

**UNIVERSIDAD NACIONAL
DE CÓRDOBA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
Cátedra de Histología “B”**

**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA y
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
Departamento de Histología**



“Efecto Citotóxico de los Sistemas Adhesivos Dentales. Estudio Microscópico y Microanalítico”

Tesis que presenta el licenciado D. Ismael Angel RODRÍGUEZ para optar al grado de Doctor.

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada por el Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III dentro del Proyecto titulado “Estudio de los efectos citotóxicos de los sistemas adhesivos dentales en operatoria dental e ingeniería tisular odontológica”-PI:031052.

La Tesis Doctoral ha sido realizada en el marco del programa de doctorado “Ingeniería Tisular en Medicina y Odontología” al amparo del Convenio de Colaboración existente entre la Universidad de Granada de España y la Universidad Nacional de Córdoba de Argentina de fecha 29 de Julio de 1999.

Granada, 11 de Febrero de 2005

D. Antonio CAMPOS MUÑOZ, Catedrático de Universidad del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina y de Odontología de la Universidad de Granada, España;

Dña. María Elsa GÓMEZ de FERRARIS, Catedrática de Universidad del Departamento de Histología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina;

D. Eduardo FERNANDEZ SEGURA, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina y de Odontología de la Universidad de Granada, España.

CERTIFICAN:

Que D. Ismael Angel Rodríguez, Licenciado en Odontología ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos de investigación correspondientes a su Tesis Doctoral “**Efecto Citotóxico de los Sistemas Adhesivos Dentales. Estudio Microscópico y Microanalítico**”, y que reúne las condiciones necesarias para su presentación y defensa.

Prof. D. A. Campos Muñoz

Prof. Dña. M.E. Gómez de Ferraris

Prof. D. E. Fernández Segura

Granada, 11 de Febrero de 2005

AGRADECIMIENTOS

Finalmente y después de algunos años, estoy escribiendo esta última página de mi tesis doctoral. Poder cumplir este sueño no ha sido solo fruto de la ilusión y el esfuerzo, sino también del apoyo inmenso de un grupo de personas muy especiales a quienes quiero dedicar estos agradecimientos.

En primer lugar quiero agradecer a mis tres Directores de Tesis por haberme enseñado a transitar en el campo de la investigación científica, pero además por haberme transmitido valores a través de sus ejemplos de vida; al Prof. Antonio Campos su pasión y valentía; a la Prof. María Elsa Ferraris su generosidad y lealtad; y al Prof. Eduardo Fernandez Segura su profesionalidad y seriedad en el trabajo. Me siento un afortunado al haber tenido la oportunidad de asomarme por un momento y ver el mundo desde la altura de estos gigantes.

Quisiera agradecer a todos los amigos del Departamento de Histología de Granada, al Prof. Vicente Crespo Ferrer por sus consejos académicos, al Prof. José Manuel García López por su ayuda informática, a la Prof. María Carmen Sanchez Quevedo por su colaboración y enseñanza en el laboratorio de microscopía electrónica, a María Ángeles Robles por su colaboración desde el laboratorio y a los Profesores Javier Cañizares García, María Agustias Cubero Sanchez y Francisco Revelles Marin por su cordialidad. No quiero olvidar a Guadalupe Martínez Poyatos por atender a todos mis pedidos de secretaría.

Destacar en este párrafo, toda la enseñanza y colaboración absolutamente desinteresada, como así también, la amistad que me brindó en estos años el Prof. Francisco Arrebola. No quisiera olvidar a Saloua, y agradecer su ayuda y la compañía en las largas horas de trabajo en el laboratorio.

A mis compañeros de Cátedra en Argentina, a Miriam, Adriana, Karina, Cecilia, Liliana, Gerardo, Lucas y Graciela por su compañerismo y sus consejos académicos.

Quisiera destacar también mi agradecimiento a la Comisión de Tesis en la Universidad Nacional de Córdoba, al Prof. Jorge Uribe Echevarría, a la Prof. Sofía Parisi de Fabro y al Prof. Octavio Alberto Lenta por sus sabios consejos que en el desarrollo de esta tesis.

Al Prof. Nazario Kuyumllian, Decano de mi Facultad, por el apoyo institucional y personal que ha sido permanente.

A las autoridades de la Universidad de Granada y de la Universidad Nacional de Córdoba por todo el trabajo que realizaron para que este Convenio y esta Tesis Doctoral sean un sueño transformado en realidad.

A la Prof. Alice Warley por incentivar me en el uso de la microscopía por energía dispersiva de rayos X, durante mi paso por su laboratorio en el King's Collage de Londres.

A mi amigo Gonzalo López por haber creído en nuestra amistad desde mis primeros tiempos en Granada, y a Pepe y Carmen por recibirme estos últimos años en su hogar y brindarme su respeto y todo su cariño.

Este párrafo, quisiera dedicárselo a la familia Campos y en especial a Menchu, por su protección en el seno familiar y por hacer que junto a sus hijos, Antonio y Fernando, me sintiera desde mis comienzos en Granada, como un integrante mas de esta hermosa familia.

Estas líneas son para la mujer que le da sentido a todo este esfuerzo, para vos....
María José.

Por último quisiera hacer una dedicatoria a mis compañeros de toda la vida. A mi hermano Aníbal: *"querido hermano, quiero que sepas que siento por vos una profunda admiración y espero podamos compartir, siempre con toda ilusión, muchos años de lucha"*. A mi hermana Soledad: *"decirte que me has dejado ese inmenso ejemplo de fortaleza"*. Y a mis queridos padres, Ismael y Kely: *"han sabido trasmitir el mejor ejemplo de esfuerzo, seriedad y amor. Gracias por todo, gracias por darme la vida y por ayudarme a sentir que merece ser vivida"*.

A mi familia

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Sistemas Adhesivos Dentales.....	2
1.2. Complejo Dentino-Pulpar.....	5
1.3. Citotoxicidad de los Sistemas Adhesivos Dentales.....	8
1.4. Mecanismo de muerte celular.....	9
1.4.1. <i>Apoptosis.....</i>	10
1.4.2. <i>Necrosis.....</i>	13
1.4.3. <i>El papel de los iones en la muerte celular.....</i>	15
1.5. Métodos de estudio de la citotoxicidad y viabilidad celular.....	18
1.5.1. <i>Métodos generales.....</i>	18
1.5.2. <i>Métodos de estudio de la Microscopía Electrónica Analítica.....</i>	21
1.6. Objetivos.....	23
2. Material y Métodos.....	24
2.1. Material y reactivos.....	25
2.1.1. <i>Material.....</i>	25
2.1.2. <i>Reactivos.....</i>	25
2.1.3. <i>Sistemas Adhesivos Dentales.....</i>	25
2.1.4. <i>Cultivo Celular.....</i>	26
2.2. Procedimiento experimental.....	26
2.2.1. <i>Tratamiento de células U937.....</i>	26
2.3. Evaluación de la integridad de la membrana celular: Ensayos de exclusión vital.....	27
2.4. Estudio Morfológico.....	28
2.5. Estudio Microanálisis por Energía Dispersiva de Rayos X.....	29
2.5.1. <i>Adhesión de las células U937 al soporte/sustrato.....</i>	30
2.5.2. <i>Eliminación del medio extracelular.....</i>	32
2.5.3. <i>Criofijación de las muestras.....</i>	32

2.5.4. Criodesecación de las muestras.....	32
2.5.5. Montaje y recubrimiento de las muestras.....	33
2.5.6. Instrumentación, parámetros analíticos y condiciones de observación.....	33
2.5.6.1. Observación de las muestras.....	34
2.5.6.2. Parámetros analíticos.....	34
2.5.7. Método de cuantificación para microanálisis por energía dispersiva de rayos-X con microscopía de barrido.....	34
2.5.7.1. Patrones y curvas de calibración.....	35
2.6. Tratamiento estadístico.....	37
3. Resultados.....	40
3.1. Efecto de los Sistemas Adhesivos Dentales sobre la viabilidad de la línea celular U937.....	41
3.1.1. Efecto de Single Bond (3M).....	41
3.1.2. Efecto de Prime & Bond NT (Dentsplay).....	42
3.1.3. Efecto de Syntac Sprint (Vivadent).....	43
3.1.4. Efecto de HEMA (2-Hidroxietilmetacrilato).....	45
3.2. Efecto de los Sistemas Adhesivos Dentales sobre la ultraestructura de la línea celular U937.....	47
3.2.1. Efecto de Single Bond (3M).....	47
3.2.2. Efecto de HEMA (2-Hidroxietilmetacrilato).....	49
3.3. Efecto de los Sistemas Adhesivos Dentales sobre la composición elemental de la línea celular U937.....	51
3.3.1. Análisis Cualitativo.....	51
3.3.1.1. Efecto de Single Bond (3M).....	51
3.3.1.2. Efecto de HEMA (2 Hidroxietilmetacrilato).....	52
3.3.2. Análisis Cuantitativo.....	54
3.3.2.1. Efecto de Single Bond (3M).....	54
3.3.2.2. Efecto de HEMA (2 Hidroxietilmetacrilato).....	65

4. Discusión.....	77
5. Conclusiones.....	98
6. Bibliografía.....	102

INTRODUCCIÓN

Cuando el Odontólogo considera la elección de un tratamiento, los procedimientos y técnicas a aplicar deben ir destinadas a generar beneficios y evitar daños. Para ello, es necesario que el profesional conozca no sólo el sustrato biológico sobre el cual debe actuar, si no también el comportamiento que poseen los distintos materiales que se utilizan en el proceso terapéutico. Los sistemas adhesivos dentales constituyen en nuestro día uno de los materiales más difundidos y utilizados en la práctica restauradora de la odontología. Su utilización y efectos no han sido del todo investigados, sobre todo en lo referente a la citotoxicidad de los mismos. (Bränström, 1981; Hanks et al., 1992; Costa et al., 1999; Bouillaguet et al., 2000 ; Uribe Echevarría et al., 2003 ; Costa y Hebling, 2003 ; Spagnuolo et al., 2004).

En la presente introducción describiremos las características generales de dichos adhesivos, el sustrato biológico dentino-pulpar objeto de protección por parte de estos materiales, así como las bases que sustentan el modelo de evaluación citotóxica de los adhesivos dentales que desarrollamos en la presente tesis doctoral. En un último apartado estableceremos los objetivos fundamentales a alcanzar en nuestro estudio.

1.1. Sistemas Adhesivos Dentales.

Los sistemas adhesivos dentales son materiales que se utilizan en la clínica odontológica con el objetivo de lograr restauraciones de mayor duración, menor filtración marginal, mayor conservación del tejido sano, obliteración de la estructura tubular dentinaria y disminución de la sensibilidad post operatoria. El uso de estos adhesivos facilita además la distribución del estrés oclusal sobre el material restaurador cuando es sometido a diferentes traumas y fuerzas procedentes de la masticación.

El desarrollo de los sistemas adhesivos dentales ha hecho posible una mejor adhesión de los materiales de obturación a las preparaciones cavitarias, adhesión que antes sólo se obtenía utilizando diferentes retenciones mecánicas (Costa, 1997). En general en la adhesión hay que distinguir dos grandes grupos, el primero destinado a obtener adhesividad a los tejidos dentales (esmalte y dentina) y el segundo encaminado a obtener adhesividad a las estructuras artificiales (metálicas, cerámicas y poliméricas) que se utilizan en la elaboración de restauraciones indirectas o aparatos protésicos (Henostroza, 2003).

Se reconoce universalmente a Michael Buonocore como el pionero en el ámbito de la adhesión dental, al haber propuesto en 1955 el tratamiento con ácido fosfórico en el esmalte, generando sobre el mismo un efecto desmineralizador a los fines de promover la adhesión adamantina. En 1962 Rafael Bower patenta la resina BISGMA (producto de la reacción entre un Bisfenol y el metacrilato de glicidilo) o lo que comúnmente se llamó la fórmula de Bowen, que constituye el origen de prácticamente todos los adhesivos poliméricos. Posteriormente Newman y Sharpe en 1966, eliminan el componente cerámico del citado material con la finalidad de reducir su viscosidad lo que da lugar a la aparición del primer adhesivo dental.

En relación a la adhesión a esmalte mínimas han sido las modificaciones al tratamiento original en las últimas décadas. Dichas modificaciones han consistido en variaciones de la concentración del ácido fosfórico (del 85% al 30% y 40%), en su tiempo de aplicación (de 60 seg. a sólo 15 seg.) y en su presentación comercial como gel. La retención micromecánica de las resinas sobre el esmalte producto de las irregularidades que el grabado ácido provoca sobre esta superficie ha determinado cierta estabilidad de la metodología a lo largo de todos estos años.

Con la adhesión a dentina se ha producido una mayor variabilidad en cuanto a los métodos empleados para lograr una segura y efectiva adhesión. Esto es así ya que como veremos con posterioridad la dentina presenta una estructura más húmeda que la del esmalte y en consecuencia los fabricantes han intentado elaborar adhesivos que puedan operar en ese medio. Sin embargo, a pesar de los grandes avances desarrollados aún no se ha logrado la meta final (Henostroza, 2003).

