in dentistry. *Environ Health Perspect* 1996; 104: 298-305.

Osborne CK, Hobbs K, Trent J. Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast Cancer Res Treat* 1987; 9: 111-121.

Oysaed H, Ruyter IE, Sjøvik Kleven IJ. Release of formaldehyde from dental composites. *J Dent Res* 1988; 67: 1289

Paseiro LP, Paz AS, Vazquez OL, Simal LJ, Simal GJ. Determination of residual free monomers (m-xylylenediamine and bisphenol A diglycidyl ether) in the finished product. *J Chromat* 1991; 585: 75-81.

Paseiro LP, Simal LJ, Paz AS, Lopez MP, Simal GJ. Kinetic of the hydrolysis of Bisphenol F diglycidyl ether in water-based food simulants. Comparison with bisphenol A diglycidyl ether. *J Agric Food Chem* 1992; 40: 868-872.

Paseiro LP, Simal LJ, Paz AS, Lopez MP, Simal GJ. Kinetic of the hydrolysis of Bisphenol F diglycidyl ether (BADGE) in water-based food simulants. *Fresenius J Anal Chem* 1993; 345: 527-532.

Peristianis GC, Doak SM, Cole PN, Hend RW. Two-year carcinogenicity study on three aromatic epoxy resins applied cutaneously to CF1 mice. *Food Chem Toxicol* 1988; 26: 611-624.

Pham D, Ferracane JL. Leaching from light cured composites with variables degrees of conversion. *J Dent Res* 1988; 67: Abstr. n° 903.

Pham DC, Ferracane JL. Early elution of uncured components from light-activated composites. *J Dent Res* 1989; 68: 207 (abstr. n° 205).

Poirot M, Garnier M, Bayard F, Riviere I, Traore M, Wilson M et al. The anti-proliferative properties of 4-benzylphenoxy ethanamine derivatives are mediated by the anti-estrogen binding site (ABS), whereas the anti-estrogenic

effects of trifluopromazine are not. *Bichem Pharmacol* 1990; 40: 425-429.

Pourreau-Scheider N, Berthois Y, Mittre H, Charpin C, Jacquemier J, Martin PM. Estrogen response of MCF-7 cells grown on diverse substrates and in suspension culture: Promotion of morphological heterogeneity, modulation of progesterin receptor induction, cell-substrate interactions on collagen gels. *J Steroid Biochem* 1984; 21: 763-771.

Prevost G, Foehrle E, Thomas F, Pihan I, Weber N, Starzec A et al. Growth of human breast cancer cell lines is inhibited by the somatostatin analog BIM23014. *Endocrinology* 1991; 128: 323-329.

Rathburn MA, Craig RG, Hanks CT, Filisko FE. Cytotoxicity of a Bis-GMA dental composite before and after leaching in organic solvents. *J Biomed Mat Res* 1991; 25: 443-457.

Rathinam K, Mohanan PV. Skin sensitization study of a new Bis-GMA based dental restorative material. *Biomat Art Cell and Immob Biotech* 1993; 21: 91-96.

Real Decreto 211/1992 de 6 de marzo, sobre las listas permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo (BOE 72, de 24 de marzo de 1992).

Real Decreto 414/1996 de 1 de marzo, por el que se regula los productos sanitarios. (BOE nº 99 de 24 de abril de 1996).

Reed y col (1985), citados por Dutch Expert Committee on Occupational Standars. A Committee of the Health Council of the Netherlands. "Bisphenol A and its diglycidylether". 1995. Gezondheidsraad, Posthus 90517, 2509 LM Dem Haag.

Reid RE, Wilson E. The relation of estrogenic activity to structure in some 4,4'-dihydroxydiphenyl-methanes. *J Am Chem Soc* 1944; 66:967-8.

Reiner GCA, Katzenellenbogen BS. Characterization of estrogen and progesterone receptors and the dissociated regulation of growth and progesterone receptor stimulation by estrogen in MDA-MB-134 human breast cancer cells. *Cancer Res* 1986; 46: 1124-1131.

Resnicoff M, Medrano EE, Podhajcer OL, Bravo A, Bover L, Mordoh J. Subpopulations of MCF7 cells separated by percoll gradient centrifugation: A model to analyze heterogeneity of human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7295-7299.