El importante desarrollo de los sistemas adhesivos ha generado sucesivamente varias generaciones de ellos con el objetivo de ir superando sus distintas limitaciones. La primera generación, a la que con anterioridad hemos hecho referencia, no poseía adhesión química a la dentina y el "smear layer", circunstancia esta que si presentaban los sistemas adhesivos dentales pertenecientes a la 2º generación como el (Scotch Bond (3M) y Prima Universal Bond (Dentstplay)) que llegaron a alcanzar los 4 o 5 megapascales (Mpa) (Leinfelder 1993). Aparecen posteriormente los sistemas adhesivos dentales de 3º generación (Scoth Bond 2, Prisma Universal 2 o Gluma) los cuales destacan por la incorporación de monómeros hidrófilos, principalmente el 2-Hidroxietilmetacrilato (HEMA). Esta incorporación permitió mejorar los niveles de adhesión hasta llegar a los 10 MPa. Los

sistemas adhesivos de 4º generación (All Bond 2 (Bisco), Opti Bond FL (Kerr), Pro Bond (Denstplay) Scotch Bond Multipropósito Plus (3M), Bond it (Jesenic), Syntac (Vivadent)) aparecen en 1990 con la novedad de la incorporación de una sustancia promotora de la adhesión llamado "Primers". Ya a mediados de los noventa se incorpora la idea del grabado total y la aparición entonces de los adhesivos de 5º generación que conlleva el acondicionamiento ácido no sólo de esmalte sino también de la dentina con lo que se llega a lograr una adhesión del orden de los 25 o 30 Mpa (Prime & Bond 2, 2.1 y NT (Denstplay), Optibond Solo , Plus (Kerr), Bond 1 (Jeneric), Syntac Single Component (Vivadent), Single Bond (3M). Con posterioridad se han desarrollado sistemas adhesivos dentales de 6º y 7º generación que tienden a simplificar la instrumentación por parte del Odontólogo incrementando las propiedades físico-químicas de los adhesivos (Van Merbeck, 2001). La verdadera revolución en los adhesivos poliméricos se producirá cuando se prescindan de ellos; es decir cuando un restaurador polimérico sea por sí mismo capaz de adherirse al sustrato dental (Henostroza, 2003).

Para poder entender las propiedades de los sistemas adhesivos dentales y optimizar su utilización es necesario conocer el fenómeno de adhesión dentinaria, el cual consta de las siguientes fases: acondicionamiento, impregnación y adhesión. El acondicionamiento tiene como finalidad el tratamiento de la dentina con diversas sustancias ácidas (ácido fosfórico, maleico y cítrico), las cuales generan un aumento de la rugosidad del sustrato, de esta manera se obtiene una superficie donde el material adhesivo queda más retenido y las fuerzas de adhesión pueden ser más elevadas. La impregnación es una fase que persigue como objetivo mejorar la humectabilidad de la superficie dentinaria mediante una sustancia llamada "Primers" o promotor de la adhesión. Los "Primers" son sustancias compuestas por monómeros hidrofílicos (HEMA, 4META, PMDM, NPG-GMA, etc) vehiculizados en agua o en un solvente orgánico como la acetona o el alcohol (etanol). En ocasiones los "Primers" contienen sustancias ácidas en su composición, por lo que entonces es posible que el acondicionamiento y la impregnación sean simultáneos. La adhesión tiene por objetivo lograr que el adhesivo se una a los monómeros que impregnan la dentina y a los componentes que forman parte del material restaurador. El adhesivo es un líquido que contiene fundamentalmente resinas hidrófugas como el BIS-GMA o UDM que van a interactuar con la matriz del material restaurador, y resinas hidrofílicas que van a interactuar con las existentes en el "Primers" (Abate, 1997).

Diversas técnicas en el modo del uso clínico de estos materiales han sido estudiadas a los fines de mejorar no sólo el resultado clínico de las restauraciones sino también el cuidado de la salud del complejo dentino pulpar, advirtiendo al respecto de esto último que la utilización de sustancias ácidas o primers-adhesivos sobre la dentina profunda o sobre pulpa misma pueden generar alteraciones en la misma (Costa, 1997; Costa y Hebling, 2003; Uribe Echevarría, 1999).

1.2. Complejo Dentino-pulpar

Para la utilización adecuada de los sistemas adhesivos dentales es necesario el conocimiento estructural y funcional del complejo dentino pulpar, sustrato donde tienen asiento dichos materiales y con los que va a interactuar en diferente grado. De la Dentina podemos decir que es una estructura compuesta por matriz mineralizada, en cuyo seno se encuentran los conductos o túbulos dentinarios. Los túbulos dentinarios son estructuras cilíndricas que se extienden por todo el espesor de la dentina; los mismos están recubiertos por una pared hipermineralizada llamada dentina peritubular. Por el interior de estos túbulos transcurren las prolongaciones citoplasmáticas de los cuerpos de los odontoblastos de la pulpa. Entre las prolongaciones odontoblásticas y la pared de los túbulos se encuentra un espacio llamado espacio periprocesal, el cual está ocupado por licor dentinario o fluido dentinario (Fig. 1).

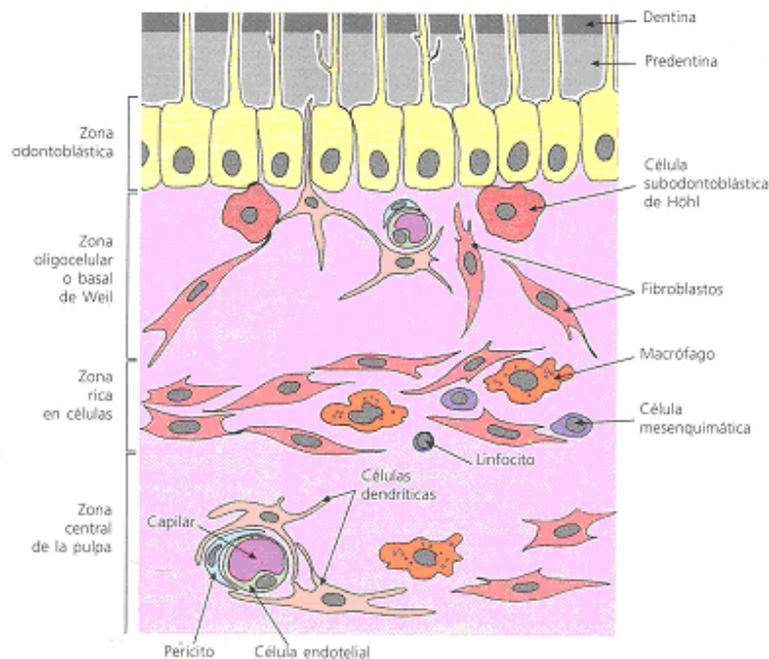


Fig.1. Complejo Dentino-Pulpar. Ferraris ME, Campos A (2002) *Histología y embriología bucodental*, 2nd ed, Editorial Medica Panamericana, Madrid.

El movimiento de este último en forma bidireccional permite nutrir la periferia de la dentina a través de la vía centrífuga y conducir los estímulos hacia la región pulpar a través de la vía centripeta. La presencia de túbulos determina que la dentina sea un tejido muy permeable, característica fundamental a tener en cuenta en los fenómenos de adhesión. El espesor de dentina peritubular aumenta con el transcurso de los años debido a su continua deposición interna, lo que favorece la disminución del diámetro interno de estos túbulos dentinarios. Asimismo se demostró, que en una dentina joven el espesor de la pared de estos túbulos en la zona próxima a la pulpa es de 400 nm y en la zona superficial es de 750 nm, por tanto el diámetro de los túbulos es mayor a 2,5 μm en la profundidad que en la zona cercana a la conexión amelodentinaria con un diámetro de 0,9 μm . En relación al número de túbulos se describe que existen 15.000 por mm^2 en superficie y de 45.000 por mm^2 en la profundidad de la dentina. (Kinney et al., 1996; Ferraris y Campos, 2002; Costa y Hebling, 2003).

Realizada la descripción histológica y química de la dentina, es necesario establecer también una clasificación histotopográfica de la misma; se consideran por tanto en la dentina la presencia de las siguientes zonas: a) La dentina de manto o palial que esta ubicada periféricamente y que es la que primero se forma, b) La dentina circumpulpar es el resto de la dentina producida y mineralizada, c) La predentina es una región de dentina sin mineralizar que posee un ancho de entre 20 y 30 μm y que esta situada entre los odontoblastos de la pulpa y la dentina circumpulpar. La presencia de esta última es importante ya que constituye una fuente de producción continua de dentina. Si la misma se calcifica completamente la dentina podría comenzar a ser reabsorbida por odontoclastos. Existen diferencias histoquímicas significativa en relación con estas zonas de la dentina en diferentes piezas dentarias (Sanchez-Quevedo et al., 1989).

En cuanto al tejido pulpar podemos decir que es un tejido conectivo de variedad laxa, ricamente vascularizado e innervado y que esta formado en un 75 % por agua y un 25 % de material orgánico. Esta última esta constituido por células y matriz extracelular. Las células específicas de este tejido que están situadas en su periferia, son los odontoblastos, cuyo cuerpo asienta en la pulpa y cuyas prolongaciones, transcurren por lo túbulos de la dentina (Fig. 1). Son las células que se encargan de producir dentina. Existe por debajo de la zona odontoblástica una zona llamada subodontoblástica u oligocelular de Weill que se caracteriza por poseer el plexo capilar subodontoblástico, el plexo reticular de Von Korff y el plexo nervioso de Raschkow. Subyacente a esta región existe una zona rica en células donde se destacan células ectomesenquimáticas que son las encargadas de reemplazar a

los odontoblastos o fibroblastos cuando el tejido los necesita. Debajo de la zona descrita existe la zona central de la pulpa que se caracteriza por ser una región típica de un tejido conectivo laxo que contiene fibroblastos, macrófagos, células mesenquimáticas, escasa cantidad de fibras en la matriz extracelular amorfa y abundantes vasos y nervios (Fig. 1). Este tejido pulpar, cuya función es el mantenimiento de la vitalidad del diente, puede sufrir distintas alteraciones como consecuencia de agresiones tanto exógenas (caries, traumatismo, materiales dentales) como endógenas y responde como tejido conectivo que es, desencadenando una reacción de tipo inflamatorio (pulpitis), y cuya primera fase consiste en una marcada dilatación y congestión vascular (hiperemia). Estos primeros cambios vasculares son reversibles si se eliminan el agente causal, pero de no ser así, el aumento de presión provocado por el edema subsiguiente a la hiperemia, en una cavidad prácticamente cerrada como es la cavidad pulpar, termina presionando las terminaciones nerviosas y produciendo dolor. Si esta presión se mantiene puede conducir a la necrosis del tejido pulpar (Ten Cate, 1986; Ferraris y Campos, 2002).

Durante el tallado cavitario se cortan miles de prolongaciones odontoblásticas a nivel de dentina, quedando posterior a este evento túbulos obliterados por una capa muy especial de dentina denominada "smear layer", conocida también con los nombres de capa dentinaria, untuosa, estirada o deformada, y con la característica de poseer una composición de fósforo y calcio similar a la de la dentina normal. La misma posee proyecciones intratubulares en la dentina llamada "smear plug". Esta capa funciona como un verdadero tapón biológico, ya que oblitera los túbulos y por tanto disminuye la permeabilidad dentinaria, la humedad superficial y cumple una función muy importante en la unión entre los adhesivos dentinarios y la dentina (Uribe Echevarría, 1990; 1996; 1997).

En relación a la permeabilidad dentinaria o transdentinaria se dice que es el movimiento del fluido dentinario a través de los túbulos, desde la pulpa hacia la unión amelodentinaria y viceversa, explicando por tanto el comportamiento de esta estructura como una bomba aspirante-impelente y que es la responsable del estímulo hidrodinámico. Por otro lado, se denomina difusión intratubular e intertubular, al flujo de sustancias exógenas o monómeros que se movilizan hacia el interior de la dentina (Pashley, 1996; Uribe Echevarría, 1997). Las características histológicas descritas determinan que existe una mayor permeabilidad cuando la preparación cavitaria alcanza áreas dentinarias profundas, donde se encuentra un sustrato dinámico y poroso, y donde existe un mayor número de túbulos por área. Es necesario destacar que la permeabilidad aumenta cuando se utilizan ácidos en el

acondicionamiento total de la dentina que eliminan el “smear layer” y “smear plug” y desmineralizan la dentina en profundidad. Por el contrario se presenta una menor permeabilidad cuando existe una esclerosis reactiva y esclerosis fisiológica, que disminuyen la luz de los túbulos; y cuando existe la presencia de “smear layer” y “smear plug” que oblitera dichos túbulos (Priotto et al., 1995). La permeabilidad dentinaria es un factor fundamental que debe ser tenido en cuenta para poder entender los diferentes comportamientos de la resistencia adhesiva de los sistemas adhesivos dentales y la posibilidad de generar daño sobre la pulpa si los mismos no son bien utilizados (Lutri, 1991; Priotto et al., 1996; Uribe Echevarría, 1997).

1.3. Citotoxicidad de los Sistemas Adhesivos Dentales

Escasas son las investigaciones desarrolladas en el área de la Biología Pulpar, y la literatura odontológica, a día de hoy, no ofrece datos significativos en cuanto a la compatibilidad biológica de los distintos materiales que se utilizan en la práctica clínica (Costa y Hebling, 2003). Dada la necesidad de establecer la biocompatibilidad de los materiales utilizados en la adhesión dental, entendida esta como la habilidad de un material para promover una respuesta biológica apropiada dentro de una determinada aplicación específica (William, 1987), distintas organizaciones como la *American Society for Testing and Materials* (ATSM), *American National Standards Institute/American Dental Association* (ANSI/ADE) han determinado la secuencia de pruebas que serían necesarias para evaluar los materiales dentales. Dicha secuencia establece los siguientes niveles: prueba inicial, secundaria y prueba de aplicación clínica.

Las “pruebas iniciales” incluyen los modelos para citotoxicidad in vitro, en la que los materiales han de ponerse en contacto directo con células cultivadas en laboratorio. A través de esta metodología puede evaluarse la morfología celular, las alteraciones en la síntesis de proteínas, la respiración mitocondrial (MTT assay), así como distintas actividades metabólicas y enzimáticas. Son pruebas económicas y rápidas que pueden fácilmente estandarizarse (Hanks et al., 1996; Costa et al., 2001). Asimismo este tipo de investigaciones evalúan la sensibilidad celular frente a los distintos materiales odontológicos y reducen por tanto la probabilidad de posteriores fracasos de biocompatibilidad en pruebas in vivo, las cuales resultan ser mas caras y demandar un tiempo mas prolongado.

Las “pruebas secundarias” consisten en evaluar las reacciones inflamatorias y/o inmunes provocadas por materiales odontológicos usando animales de experimentación. Dentro de estas pruebas destaca la “implantación”, que consiste en poner el material en contacto con un tejido semejante al que va a aplicarse en la terapéutica clínica.

Por último las pruebas de “aplicación clínica”, se realizan para evaluar los efectos de los materiales odontológicos sobre el tejido específico objeto de la aplicación terapéutica (Craig, 1997). Para ello se utilizan preferentemente primates y seres humanos. En las pruebas que utilizan animales para evaluar biocompatibilidad los resultados no pueden extrapolarse directamente a los seres humanos. En definitiva todo el desarrollo de estas pruebas de biocompatibilidad permiten evaluar con la máxima efectividad las propiedades de los materiales dentales con la única finalidad de evitar poner en riesgo la salud del paciente.

A pesar de todas las ventajas que nos han proporcionado los adhesivos dentales, diversos autores a través de estudios “in vivo” e “in vitro”, han demostrado que en general los componentes que forman estos materiales pueden ser de naturaleza citotóxica. Así componentes como el HEMA (hidroxietilmetacrilato), el BISGMA (bis-glicidil-metacrilato), el TEGDMA (trietilenglicoldimetacrilato), el UDMA (uretan-dimetacrilato), han sido analizados, en su actividad citotóxica, por separado o bien en forma combinada, en dosis y tiempos diferentes sobre distintas líneas celulares. Existen trabajos “in vivo” que aplican los sistemas adhesivos en contacto directo con el tejido pulpar con resultados variables (Hebling et al., 1999; Akimoto et al., 1999).

Ahora, si bien es conocido el efecto citotóxico de estos materiales cuando se ponen en contacto directo con la pulpa dental, estudios recientes (Bouilaguet et al., 2000; Kehe et al., 2001) afirman que los mecanismos específicos de muerte celular no son del todo claro. El efecto citotóxico de los sistemas adhesivos dentales constituye por ello una limitación todavía no resuelta en este tipo de terapia odontológica.

1.4. Mecanismo de muerte celular

En relación con lo indicado en el apartado anterior la evaluación de la citotoxicidad de cualquier sustancia, incluida los sistemas adhesivos dentales, exige un pormenorizado

conocimiento de los mecanismos de muerte celular y de la posible incidencia de la acción del agente tóxico sobre dicho mecanismo.

Se distingue clásicamente desde una perspectiva morfológica, biológica y molecular, dos tipos de muerte celular: apoptosis y necrosis.

1.4.1. Apoptosis

Desde las primeras descripciones de Virchow se reconoció un tipo de muerte celular: la necrosis. Sin embargo, a mediados del siglo pasado, Vogt (1842) describió un tipo de muerte celular con características morfológicas diferentes al estudiar la metamorfosis de anfibios. Todo esto hizo sospechar que existía un mecanismo diferente de muerte celular dirigido por la propia célula y distinto de la necrosis (Tabla I).

Kerr et al. (1972) describieron un tipo de muerte celular “por encogimiento” o “arrugamiento”, que acontecía en células aisladas y no se acompañaba de reacciones inflamatorias (Fig. 2). En un trabajo poco tiempo después, denominó por primera vez apoptosis a este proceso de muerte celular (Kerr et al., 1972) con el propósito de diferenciar este proceso de la necrosis, tipo de muerte celular que ocurría únicamente en situaciones patológicas.

La apoptosis o muerte celular programada, es un mecanismo de renovación celular regulado genéticamente, que ocurre durante el desarrollo embrionario, la homeostasis celular normal y de forma espontánea o inducida por fármacos. Su misión es eliminar las células superfluas y las dañadas, infectadas o transformadas, las cuales suponen un peligro para el organismo. Se caracteriza por unos cambios morfológicos típicos consistentes en la disminución del tamaño celular, un menor contacto intercelular, burbujeo de la superficie celular sin destrucción de la membrana celular, condensación nuclear con activación de endonucleasas endógenas, fragmentación y degradación del ADN internucleosomal en múltiples de 180-200 pares de bases y formación de vesículas que envuelven material intracelular conocidas como cuerpos apoptóticos (Fig. 2). A nivel bioquímico, se produce la translocación de la fosfatidilserina a la cubierta externa de la membrana plasmática, lo que permite el reconocimiento de estos cuerpos apoptóticos por células fagocíticas que segregan citoquinas que inhiben la inflamación. También ocurre la rotura específica de proteínas celulares, las mitocondrias dejan salir el citocromo c y se activan las enzimas

caspasas. Este proceso depende del ATP como suministrador de energía (Morris y Geller, 1996; Saura et al., 1997; Gill y Windebank, 1998; Pérez, 1998; Bal-Price y Brown, 2000; Jones et al., 2000; Blanco-Colio et al., 2000; Satry y Rao, 2000; Matsuo et al., 2001; González et al., 2001; Cummings y Schnellmann, 2002; Devarajan et al., 2002; Cascales, 2003; Ferrer et al., 2003).

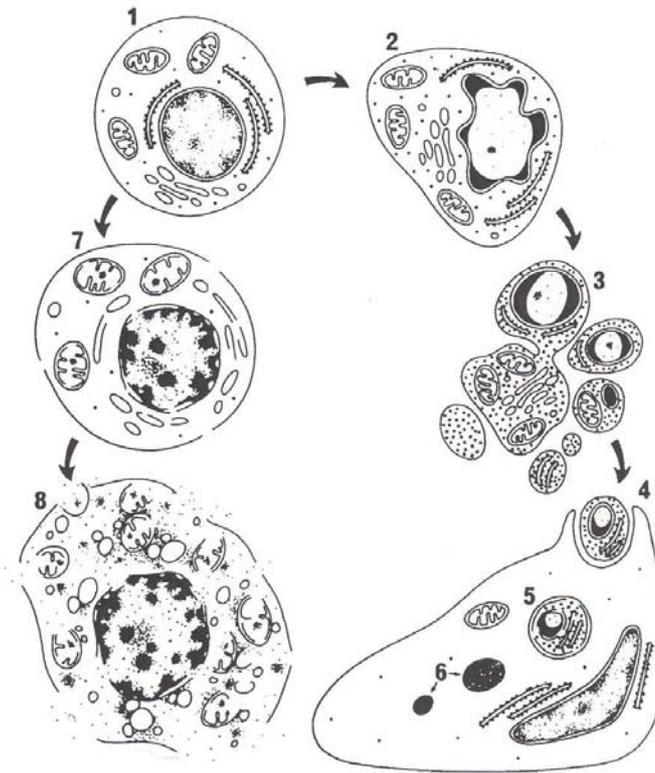


Fig.2. Secuencia de los cambios morfológicos durante el proceso de muerte celular por apoptosis y necrosis. (1), célula en el estado ortotípico. Los diferentes rasgos morfológicos que se aprecian en la célula cuando esta sufre apoptosis se resumen en: reducción del volumen celular y marginación de la cromatina nuclear (2), fragmentación del núcleo y aparición de cuerpos apoptóticos (3). Los cuerpos apoptóticos están fagocitados por macrófagos o células vecinas (4) que los degradan y los reducen a residuos irreconocibles (5 y 6). Por otra parte la ruta de muerte celular por necrosis se manifiesta por un agrupamiento aleatorio de la cromatina sin cambios radicales en su distribución, tumefacción de las mitocondrias, disolución de los ribosomas y roturas focales de la membrana (7). En los estadios más avanzados desintegración de los diferentes componentes celulares. (Esquema tomado de Kerr JFR et al., 1995).

Para que una célula sea inducida a morir por apoptosis, es necesario que dicha célula deje de recibir señales de supervivencia (factores de crecimiento, hormonas...) y comience a recibir señales de muerte. Las señales de muerte que conducen a la apoptosis son muy diversas: elevados niveles de oxidantes en el interior celular, lesión del ADN por oxidantes, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, fármacos quimioterápicos, etc., que se unen a receptores específicos en la superficie de la célula y transmiten señales para iniciar

el programa apoptótico (Cascales, 2003). Podemos distinguir varias fases en el proceso de apoptosis de la célula. La primera es una fase de “iniciación”, en la que se recibe un estímulo al que la célula puede responder de diferentes formas. La segunda es una fase efectora, en la cual el estímulo es integrado y se toma la decisión de “vivir o morir”. Se caracteriza por el aumento del contenido de calcio intracelular que origina la activación de endonucleasas y caspasas junto con cambios en el citoesqueleto. En la fase de ejecución o degradativa, que es irreversible, algunas proteínas son autodigeridas por las caspasas y el ADN es fragmentado por las endonucleasas, la cromatina se condensa y ocurren cambios marcados en el citoesqueleto. Por último, en la fase de eliminación, los macrófagos fagocitan los cuerpos apoptóticos, atraídos por ligandos específicos de la fosfatidilserina que se colocan en la superficie de las células apoptóticas (González et al., 2001; Cascales, 2003).

Tabla I: Características diferenciales entre la muerte celular por necrosis y apoptosis.

Características	Necrosis	Apoptosis
Morfológicas:		
Volumen celular:	-Aumenta	-Disminuye
Membrana plasmática:	-Se destruye	-Íntegra inicialmente
Mitocondrias:	-Se hinchan	-No se alteran generalmente
Núcleo:	-Cromatina basófila y núcleo cariolítico, picnótico o cariorrético.	-Condensación y marginación de la cromatina. -Fragmentación nuclear
Bioquímicas:	-Aumento de calcio libre citosólico. -Existencia de reacción inflamatoria. -Agotamiento de ATP. -Salida de potasio y entrada de sodio en la célula -Disminución de síntesis de macromoléculas -Degradación del ADN al azar.	-Aumento de calcio libre citosólico. -No hay reacción inflamatoria. -No agotamiento de ATP. -No cambios en la concentración de potasio -Activación de la síntesis de macromoléculas -Degradación del ADN en múltiplos de 180 pb. -División intranucleosomal. -Proteolisis de la lámina B. -Interacción entre bcl2/Bax.

Modificada de Blanco-Colio et al. (2000), Zabiti (2002) y Cascales (2003).

En la fase de ejecución, son degradadas de forma selectiva una serie de proteínas por las proteasas específicas cisteína-aspartato, también llamadas caspasas. Estas enzimas, se activan por el daño inducido por el cisplatino y provocan de forma irreversible la muerte celular por apoptosis. Se clasifican en tres grupos: *inflamatorio* que comprende las caspasas 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14, *iniciador* de la apoptosis (caspasas 2, 8, 9 y 10) y el grupo *efector* de la apoptosis (caspasas 3, 6, y 7). Las caspasas iniciadoras se activan después de un estímulo apoptótico por autoproteolisis. Las caspasas efectoras se activan por las iniciadoras en una cascada amplificadora. La activación de las caspasas es una etapa crucial para el inicio de la apoptosis, cualquiera que sea el estímulo. Son las verdaderas ejecutoras de la apoptosis (González et al., 2001; Cascales, 2003; Schloffer et al., 2003).

Cascales (2003) describe que la capacidad proteolítica de las caspasas activas conduce a la degradación de una serie de proteínas y lleva consigo las misiones siguientes:

- cortar contactos con células vecinas,
- reorganizar el citoesqueleto,
- activar las endonucleasas (fragmentación del ADN),
- dismantelar las láminas nucleares (condensación),
- expresar señales de fagocitosis (fosfatidilserina) y
- activar proteínas específicas para preparar a la célula para el cese de las funciones metabólicas.

1.4.2. Necrosis

La necrosis ha sido considerada como una muerte accidental de células expuestas a condiciones extremas en su entorno o daños genéticos (Cotran et al., 2000). Dicho termino hace referencia a un amplio espectro de cambio morfológicos que siguen a la muerte celular en el tejido vivo, derivados de la acción degradativa progresiva de las enzimas sobre la célula letalmente lesionada (Fig. 2). Asimismo, la necrosis ha sido definida desde una perspectiva morfológica y bioquímica como un mecanismo de muerte celular opuesto radicalmente a la apoptosis (Tabla I).