Ripa LW. Sealants revisited: an update of the effectiveness of pit and fissure sealants. *Caries Res* 1993; 27: 77-82.

Roth F. Los composites. 1ª edición. Barcelona. Masson. 1994.

Rueggeberg FA, Craig RG. Correlation of parameters used to estimated monomer conversion in a light cured composite. *J Den Res* 1988; 67: 932-937.

Rueggeberg FA, Tamaresel K, Bowman B. Cross-linker and cure mode effect on conversion and resin leaching. *J Dent Res* 1994; 73: Abstr. n° 997.

Rufus IB, Shah H, Hoyle CE. Identification of fluorescent product produced by the thermal treatment of Bisphenol A-based polycarbonates. *J Appl Polymer Sci* 1994; 51: 1549-1558.

Schedl A, Samorapoompichit P, Rausch-Fan XH, Franz A, Füreder W, Sperr WR, et al. Response of L-929 fibroblas, human gingival fibroblast, and human tissue mast cells to various metal cations. *J Dent Res* 1995; 74: 1513-1520.

Schutze N, Vollmer G, Tiemann I, Geiger M, Knuppen R. Catecholestrogens are MCF-7 cell estrogen agonists. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1993; 46: 781-789.

Shortall AC, Harrington E, Wilson HJ. Light curing unit effectiveness assessed by dental radiometers. *J Dent* 1995; 23: 227-232.

Simal, GJ, Paz AS, Lopez MP, Paseiro LP, Simal LJ. Identification of RP-HPLC peaks of Bisphenol F and of Bisphenol F diglycidyl ether and its hydrolysis products by thermospray mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry. *Chromatographia* 1992; 34: 67-73.

Simal GJ, Paz, AS, Paseiro LP, Simal LJ. Determination of Bisphenols A and F in noncured epoxy resins by RP-HPLC-fluorescence techniques. *J Chromat Science* 1993; 31: 450-455.

Simonsen RJ. Fissure sealants and the preventive resin restoration on the NHS. *B Dent J* 1988; 6: 238-239.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Ins* 1990; 82: 1107-1112.

Slikker W, Lipe GW, Newport GD. High-performance liquid chromatographic analysis of estradiol-17 and metabolites in biological media. *J Chromat* 1981; 224: 205-219.

Soto AM, Sonnenschein C. The role of estrogen on the proliferation of human breast tumor cells (MCF-7). *J Steroid Biochem* 1985; 23: 87-94.

Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C. p-Nonilphenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ Health Perspect* 1991; 92: 167-173.

Soto AM, Lin TM, Justicia H, Silvia RM, Sonnenschein C. An "in culture" bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics (E-SCREEN) *Environ Toxicol* 1992; 21: 295-309.

Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Olea Serrano MF. The E-SCREEN as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspec* 1995; 103: 113-122.

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan MJ. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1973; 51: 1400-1413.

Stanley HR, Bowen RL, Folio J. Compatibility of various materials with oral tissues. II: Pulp responses to composite ingredients. *J Dent Res* 1979; 58: 1507-1517.

Steiner HR, Hönger B, Sagelsdorff P. Molecular dosimetry of DNA adducts in C3H mice treated with bisphenol A diglycidylether. *Carcinogenesis* 1992; 13: 969-972.

Sumitra D. Effects of certain dental materials on human pulp in tissue culture. *Oral Surg* 1981; 52: 76-84.

Sune Larsson K. Screening tests for systemic effects of dental materials. *J Dent* 1994; 22 (Supl 2): 12S-15S.

Swartz M, Phillips R, Clark H. Visible light-activated resins. Depth of cure. *J Am Dent Assoc* 1983; 106: 634-638.

Taira M, Urabe H, Wakasa K, Yamaki M. The effects of the photoinitiator concentrations on the curing behaviors of bis-GMA monomer. *Hiroshima-Daigaku-Shigaku-Zasshi* 1989; 21: 382-386.

Tanaka K, Taira M, Shintani H; Wakasa K, Yamaki M. Residual monomers (TEGDMA and BisGMA) of a set visible lighth-cured dental composite resin when immersed in water. *J Oral Rehabil* 1991; 18: 353-362.