No obstante y a pesar del papel fundamental que juega la necrosis celular en la patología; los procesos moleculares que acontecen en su desarrollo permanecen todavía controvertido y poco claros. (Syntichaki y Tavernarakis, 2002)

De acuerdo con Cotran et al. (2000) y desde una perspectiva bioquímica, se pueden distinguir diferentes mecanismos comunes en la mediación de la lesión celular y muerte por necrosis de forma independiente al agente provocador. En este sentido cabe destacar:

-Agotamiento de ATP: el fosfato de alta energía en forma de ATP es necesario para muchos procesos sintéticos y degradativos de la célula que comprenden el transporte de membrana, la síntesis de proteínas y la lipogénesis. El ATP se produce por dos vías. La principal vía de producción de ATP es la fosforilación oxidativa del difosfato de adenosina (ADP), mediante una reacción que da lugar a la reducción del oxígeno por el sistema de transferencia de electrones de las mitocondrias. La segunda es la vía glucolítica, que permite la generación de ATP en ausencia de oxígeno al utilizar la glucosa. El agotamiento de ATP y la disminución de la síntesis de ATP son consecuencias frecuentes de la lesión isquémica y de la lesión tóxica.

-Oxígeno y radicales libres derivados del oxígeno: durante el proceso de reducción de oxígeno se puede formar especies reactivas de oxígeno, que son radicales libres que pueden alterar los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos. Las células poseen sistemas de defensa para impedir la lesión producida por estos productos. El desequilibrio entre los sistemas de generación de radicales libres y la eliminación de estos radicales produce estrés oxidativo, otro aspecto de la lesión celular.

-Calcio intracelular y pérdida de la homeostasis del calcio: el calcio libre citosólico (Ca^{2+}) se mantiene en concentraciones extremadamente bajas (< a 0'1 mM) en comparación con los niveles extracelulares (1mM aproximadamente). La isquemia y ciertas toxinas causan un aumento inicial de la concentración de calcio citosólico (Ca^{2+}) por afluencia neta a través de la membrana o liberación desde las mitocondrias o retículo endoplásmico (Cumming et al., 2002; Harriman et al., 2002). El aumento de Ca^{2+} se produce por aumentos inespecíficos de la permeabilidad de la membrana plasmática y activa a su vez las fosfolipasas, las proteasas, las ATPasas y las endonucleasas, que dan lugar a efectos celulares potencialmente nocivos. No obstante la pérdida de la homeostasis de Ca^{2+} no es siempre un acontecimiento inicial necesario en la lesión celular irreversible (Lemasters et al., 1987; Brecht et al., 1992).

-Defectos en la permeabilidad de la membrana: La pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana conduce a una importante lesión de la membrana y por consecuencia una

serie de acontecimientos que implican el agotamiento del ATP y la activación de las fosfolipasas modulada por el calcio (Bunnachak et al. 1994; Kristián y Siesjö 1998; Simbula et al., 1997; Cummings et al., 2000). Por otra parte la membrana plasmática puede ser lesionada por ciertas toxinas bacterianas, proteínas virales y diversos agentes físicos y químicos.

-Lesión mitocondrial irreversible: Las mitocondrias son objetivos importantes de la práctica totalidad de los estímulos nocivos. Las mitocondrias se pueden lesionar por el incremento del Ca^{2+} citosólico, por estrés oxidativo, por la fragmentación de los fosfolípidos a través de las vías de la fosfolipasa A_2 y de la esfingomielina. Frecuentemente, la lesión se expresa mediante la formación de un canal de elevada conductancia en la membrana mitocondrial interna, denominado transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT) (Aguilar et al. 1996; Petit et al., 1998; Minamikawa et al., 1999; Kowaltowski et al., 2001; Scheffler, 2001).

No obstante, hoy en día parece que las dos formas de muerte celular comparten características semejantes en las fases de desencadenamiento, señalización y progresión temprana. De hecho, muchos autores señalan evidencias de que la apoptosis y la necrosis representan solo el final de un amplio rango de muertes morfológicas y bioquímicas. La necrosis podría constituir únicamente una apoptosis abortada, que tiene lugar cuando los elementos del programa de muerte son inhibidos o cuando el daño es tan grande que las vías de señalización apoptótica no pueden ser terminadas. Los dos tipos de muerte celular pueden ocurrir en tejidos o cultivos expuestos al mismo estímulo y frecuentemente es la intensidad del estímulo inicial quien decide el tipo de muerte que sufre la célula. Existen muchos estímulos (virus, inhibición de la síntesis de proteínas, estrés oxidativo, hipoxia, radiación, glutamato y óxido nítrico) que inducen un tipo de muerte celular u otra en función de su intensidad (Leist y Nicotera, 1997).

1.4.3. El papel de los iones en la muerte celular

La concentración iónica intracelular se encuentra perfectamente regulada en la célula. Una de las manifestaciones más precoces y frecuentes de la lesión celular es la alteración de los diferentes iones y gradientes iónicos establecidos por la membrana plasmática. Esta alteración de la homeostasis iónica intracelular ha sido objeto de

numerosos estudios durante las dos últimas décadas en diversos modelos de lesión celular (Buja et al., 1993; Rosser y Gores, 1995; Yu et al., 2001).

El Ca^{2+} ha sido probablemente el ión mas investigado durante la lesión celular irreversible debido a su participación en numerosas funciones fisiológicas. No obstante su papel permanece aún debatido (Lemasters et al., 1987; Nicotera et al., 1989; Brecht et al., 1992; Bunnachak et al., 1994; Murata et al., 1994; Chen et al., 1999; Peña y Pilar, 2000; Scharikabad et al., 2001). El incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} ha sido demostrada en diferentes modelos experimentales de hipoxia-anoxia, estrés oxidativo y lesión tóxica (Lemasters et al., 1987; Griffiths., 1999; Peña y Pilar 2000). Dicho incremento puede deberse a una liberación desde los reservorios intracelulares como el retículo endoplasmático (RE), y mitocondrias, al flujo desde el espacio extracelular hacia la células a través de la membrana plasmática o como consecuencia de un fallo de los mecanismos moleculares de almacenamiento y extrusión de dicho ión-bombas de Ca^{2+} dependientes de ATP del RE y de la membrana plasmática- (Trump y Berezsky 1996; Krieger y Duchon 2002). La acumulación de Ca^{2+} intracelular puede estimular la activación de enzimas dependientes de dicho ión divalente como proteasas, fosfolipasas y endonucleasas, mecanismos moleculares involucrados, asimismo en el desarrollo de la lesión irreversible (Rosser y Gores, 1995).

No obstante, a pesar de las numerosas observaciones realizadas hasta el momento presente del posible papel del incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular en la lesión celular irreversible (Rosser y Gores, 1995; Trump y Berezsky, 1996; Grrifiths, 1999; Sharikabad et al., 2001), esta bastante bien documentado que dicho incremento no es absolutamente necesario. En este sentido se ha demostrado la formación de blebs y la ruptura de los mismos en condiciones de deplección de ATP en ausencia de cualquier incremento de dicho ión. Por otra parte, la eliminación del calcio extracelular puede incluso acentuar la lesión celular como consecuencia de la generación de radicales libres por la mitocondria. Por tanto el papel del calcio “in vivo” permanece controvertido y puede depender de la naturaleza y magnitud de la lesión provocada.

El papel que desempeña el ion Mg^{2+} es igualmente confuso. El contenido de Mg^{2+} se relaciona según distintos autores con los niveles de ATP (Harman et al., 1990; Buja et al., 1985; Di Francesco et al., 1998). La alteración de la homeostasis de Mg^{2+} puede originar,

asimismo, la activación de endonucleasas dependientes de Mg^{2+} que producen la degradación del ADN que tiene lugar en la muerte celular necrótica.

La concentración intracelular de Na^+ y K^+ esta regulada principalmente mediante la bomba Na^+/K^+ dependiente de ATP. Una inhibición o alteración en la producción de ATP origina una perturbación en el funcionamiento de dicha bomba. Lo cual origina una alteración profunda de la homeostasis intracelular de dicho iones monovalentes (Gasbarrini et al., 1992; Waters et al., 1997^a; Rose et al., 1998) caracterizada por una disminución en el potasio intracelular y un incremento del Na^+ a nivel citosólico. No obstante el papel de ambos iones Na^+ y K^+ en el daño celular en condiciones de deplección de ATP permanece contradictorio. Así, algunos autores atribuyen el proceso de tumefacción celular y formación de blebs a la acumulación del Na^+ en el espacio intracelular (Carini et al., 1995; 1999). En contraste, algunos autores muestran un incremento en la concentración de dicho ion a pesar de la citoprotección inducida por la fructosa en condiciones de hipoxia-anoxia.

El estudio del papel de los iones Cl^- en la lesión celular irreversible no es de menor importancia. En este sentido se ha investigado su participación en las modificaciones morfoestructurales que caracterizan la lesión celular de tipo hipóxico-anóxico (Waters et al., 1997b; Frank et al., 2000; Meng y Reeves 2000; Müller, 2000). Asimismo, el flujo del Cl^- y el mecanismo por el cual logra acumularse al interior de las células es aún objeto de debate. (Waters y Schnellman, 1996; Frank et al., 2000).

En conjunto, todos estos indicios sugieren que los iones pueden jugar un papel fundamental en el proceso de irreversibilidad de la lesión celular. A este respecto la información que disponemos en la actualidad del papel de los iones monovalentes es escasa y en la mayoría de los estudios efectuados hasta el momento presente tan sólo hacen referencia o tienen como objetivo evaluar el comportamiento de un solo ión y no el comportamiento simultáneo de dichos iones, debido, a nuestro juicio, a problemas de tipo metodológico.

1.5. Métodos de estudio de la citotoxicidad y viabilidad celular

Los métodos utilizados para evaluar la toxicidad o lesión celular inducida en modelos experimentales *in vitro* son múltiples y variados (Tabla II). Estos métodos están basados esencialmente en criterios morfológicos, bioquímicas y metabólicos.

1.5.1. Métodos generales

La mayoría de estos métodos revelan o ponen de manifiesto alteraciones no específicas, independientes del mecanismo de acción implicado en el desarrollo de la lesión inducida. Entre estos métodos, los más utilizados se pueden agrupar en tres categorías, funcionalmente: a) métodos basados en la determinación de alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática; b) métodos basados en el análisis de la proliferación celular; y c) otros métodos, entre los que cabe destacar los métodos cualitativos como son los estudios microscópicos y los métodos cuantitativos como la determinación de la concentración intracelular de ATP, evaluación de la actividad mitocondrial mediante el empleo de sondas fluorescentes –rodamina 123- , determinación de la peroxidación lipídica, secreción citosólica de glutathion y métodos que determinan la concentración de los iones intracelulares, especialmente el Ca^{2+} citosólico mediante el empleo de sondas fluorescentes como Fura-2, Quin-2 y Fluo-3 (Melcion et al., 1995).

Los métodos basados en la perturbación de la permeabilidad de la membrana son los más numerosos y utilizados, pudiendo distinguir, fundamentalmente, dos métodos: a) métodos basados en el empleo de colorantes, y b) métodos basados en la determinación de la liberación de moléculas, fundamentalmente enzimas, en el medio extracelular. El principio básico de los métodos primeros consiste en utilizar un colorante, que en función de sus características, penetra y colorea las células vivas o muertas. La proporción relativa de las células coloradas o no, refleja el número exacto de las células vivas o muertas, y en consecuencia la viabilidad del conjunto de la población celular. El contaje de las diferentes poblaciones celulares puede ser efectuado por métodos microscópicos, citometría de flujo, espectrofotometría y por espectrofluorimetría automatizada (Slater, 2001).

Tabla II. *Criterios de evaluación in vitro de citotoxicidad*

- Parámetros morfológicos

- Microscopía óptica (forma celular, alteración nuclear y citoplasmática; acumulación de vacuolas glóbulos lipídicos, formación de blebs, unión-desunión de las células)
- Integridad de la membrana
- Contaje celular

- Parámetros bioquímicas

- Contenido en proteínas y/o en DNA
- Ensayos de exclusión del azul tripan
- Secreción enzimática: LDH, transaminasas
- Liberación de Cr⁵¹, rojo neutro

- Alteración de la permeabilidad de la membrana

- Flujo de los iones y pequeñas moléculas (concentración en K⁺, flujo de Ca²⁺)
- Acumulación de moléculas exógenas (succinato)

- Parámetros metabólicos

- Test de MTT (reducción de sales de formazan por deshidrogenadas mitocondriales)
 - Contenido en ATP
 - Síntesis proteica total (por incorporación de amino ácidos radioactivos)
 - Índice lactato/piruvato
 - Concentración en glutatión
 - Peroxidación lipídica.
-
-

Tabla modificada de Melcion et al. (1995).

Los colorantes empleados en estos métodos se pueden agrupar en tres categorías: a) colorantes vitales o de exclusión, b) colorantes supravitales o de exclusión, y c) colorantes que necesitan una etapa de metabolización intracelular. Los más utilizados son los colorantes de exclusión, colorantes que tan sólo penetran en células con alteraciones de la permeabilidad de la membrana plasmática o células muertas. En la Tabla III se muestran los principales colorantes de esta categoría.

Los colorantes que necesitan una etapa de metabolización constituyen también una categoría muy útil en la actualidad debido, fundamentalmente a las necesidades de rapidez, automatización y reproducibilidad en los ensayos de citotoxicidad mediada por xenobióticos. Entre ellos, el método del MTT –bromuro de dimethylthiazol-difeniltetrazolio- es el más utilizado, producto que se transforma en cristales azules de Formazan bajo la acción de la succinato deshidrogenada mitocondrial, motivo por el cual constituye un método que, además aporta una buena indicación sobre el funcionamiento de dicha organela intracelular.

Tabla III. Colorantes vitales o de exclusión

No fluorescentes	- Tripán Azul - Eosina
Fluorescentes	- Eritrosina B - Bromuro de etidio - Yoduro de propidio

Tabla modificada de Melcion et al. (1995).

Por otra parte, el segundo tipo de métodos, basados en la medición de la liberación de moléculas intracelulares, están fundamentados, asimismo, en las alteraciones de la permeabilidad de la membrana celular bajo la acción de los tóxicos. Dichos métodos comprenden dos ensayos, uno enzimático y otro radiactivo. El método enzimático esta basado en la medición del enzima citosólico láctico deshidrogenada (LDH), enzima que es liberada al medio extracelular tras graves alteraciones de la membrana plasmática. En

efecto la alteración de la membrana plasmática induce el escape de las enzimas citosólicas como la deshidrogenada láctica. El método radioactivo se basa en la medida de la liberación del Cr^{51} , isótopo radiactivo que se une de manera no covalente a los aminoácidos básicos de las proteínas intracelulares. Las células muertas liberan el Cr^{51} en el medio extracelular el cual puede ser cuantificado por un contador gamma.

1.5.2. Métodos de estudio de la Microscopía Electrónica Analítica.

El microanálisis por energía dispersiva de rayos-X (EPXMA) es una técnica que utilizando un haz de electrones permite estudiar la composición química de la muestra de forma simultánea a su observación microscópica. A este respecto, existe un amplio número de técnicas analíticas para estimar el contenido de los elementos inorgánicos en los especímenes biológicos como la espectroscopía por absorción atómica y la fotometría de llama (Carini et al., 1995; 1997; 2000). Estas técnicas, aparte de requerir un número elevado de células, tan solo consideran uno o dos cationes simultáneamente. Asimismo, el empleo de métodos electrofisiológicos o fluorimétricos mediante el uso de indicadores fluorescentes específicos para iones (Fura-2, Fluo-3, SBFI) para evaluar las actividades de los diferentes iones, no proporcionan información sobre la localización subcelular debido a su baja resolución microscópica. Por el contrario, el microanálisis por energía dispersiva de rayos-X es una técnica que combina la posibilidad del análisis químico con el poder de resolución del microscopio electrónico, y por tanto, posibilita correlacionar la información estructural con el contenido elemental. Además, permite el análisis simultáneo de todos los cationes y aniones ($Z \leq 11$) presentes en el espécimen irradiado por el haz de electrones y requiere tan solo un número de células pequeño.

La determinación analítica en la microscopía electrónica analítica se lleva a cabo cuando un haz de electrones acelerados incide sobre la superficie de una muestra y se produce, entre otros fenómenos, la ionización de los átomos de la misma, esto es, la pérdida de electrones de los orbitales internos. Cuando un átomo se encuentra en un estado ionizado, otro electrón de una capa más externa salta inmediatamente a la capa deficitaria, y rellena el hueco producido. Este salto implica una liberación de energía que se manifiesta en forma de radiación electromagnética (rayos X), que es dependiente del número atómico del elemento. Los rayos X generados se pueden clasificar en dos categorías: rayos X característicos y rayos X continuos. Los rayos X característicos son generados como resultado de la colisión entre los electrones del haz primario con los electrones de los

orbitales que se encuentran alrededor del núcleo. Por el contrario, los rayos X continuos o radiación continua son producidos como consecuencia de la desaceleración que sufren los electrones del haz primario al interactuar con el núcleo atómico. La energía de los rayos X característicos depende del número atómico del elemento y puede ser utilizada para identificar un elemento químico presente en la muestra (Goldstein et al., 1992; Roomans y von Euler, 1996).

El análisis de los rayos X emitidos por la muestra va a permitir conocer la composición de la misma. Dicho análisis consiste en medir la energía de los fotones producidos, previa transformación de su energía electromagnética en señal eléctrica utilizando un espectrómetro de dispersión de energía. Posteriormente, los impulsos eléctricos son clasificados utilizando un analizador multicanal acoplado a dicho sistema, originando un espectro a partir del cual es posible derivar la composición química de espécimen visualizado en el microscopio electrónico. El espectro es un histograma de frecuencia que muestra el número de rayos X detectados para cada rango de energía y está constituido por una serie de picos, designados indistintamente como líneas, de intensidad variable –rayos X característicos-, los cuales están superpuestos a un fondo continuo de menor intensidad (rayos X continuos, radiación de fondo o radiación blanca).

1.6. Objetivos

La posibilidad de evaluar la participación de los iones en la muerte celular de modo simultáneo a las alteraciones citológicas que conllevan a la misma, hace de la Microscopía Electrónica Analítica un instrumento sumamente útil en la investigación de la muerte celular y en consecuencia de los mecanismos citotóxicos que conducen a ella. Aunque recientemente la Microscopía Electrónica Analítica ha comenzado a utilizarse para investigar las alteraciones iónicas existentes en distintos modelos de toxicidad celular los sistemas adhesivos dentales no han sido evaluados utilizando esta metodología (López Escamez y Campos, 1994; Fernandez-Segura, 1999). La evaluación de las alteraciones por dichos adhesivos permitirá conocer los mecanismos celulares de toxicidad de estos compuestos a los que con anterioridad se ha hecho referencia y postular una aplicación clínica de las mismas que sugiere sus limitaciones en este sentido.

Los objetivos a desarrollar en la presente tesis doctoral son los siguientes:

Objetivo General

Analizar la toxicidad de los Sistemas Adhesivos Dentales utilizando criterios morfológicos y microanalíticos y evaluar a partir de ellos el mecanismo de muerte celular inducida por estos compuestos.

Objetivos específicos:

- 1- Establecer un modelo experimental in vitro de citotoxicidad inducida por los sistemas adhesivos dentales mediante la utilización de la línea celular U937.
- 2- Evaluar la actividad citotóxica de los sistemas adhesivos dentales mediante ensayos de exclusión vital.
- 3- Evaluar la actividad citotóxica de los sistemas adhesivos dentales con microscopía electrónica de transmisión.
- 4- Evaluar la actividad citotóxica de los sistemas adhesivos dentales con microscopía electrónica analítica cuantitativa.

Material y Métodos

2.1. Material y reactivos

2.1.1. Material

Los tubos de centrifuga de policarbonato de 5, 15 y 25 ml, puntas para micropipetas tipo Eppendorf de 1000 μ l (puntas azules) y 100 μ l (puntas amarillas) y microtubos tipo Eppendorf de polipropileno de 1,5 ml de volumen fueron suministrados por Daslab (LaborTecnica, Granada, España). Los frascos de cultivo de 25 y 75 cm² de superficie de cultivo con filtro de ventilación fueron suministrados por Sarstedt (LaborTecnica, Granada, España). Las unidades Millicell[®] para cultivo en placa de 24 pocillos, de 12 mm de diámetro, y con filtro de policarbonato con poros de 0,4 μ m fueron suministradas por Sigma-Química (Madrid, España). Las rejillas de cobre fueron suministradas por EMS (electron microscopy sciences) (Washington, USA).

2.1.2. Reactivos

Los siguientes reactivos fueron suministrados por Sigma-Química (Madrid, España): medio de cultivo RPMI 1640, suero bovino fetal (FBS), ácido (N-[2-Hidroxiethyl]piperacina-N'-[2-etanosulfónico]) (HEPES) y solución al 0,4% de azul tripán. Las tabletas de tampón fosfato salino (PBS) fueron suministradas de Flow Laboratory (Irvine, UK). El glutaraldehído grado microscopía electrónica (ME), el dimetilsulfóxido (DMSO) y el citrato de plomo fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania), la resina Epoxy por EMS (Washington, USA) y el tetroxido de osmio por Jonson Matthey (Royston, USA).

2.1.3. Sistemas Adhesivos Dentales

Los sistemas adhesivos utilizados fueron el Single Bond (SB) 3M (USA), Prime & Bond NT (P&B NT) Dentsply (Konstanz, Alemania), Syntac Sprint (SS) Vivadent (Schaan, Liechtenstein). El 2-Hidroxiethylmetacrilato (HEMA) fue suministrado por Sigma-Aldrich Química (Madrid, España).

2.1.4. Cultivo celular

Para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral hemos utilizado la línea celular U937 que fue suministrada por *The European Collection of Animal Cell Cultures* (ECACC) (UK). La línea fue originada a partir de un linfoma histiocítico humano por Sundstrom y Nilsson (1976). Las células U937, de crecimiento en suspensión, se caracterizan por ser células moderadamente diferenciadas y que desde el punto de vista morfológico tienen propiedades semejantes a monocitos humanos, pudiendo incluso llegar a la diferenciación terminal de estas bajo ciertas circunstancias experimentales (Kimoto et al., 2001).

La línea celular U937 fue cultivada en RPMI 1640, suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), 2mM de glutamina, 26'7m/l de bicarbonato sódico (NaHCO₃) al 7,5% y libre de antibióticos. Las células se han mantenido en estufa de cultivo (Forma Scientific, Suecia) a 37° C en una atmósfera al 5% de CO₂. Las células fueron subcultivadas cada 48 horas. La viabilidad determinada con tripán azul fue del 99%.

2.2. Procedimiento experimental

2.2.1. Tratamiento de células U937

Para la realización de los ensayos experimentales con los diferentes sistemas adhesivos dentales, las células U937 cultivadas en las condiciones indicadas anteriormente fueron extraídas de los frascos de cultivo, centrifugadas y resuspendidas en medio de cultivo RPMI 1640 libre de suero y antibióticos y suplementado con 2 mM de glutamina y bicarbonato sódico. Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^5 cel/ml para todas las condiciones experimentales. Asimismo, se comprobó que la viabilidad celular fue superior al 95 % antes de iniciar el ensayo experimental.

A continuación se procedió a la adición de un volumen o concentración de los diferentes sistemas adhesivos dentales con el objetivo de confeccionar curvas dosis-respuestas y la valoración de la DL₅₀ de cada uno de ellos. Previamente, se procedió a la realización de soluciones stock de los adhesivos dentales SB, P&B NT y SS en dimetilsulfoxido (DMSO) en una relación 1:10. Para el HEMA se realizó una solución stock 1M en H₂O bidestilada.

Tras la adición del adhesivo dental, las células fueron incubadas a 37° C en un baño María y a los diferentes intervalos de tiempo (5, 15, 30, 60, 120 min) se procedió a la extracción de un volumen celular y su posterior estudio mediante las diferentes técnicas utilizadas en la presente Tesis Doctoral. Como grupo control se utilizaron las células U937 en condiciones idénticas a las descritas previamente, pero sin la adición de los sistemas adhesivos dentales.

2.3. Evaluación de la integridad de la membrana celular: Ensayos de exclusión vital

Para evaluar la integridad de la membrana plasmática, en el presente trabajo de investigación se utilizó el ensayo de exclusión del tripan azul mediante el empleo de microscopía óptica. El fundamento de esta técnica radica en la incapacidad de las células vivas por incorporar dicho colorante penetrando tan sólo en las células muertas cuya membrana plasmática esta dañada.

El tripan azul es un colorante soluble en agua cuyos grupos cargados amino y sulfato le impiden atravesar las membranas celulares intactas, por tanto tiñe solo las células muertas o dañadas (Fig.3).

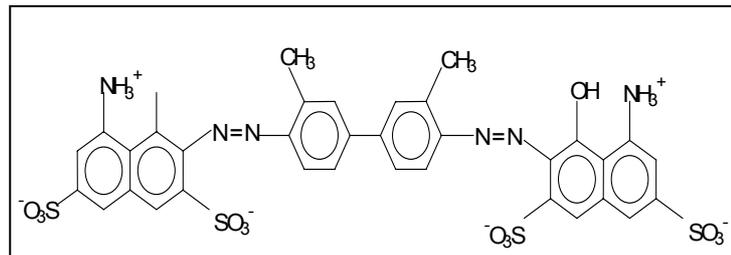


Fig.3. Fórmula química desarrollada del tripan azul.

La pauta metodológica llevada a cabo para evaluar la viabilidad de células controles y tras la adición de los diferentes sistemas adhesivos dentales fue la siguiente:

Protocolo:

- La línea celular monoblástica U937 fue resuspendida en un medio RPMI libre de suero y a una concentración de 5×10^5 cel/ml. Se adicionó al mismo SB (3M), P&B NT (Dentsply), SS (Vivadent) y HEMA y se incubó a 37° C en baño maría.

- En cada intervalo de tiempo, se procedió a la extracción de 0,5 ml de la suspensión celular objetivo de estudio y se le adicionó 0,5 ml de la solución 0,4% de azul tripan, incubándose durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente.

- Tras la incubación, se procede a extraer 10 µl de la suspensión celular depositándola sobre una cámara Neubauer.