Teng C. Mouse lactoferrin gene: A marker for estrogen and epidermal growth factor. *Environ Health Perspec* 1995; 103 (Supl 7): 17-21.

Tennant RW, Margolin BH, Shelby MD, Zeigler E, Haseman JK, Spalding J et al. Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays. *Science* 1987; 236: 933-938.

Tirtha R, Fan PL, Dennison JB, Powers JM. In vitro depth of cure of photo-activated composites. *J Dent Res* 1982; 61: 1184-1187.

Thompson LR, Miller EG, Bowles WH. Leaching of unpolymerized materials from orthodontic bonding resin. *J Dent Res* 1982; 61: 989-992.

Tscherne RJ, Capitano G. High-pressure liquid chromatographic separation of pharmaceutical compounds using a mobile phase containing silver nitrate. *J Chromat* 1977; 136: 337-341.

Tyas MJ, Browne RM. Biological testing of dental restorative materials. *J Oral Rehabil* 1977; 4: 275-790.

Unterbrink GL, Muessner R. Influence of light intensity on two restorative systems. *J Den* 1995; 23: 183-189.

Valenzuela Sánchez B. Determinación del efecto estrogénico de plaguicidas organoclorados. Tesis Doctoral. 1996. Universidad de Granada.

Vankerckhoven H, Lambrechts P, Van Beylen M, Vanherle G. Characterization of composite resins by NMR y TEM. *J Dent Res* 1981; 60: 1957-1965.

Vankerckhoven H, Lambrechts P, Van Beylen M, Davidson CL, Vanherle G. Unreacted methacrylate groups on the surfaces of composite resins. *J Dent Res* 1982; 61: 791-795.

Verbeke R. Sensitive multiresidue method for detection of anabolics urine and in tissues of slaughtered animals. *J Chromat* 1979; 177: 69-84.

Verbeke R, Vanhee P. Sensitive and specific post-column fluorimetric determination of diethylstilboestrol residues in extracts of urine and animal tissues at the 1-ppb level. *J Chromat* 1983; 265: 239-255.

Villalobos M, Olea N, Brotons JA, Olea MF, Ruiz de Almodovar JM, Pedraza V. The E-SCREEN Assay: A comparasion of different MCF-7 cell stocks. *Envirom Health Perspect* 1995; 103.

Vuillemin T, Raveh J, Stich H, Cottier H. Fixation of bone fragments with BIOCEM. First observations on humans. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1987; 113: 836-840.

Warfvinge G. Screening tests for sensitization potential of dental materials. *J Dent* 1994; 22 (Supl 2): 16-20.

Wataha JC, Hanks CT, Strawn SE, Fat JC. Cytotoxicity of components of resins and other dental restorative materials. *J Oral Rehabil* 1994; 21: 453-462.

Willems G, Lambrechts P, Braem M, Vanherle G. Los composites del siglo XXI. *Quintessence* (ed. esp.). 1995; 8: 351-367.

White KC, Cox CF, Kanka III J, Dixon DL. Respuesta pulpar a los sistemas de resina adhesiva aplicada a dentina vital grabada con ácido. Aplicación húmeda frente a seca del acondicionador. *Quintessence* (ed. esp.). 1996; 9: 17-27.

Wortberg B, Woller R, Chulamorakot T. Detection of estrogen-like compounds by thin-layer chromatography. *J Chromat* 1978; 156: 205-210.

Wu W. Degree of cure and wear resistance of dental composites. IADR abstract 192. *J.Dent.Res.* 1983; 62 : 671.

Yalon M, Goldberg EP, Osborn D, Stacholy J, Sheets JW. Polycarbonate intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg* 1988; 14: 393-395.

Yoshida K, Greener EH. Effect of photoinitiator on degree of conversión of unfilled light-cured resin. *J Dent* 1994; 22: 296-299.

Yourtee D, Eick D, Ahuang W, Cobb C, Bean T. Evaluation of polymeric restoratives and components as enzyme substrates. *J Dent Res* 1992; 71 277 (abst. nº 1369).

Yuferá EP. *Química Agrícola*. Madrid 1979. Alhambra.