- Finalmente, se procede al recuento de células mediante un microscopio óptico Leitz Laborlux 12 (Leica, Barcelona, España) determinando el número de células que captan la solución del azul tripan (color azul intenso), evaluando un total de 100 células en cada condición experimental y de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ células no viables} = 100 \times \frac{\text{número de células que captan el colorante}}{\text{número total de células}}$$

2.4. Estudio Morfológico

Con el objetivo de analizar el mecanismo de muerte celular tras la exposición a los diferentes sistemas adhesivos dentales, las células U937 fueron examinadas mediante microscopía electrónica de transmisión, evaluando las alteraciones a nivel ultraestructural. Para ello, las células en las diferentes condiciones experimentales indicadas anteriormente, fueron procesadas siguiendo la pauta metodológica que a continuación detallamos:

Protocolo:

- Las células U937 controles o tratadas con los sistemas adhesivos dentales, como hemos indicamos en el apartado 2.2.1., y a los diferentes intervalos de tiempos fueron fijadas en suspensión mediante glutaraldehído al 2,5 % en 0,1 M tampón fosfato, pH 7.2, durante 4 h y a una temperatura de 4° C. Para la obtención de botones celulares adecuados para su procesamiento para microscopía electrónica de transmisión, fue necesario la utilización como mínimo de 3×10^6 células en cada periodo de tiempo (control inicial, 5, 15, 30, 60, 120 min y control final).

- Tras la fijación las células fueron lavadas 3 veces, utilizando 0,1 M de tampón fosfato, pH 7.2. Para ello las células se centrifugaron a 6.000 rpm durante 3 o 4 minutos por cada lavado, en una microcentrífuga (Desaga, Alemania).
- Tras el lavado, se procedió a la postfijación con tetróxido de osmio al 2% en agua y ferrocianuro potásico al 1% durante 1 h.
- A continuación se procedió a la deshidratación de las muestras, utilizando soluciones crecientes de etanol (50, 70, 90,100%) a 4° C.
- La inclusión se realizó en una resina Epoxy, utilizando como agente intermedio el óxido de propileno. Las muestras fueron incluidas en resina durante 24 h, a 4° C. Tras este período de tiempo se procedió a su polimerización durante 2 h a 60° C.
- Finalmente se realizaron cortes ultrafinos de 100 nm de espesor en un ultramicrotomo Reichter Ultracut.
- El montaje se realizó sobre rejillas de cobre de malla 300 y teñidas con acetato de uranilo al 2% en agua destilada durante 10 min y citrato de plomo durante 5 min, de acuerdo con la metodología descrita por Reynolds (1963).
- La observación se llevó a cabo con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM902 (Oberkochem, Alemania)

**La preparación de las muestras y la observación microscópica mediante microscopía electrónica de transmisión se realizaron en el Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Instrumentación de la Universidad de Granada España.*

2.5. Microanálisis por Energía Dispersiva de Rayos X

Con el objetivo de analizar las alteraciones en la composición elemental de las células expuestas a la acción de SB (3M) y HEMA (2-Hidroxietilmetacrilato) en las células U937 hemos utilizado técnicas de Microanálisis por Energía Dispersiva de Rayos-X (EPXMA). La metodología aplicada en la presente Tesis Doctoral tiene como base estudios previos realizados en nuestro laboratorio con la finalidad de evaluar la composición en sodio

(Na), magnesio (Mg), fósforo (P), cloro (Cl), potasio (K), Azufre (S) y calcio (Ca) en células en cultivo de crecimiento en monocapa y en suspensión como las células MCF-7, LLC-PK₁ y U937, respectivamente (Fernández-Segura et al., 1997a, 1997b; 1999). Este procedimiento se caracteriza básicamente por: 1) adaptación de las células sobre soportes adecuados para microanálisis por rayos-X; 2) eliminación del medio extracelular; 3) criofijación; 4) criódeseccación; 5) observación y análisis elemental mediante un microscopio electrónico de barrido equipado de un sistema energía dispersiva por rayos-X, y 6) cuantificación de las concentraciones elementales mediante el método de la razón pico fondo (P/B). Dicho protocolo es mostrado en la Figura 4.

2.5.1. Adhesión de las células U937 al soporte / sustrato

Las células U937 en cultivo fueron extraídas en una cantidad 400 µl de la suspensión celular y se depositaron sobre las unidades Millicell insertadas en tubos cónicos de polipropileno de 15 ml. Los tubos utilizados fueron un total de 7 correspondientes a cada tiempo a estudiar. Estos fueron centrifugados durante 5 min a 170 g en una centrífuga Omnifuga2.RS (Heraeus SA, Madrid, España). Tras la centrifugación, las unidades Millicell fueron colocadas en una placa de Petri e inmediatamente se procedió al aislamiento de cada una de las membranas de policarbonato del soporte de poliestireno. Tras el aislamiento de la membrana de policarbonato se procedió a la incubación de las mismas en los diferentes sistemas adhesivos dentales previamente preparado como se indica en el apartado 2.2.1.

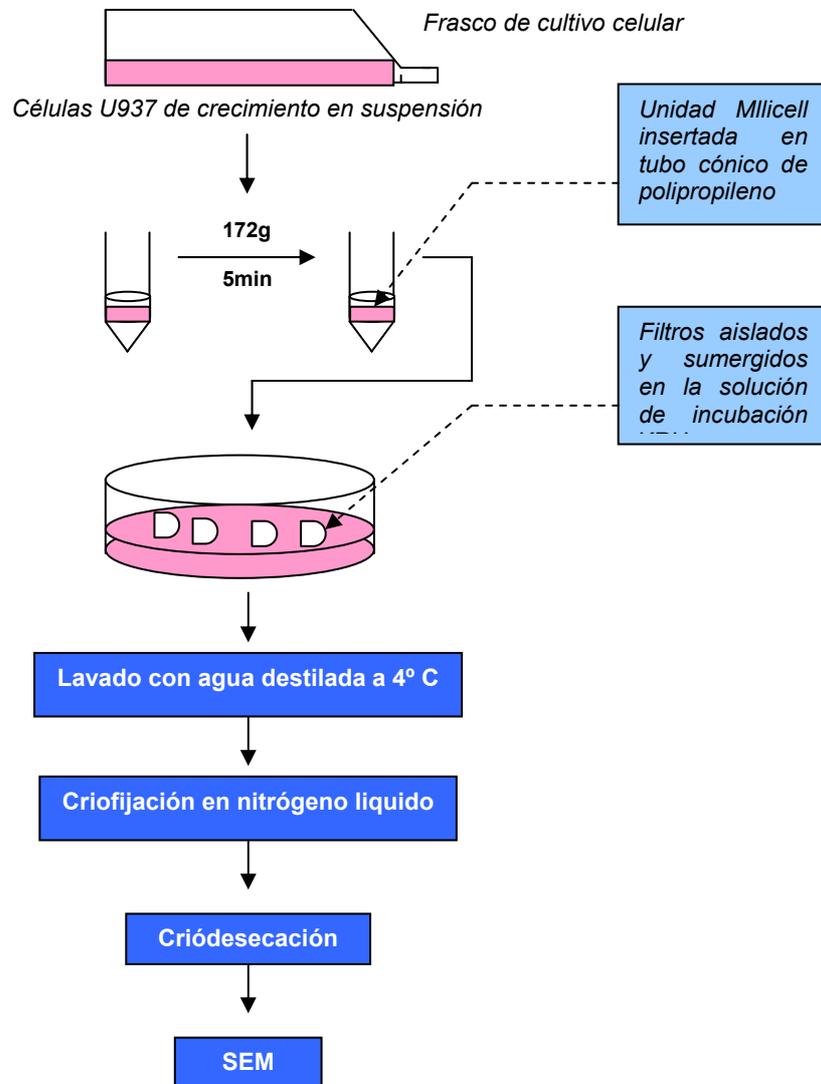


Fig. 4. Procedimiento de preparación de las células U937. para evaluar el efecto de los sistemas adhesivos dentales sobre la composición elemental mediante la aplicación de EPXMA. Las células U937 son centrifugadas sobre unidades Millicell[®] procediendo a continuación al aislamiento de los filtros de policarbonato. Estos son sumergidos en RPMI libre de suero en una placa de Petri e incubados con diferentes dosis de los sistemas adhesivos y a diferentes intervalos de tiempo. Tras la incubación, las muestras son lavadas con H₂O destilada a 4° C durante 5 s y con agitación constante, criofijadas por inmersión en nitrógeno líquido y criodesecadas por sublimación.

2.5.2. Eliminación del medio extracelular

Con el objetivo de eliminar la contribución del medio extracelular al espectro de rayos-X en los análisis de las células U937, se procedió al lavado de las mismas de acuerdo con los criterios establecidos previamente por diferentes autores (Wroblewski et al., 1983; Wroblewski y Roomans, 1984; Abraham et al., 1985; Zierold y Schäfer, 1988; Lechne, 1989; von Euler et al., 1993; Borgman et al., 1994; Warley 1994a; Fernández-Segura et al., 1997 a), eligiendo como solución lavadora el agua destilada. Las muestras fueron lavadas mediante inmersión en agua destilada a una temperatura de 4° C, durante 5 segundos. La solución lavadora se mantiene en movimiento constante por agitación magnética.

2.5.3. Criofijación de las muestras

Las muestras lavadas se criofijaron mediante inmersión rápida de las mismas en nitrógeno líquido. Previamente se quitó el exceso de agua en un papel de filtro. Las membranas con las células criofijadas se introdujeron en un portamuestra de aluminio, sumergido en Nitrógeno líquido (-196°), diseñado en nuestro laboratorio que permite el procesamiento simultáneo de varias muestras.

2.5.4. Criodesecación de las muestras

Las células criofijadas y en el interior del portamuestra fueron transferidas de forma inmediata a un sistema de criodesecación de alto vacío Emitech K775 (Emitech, Watford, UK) con el objetivo de extraer el agua de las células por sublimación. Las muestras fueron criodesecadas durante un total de 17 horas a una presión de vacío de 10^{-5} mbar siguiendo el perfil de temperaturas mostrado en la Tabla 4, y desarrollado de acuerdo con los criterios establecidos por Warley y Skepper (2000).

Tabla IV: Perfil de temperaturas utilizado para la criodeseccación de las células U937 en un sistema de criodeseccación Emitech K775.

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

2.5.5. Montaje y recubrimiento de las muestras

Tras la criodeseccación de las muestras, la fase última del protocolo consiste en recubrir a las muestras con una superficie conductora de electricidad, que facilite el barrido del haz de electrones durante su observación microscópica y detección analítica. Para ello las muestras se montaron sobre portamuestras de aluminio de 12 mm de diámetro (Sigma, Madrid, España), usando como adherente entre la membrana y el portamuestras un doble adhesivo de carbón (Electron Microscopy Sciences, Aname, Madrid). Finalmente, las muestras fueron recubiertas con una capa de carbón mediante un evaporador (Emitech, Watford, UK) utilizando hilo de grafito.

2.5.6. Instrumentación, parámetros analíticos y condiciones de observación

Para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral hemos utilizado un microscopio electrónico de barrido Philips XL30 (Philips, Eindhoven, Holanda), equipado con una lente de objetivo cónico y un detector de energía dispersiva de rayos X con ventana ultrafina CDU (EDAX, Eindhoven, Holanda). La configuración geométrica de este equipamiento posibilita la detección simultánea de electrones secundarios y rayos X, con una pequeña distancia de trabajo (10 mm) y un alto ángulo de toma (*take-off-angle*).

2.5.6.1. Observación de las muestras

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

- Voltaje del microscopio..... los análisis se realizaron a 10 y 15 KV
- Angulación de superficie.....35°
- Distancia de trabajo..... 10mm

2.5.6.2. Parámetros analíticos:

Para la detección de rayos-X, las condiciones instrumentales fueron las siguientes:

- Voltaje del microscopio.....10 kV
- Aumentos 10000
- Angulo de toma (*take-off-angle*).....60°
- Angulación de superficie (*tilt*).....35°
- Cuentas por segundo (*cps*) registradas por el detector 450-600
- Tiempo de adquisición 200 s
- Tamaño del haz de electrones (*spot size*)..... 5,5± 0,2
- Distancia de trabajo libre 10mm
- Área de análisis puntiforme y estático

2.5.7. Método de cuantificación para microanálisis por energía dispersiva de rayos-X con microscopia electrónica de barrido

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

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

Donde C_{spc} es la concentración del elemento, P corresponde a las cuentas netas de la señal característica del elemento, B es la radiación continua medida debajo del pico, es decir tomada entre los mismos niveles de energía de la señal característica, Z^2/A es el valor medio del número atómico al cuadrado por el peso atómico, correspondiente un valor específico para el dextrano y las células (Warley, 1997).

2.5.7.1. Patrones y curvas de calibración

La preparación de los patrones se realizó de acuerdo con las pautas establecidas en nuestro laboratorio (Crespo et al., 1993; López-Escámez y Campos 1994), utilizando como patrones sales de NaHPO_4 , MgCl_2 , $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y K_2SO_4 disueltas en una matriz orgánica. Para ello se prepararon soluciones de cada sal a diferentes concentraciones en dextrano al 20% (300 kD). Los patrones se montaron sobre membranas microporosas de las unidades Millicell® y se criófixaron mediante inmersión en nitrógeno líquido. En esta fase del proceso, así como en la posterior criódeshidratación, montaje y recubrimiento, se siguió el mismo procedimiento expuesto en los apartados 2.5.3., 2.4.4., 2.5.5.. Los patrones se analizaron en el microscopio inmediatamente después de su preparación para evitar su contaminación o modificación química, adquiriéndose entre 15 y 20 espectros para cada concentración de patrón, utilizando las condiciones de análisis expuestas en el apartado 2.5.6.2.

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

$$C_{\text{ts.}} = K \times (P_{\text{std}} / B_{\text{std}})$$

donde C_{ts} es la concentración del elemento en el patrón, la cual es conocida; $(P_{\text{std}} / B_{\text{std}})$ es la razón P/B, donde el fondo se ha medido entre el mismo rango de energía de la señal característica obtenida del análisis de los estándar y K es la constante de calibración característica para cada elemento y configuración instrumental utilizada.

La relación entre P_{std}/B_{std} frente a la concentración de cada elemento se estudió mediante regresión lineal simple (Fig.5). Como k , la constante de calibración, depende de la diferencia en el Z^2/A -factor G- entre el estándar y la célula, para valorar la influencia de dicho factor en el ajuste de la curva, empleamos la siguiente ecuación:

$$Y = P_{std} / B_{std} \cdot (Z^2 / A)_{std}$$

donde Z^2/A es el promedio del valor de Z^2/A para todos los elementos presentes en el volumen analizado del estándar,

$$Z^2 / A = \sum (f_i \cdot Z_i^2 / A_i)$$

donde Z_i es el número atómico del elemento i , A_i es el peso atómico de dicho elemento y f_i es la fracción de masa del elemento i expresada como masa elemental / masa total (Hall y Gupta, 1986).

En la Tabla 5 mostramos las ecuaciones de regresión obtenidas para todos los elementos cuando $Y = P_{std}/B_{std} \cdot Z^2/A$ se calibró frente a C_{std} para los elementos Na, Mg, P, S, Cl, K analizados a 10 KV.

Tabla 5. Ecuación de regresión obtenidas cuando $Y = P_{std}/B_{std} \cdot Z^2/A$ se calibró frente a C_{std} analizados a 10 kV.

Elemento		
Na	$Y = 3,75 + 0,032 x$	$(r = 0,99 P < 0,001)$
Mg	$Y = 1,07 + 0,052 x$	$(r = 0,98 P < 0,01)$
P	$Y = 0,64 + 0,042 x$	$(r = 0,99 P < 0,01)$
S	$Y = 1,38 + 0,052 x$	$(r = 0,97 P < 0,01)$
Cl	$Y = 1,42 + 0,036 x$	$(r = 0,99 P < 0,01)$
K	$Y = 3,32 + 0,054 x$	$(r = 0,99 P < 0,01)$
Ca	$Y = 0,60 + 0,063 x$	$(r = 0,99 P < 0,01)$

2.6. Tratamiento estadístico

El estudio estadístico de los datos numéricos obtenidos se realizó mediante el programa informático GraphPad InStat versión 3.05 (GraphPad Software Inc, San Diego, USA), asumiendo como un máximo un error alfa del 5% ($P < 0.05$) en todas las pruebas realizadas.

La distribución de las variables medidas en este estudio fue analizada mediante el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Para comparaciones múltiples de medias de variables no paramétricas se utilizó el test de Kruskal-Wallis. Cuando se encontró diferencias significativas entre los grupos, se utilizó el test de Dunn como test a posteriori para todas las comparaciones con un control. El análisis comparativo de la distribución de medias aritméticas de variables normales se realizó mediante un test para muestras independientes con corrección de Welch (Test de Welch).

Finalmente, para la relación de P_{std}/B_{std} frente a la concentración de cada elemento se utilizó el coeficiente de correlación lineal de Pearson, previa nube de puntos.

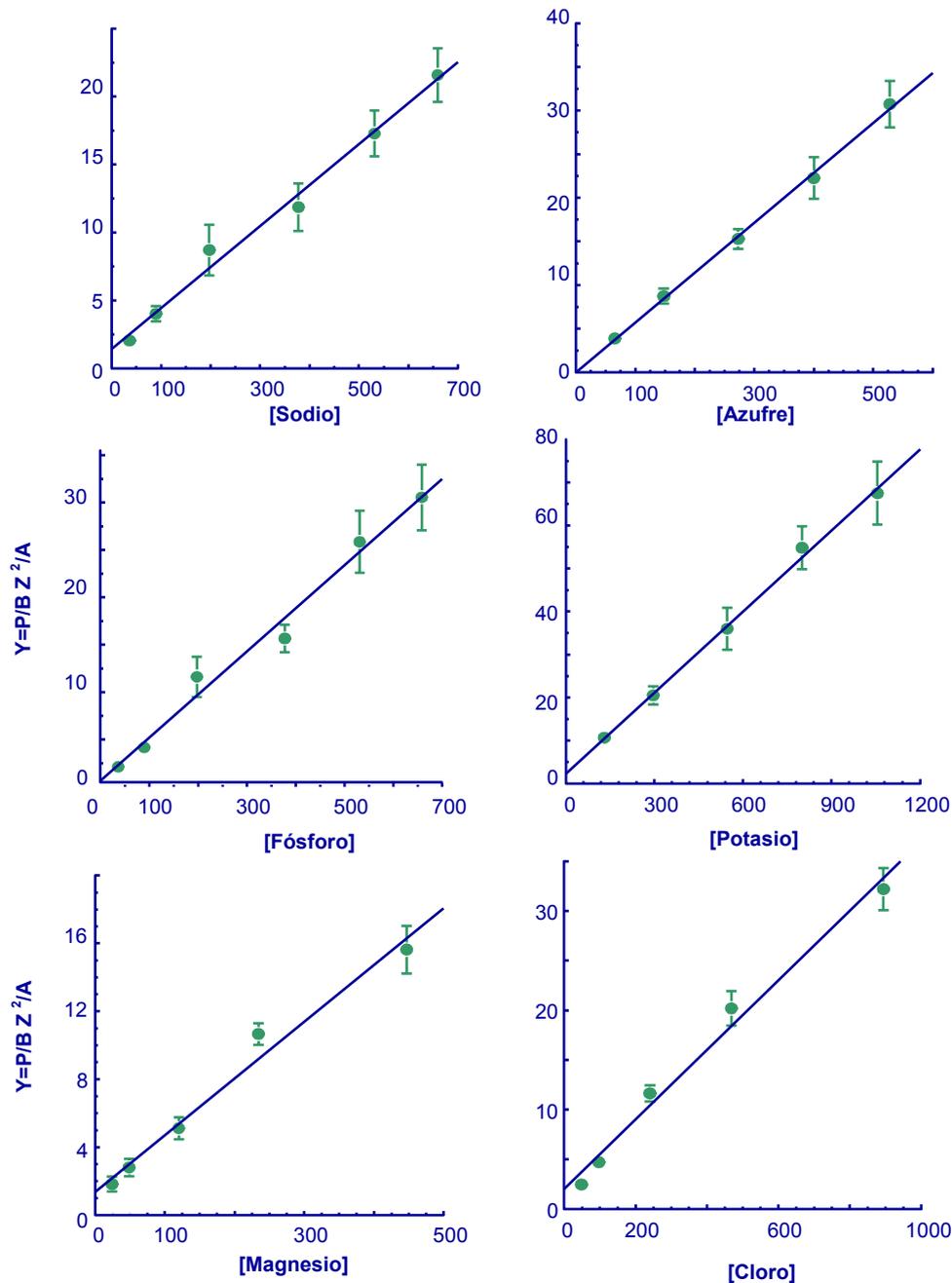


Fig. 5. Representación de la razón $Y = P_{std}/B_{std} \cdot Z^2/A$ como una función de C_{std} para los patrones de P, Mg, K y Cl 10 kV. Cada valor representa la media \pm SD de 15- 20 análisis. Los patrones de calibración fueron preparados de forma idéntica a las células U937. Las soluciones en dextrano al 20% con las diferentes concentraciones de las sales inorgánicas empleadas fueron depositadas sobre filtros de policarbonato (tamaño de poro de $0.4 \mu m$) aislados de sus soportes de polistireno, criofijadas en nitrógeno líquido, criodesecadas y analizadas en un microscopio Philips XL30 utilizando idénticas condiciones instrumentales y analíticas a las indicadas en los apartados 2..4.6, del capítulo de Material y Métodos.

Resultados

3.1. Efecto de los Sistemas Adhesivos Dentales sobre la viabilidad de la línea celular U937

En los siguientes apartados mostramos los efectos dosis respuestas y las respuestas temporales sobre la viabilidad de las células U937 de los sistemas adhesivos SB, P&B NT, SS y del 2-Hidroxietilmetacrilato (HEMA) como uno de los componentes respectivos de los sistemas adhesivos. La viabilidad celular fue evaluada mediante el ensayo de exclusión vital del tripan azul determinando sobre un total de 100 células en cada condición experimental el número de células que no captan dicho colorante.

3.1.1. Efecto de Single Bond (3M)

a) Curva Dosis-Respuesta

En la Figura 6 mostramos la curva dosis-respuesta de SB sobre la viabilidad de las células U937 a los 60 min de incubación. Nuestros resultados indican que la DL_{50} fue de 5 μ l para SB.

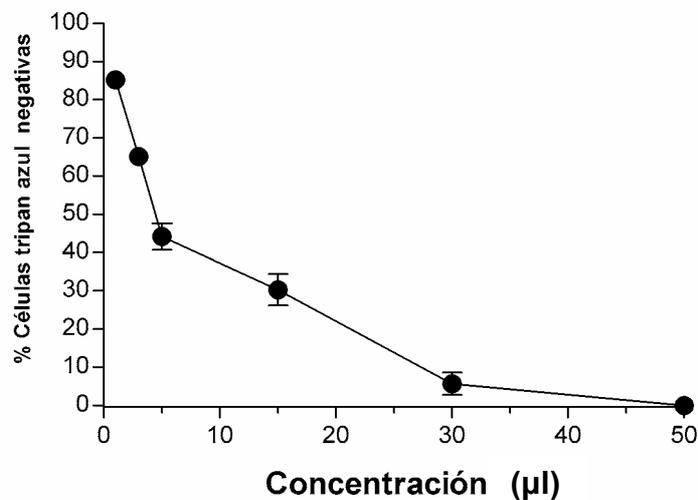


Fig.6. Curva dosis-respuesta de Single Bond (3M) sobre la viabilidad de células U937. Las células fueron incubadas en RPMI 1640 con diferentes dosis de Single Bond (3M) durante 60 min a 37°C. La viabilidad fue estimada mediante la exclusión del colorante vital tripan azul. Los resultados son expresados como media \pm error estándar de la media. Los datos son representativos de 7 experimentos independientes.

b) Respuesta Temporal

En la Figura 7 mostramos el efecto temporal de SB (5 μ l) sobre la viabilidad de células U937. Nuestros resultados ponen de relieve una disminución progresiva de la viabilidad. Tras 5 min de la adición de SB, se observa una disminución de la viabilidad celular que llega a un valor del 65%. Ya en los tiempos siguientes la pérdida de viabilidad se va haciendo más gradual mostrando una meseta hasta los 60 min y luego una disminución mas acentuada que a los 120 min evidencia un 15% de viabilidad. La viabilidad de las células controles tratadas bajo las mismas condiciones experimentales pero sin la adición de SB fue a los 120 min de 95,42%.

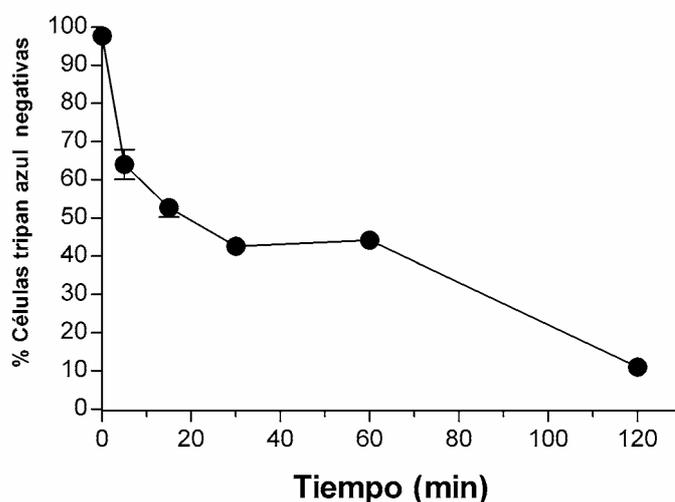


Fig.7. Efectos del Single Bond (3M) sobre la viabilidad de la línea celular U937. Las células U937 fueron incubadas en RPMI 1640 con una dosis de 5 μ l de Single Bond (3M) durante 120 min a 37° C. La viabilidad fue estimada mediante la exclusión del colorante vital tripan azul. Los resultados son expresados como media \pm error estándar de la media. Los datos son representativos de 7 experimentos independientes.

3.1.2 Efecto de Prime & Bond NT (Dentsplay)

a) Curva Dosis-Respuesta

En la Figura 8 mostramos la curva dosis-respuesta de P&B NT sobre la viabilidad de las células U937 a los 60 min de incubación. Nuestros resultados indican que la DL₅₀ fue de 15 μ l para P&B NT.

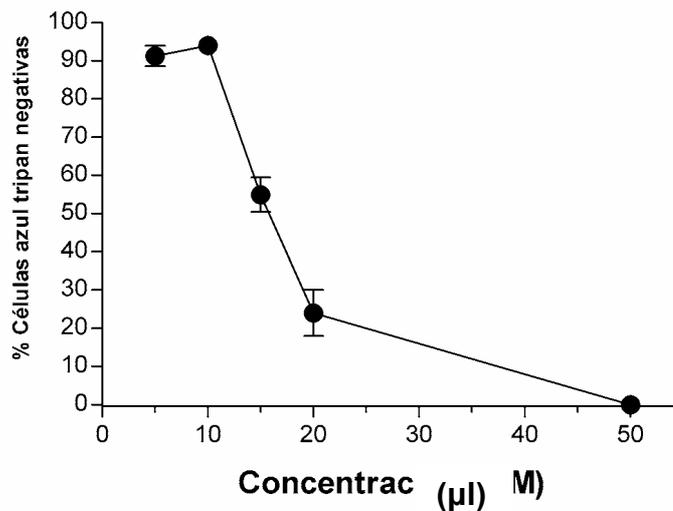


Fig.8. Curva dosis-respuesta de Prime & Bond NT (Denstplay) sobre la viabilidad de células U937. Las células fueron incubadas en RPMI 1640 con diferentes dosis de Prime & Bond NT durante 60 min a 37°C. La viabilidad fue estimada mediante la exclusión del colorante vital tripan azul. Los resultados son expresados como media +/- error estándar de la media. Los datos son representativos de 7 experimentos independientes.

b) Respuesta Temporal

En la Figura 9 mostramos el efecto temporal de P&B NT (15µl) sobre la viabilidad de células U937. Nuestros resultados muestran en la figura 2, el comportamiento de las células U937 utilizando 15 µl de P&B NT, aquí vemos que existe una curva temporal que durante los primeros 15 min nos muestra como la viabilidad desciende levemente hasta un 85% y que a partir de ahí se produce un descenso brusco hasta los 60 min donde se produce una pequeña elevación, para luego seguir en efecto meseta estableciéndose a los 120 min una viabilidad del orden del 35% de células que excluyen el colorante tripan azul. La viabilidad de las células controles tratadas bajo las mismas condiciones experimentales pero sin la adición de P&B NT fue a los 120 min de 97%.

3.1.3. Efecto de Syntac Sprint (Vivadent)

a) Curva Dosis-Respuesta

En la Figura 10 mostramos la curva dosis-respuesta de SS sobre la viabilidad de las células U937 a los 60 min de incubación. Nuestros resultados indican que la DL₅₀ fue de 150 µl para SS.

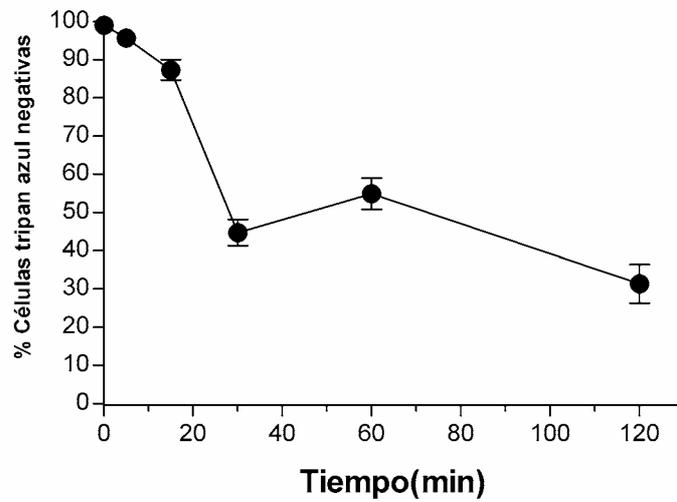


Fig.9. Efectos del Prime & Bond NT (Dentsply) sobre la viabilidad de la línea celular U937. Las células U937 fueron incubadas en RPMI 1640 con una dosis de 15 μ l de Prime & Bond NT (Dentsply) durante 120 min a 37° C. La viabilidad fue estimada mediante la exclusión del colorante vital tripan azul. Los resultados son expresados como media \pm error estándar de la media. Los datos son representativos de 7 experimentos independientes..

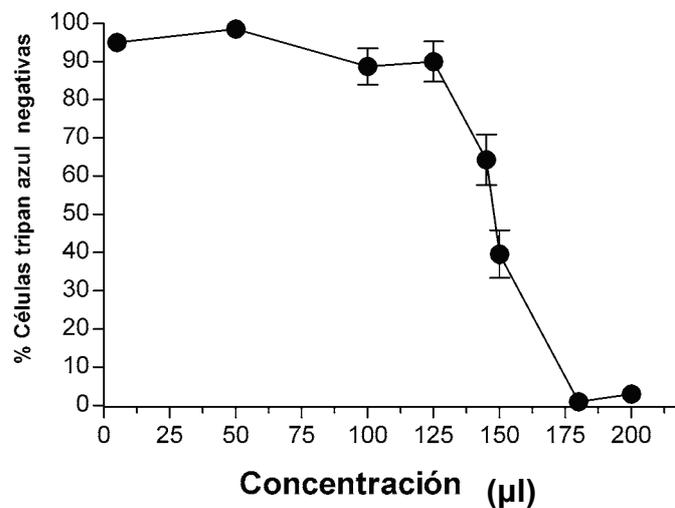


Fig.10. Curva dosis-respuesta de Syntac Sprint (Vivadent) sobre la viabilidad de células U937. Las células fueron incubadas en RPMI 1640 con diferentes dosis de Syntac Sprint (Vivadent) durante 60 min a 37°C. La viabilidad fue estimada mediante la exclusión del colorante vital tripan azul. Los resultados son expresados como media \pm error estándar de la media. Los datos son representativos de 7 experimentos independientes

b) Respuesta Temporal

La Figura 11 muestra la respuesta temporal de la viabilidad de las células U937 utilizando SS, donde observamos una curva que expresa una disminución suave de la viabilidad a los 15 min y luego el descenso se acentúa a los 30 min para hacerlo ya en forma mas lenta y obtener a los 120 min una viabilidad del orden del 35% de células que excluyen el colorante. La viabilidad de las células controles tratadas bajo las mismas condiciones experimentales pero sin la adición del SS fue a los 120 min de 98,5%.

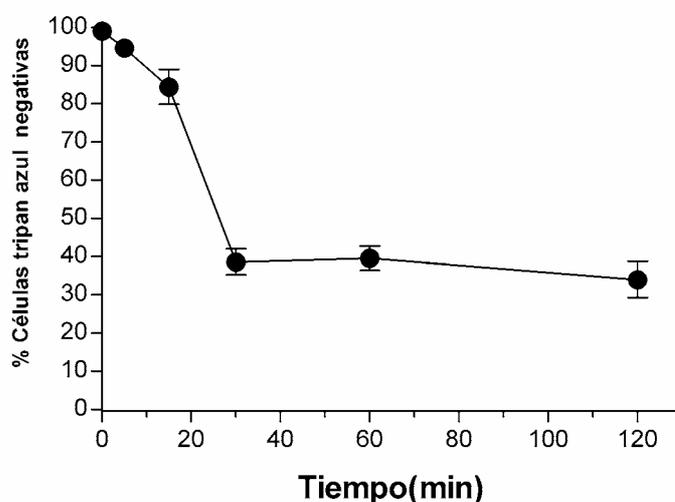


Fig.11. Efecto de Syntac Sprint (Vivadent) sobre viabilidad de la línea celular U937. Las células U937 fueron incubadas en RPMI 1640 con una dosis de 150 μ l de Syntac Sprint (Vivadent) durante 120 min a 37° C. La viabilidad fue estimada mediante la exclusión del colorante vital tripán azul. Los resultados son expresados como media \pm error estándar de la media. Los datos son representativos de 7 experimentos independientes.

3.1.4. Efecto de HEMA (2-Hidroxietilmetacrilato)

a) Curva Dosis Respuesta

En la Figura 12 mostramos la curva dosis-respuesta de HEMA sobre la viabilidad de las células U937 a los 60 min de incubación. Nuestros resultados indican que la DL₅₀ fue de 180 mM para HEMA.

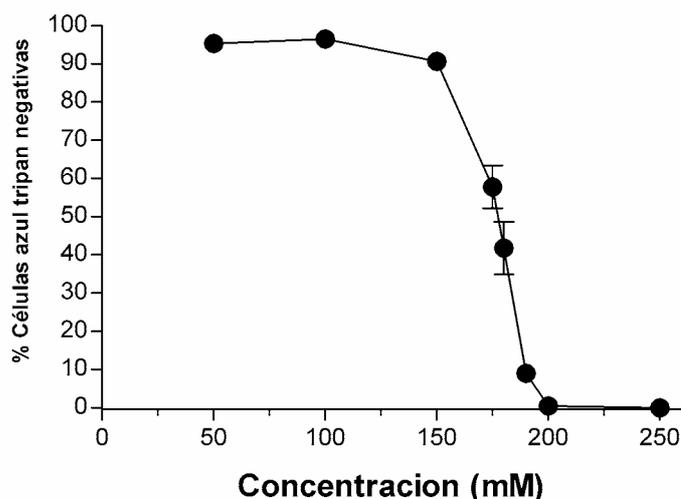


Fig.12. Curva dosis-respuesta de HEMA sobre la viabilidad de células U937. Las células fueron incubadas en RPMI 1640 con diferentes dosis de HEMA durante 60 min a 37°C. La viabilidad fue estimada mediante la exclusión del colorante vital tripán azul. Los resultados son expresados como media +/- error estándar de la media. Los datos son representativos de 7 experimentos independientes.

b) Respuesta Temporal

En la Figura 13, observamos como utilizando 180 mM de HEMA la viabilidad de la células U937 describen una curva que desciende gradual y levemente hasta un 90% a los 30 min y a continuación se produce ya un descenso más imponente para obtener una viabilidad a los 120 min de un 5% de células que excluyen la coloración del tripán azul. La viabilidad de las células controles tratadas bajo las mismas condiciones experimentales pero sin la adición del HEMA fue de 97,2%.

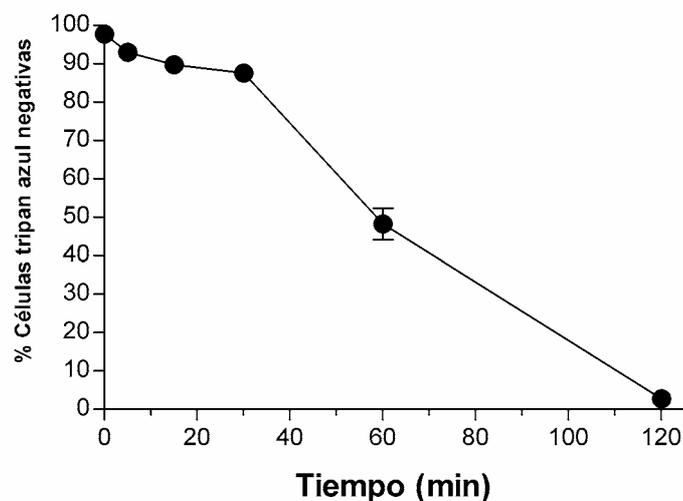


Fig.13. Efecto de HEMA sobre la viabilidad de la línea celular U937. Las células U937 fueron incubadas en RPMI 1640 con una dosis de 180 mM de HEMA a una oncentración stock de 1M durante 120 min a 37° C. La viabilidad fue estimada mediante la exclusión del colorante vital tripán azul. Los resultados son expresados como media +/- error estándar de la media. Los datos son representativos de 7 experimentos independientes.

De los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad y visto que tanto los productos comerciales (SB, P&B, SS) como HEMA son citotóxicos, se seleccionó un producto comercial (SB) y uno de los componentes de este sistema adhesivo el HEMA, a los fines de realizar un estudio comparativo de los efectos ultraestructurales así como los cambios microanalíticos que se suceden en las células U937 en contacto con estos productos.

3.2. Efecto de los Sistemas Adhesivos Dentales sobre la ultraestructura de la línea celular U937

Con el objetivo de evaluar el efecto de los sistemas adhesivos dentales SB y HEMA, sobre la ultraestructura de las células U937 y determinar el tipo de muerte celular inducida, las células fueron procesadas y examinadas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión tras la exposición de las mismas a dosis e intervalos de tiempos seleccionados en experimentos previos.

3.2.1. Efecto de Single Bond (3M)

En la Figura 14 mostramos el efecto del SB (3M) sobre la morfología de las células U937. Las células controles, no tratadas, se caracterizan por mostrar una morfología irregularmente esférica con escaso número de prolongaciones tipo microvillis, núcleo en posición central con abundante eucromatina y nucleolos evidentes. A nivel citoplasmático destaca la presencia de cisternas de retículo endoplásmico rugoso y un número variable de mitocondrias con configuración ortotípico (Fig. 14A).

La adición del adhesivo dental induce la aparición rápida de alteraciones ultraestructurales progresivas. En una primera fase tras 5 min y 15 min, algunas células se caracterizan por mostrar una ultraestructura similar o semejante a la descrita anteriormente por las células controles, aunque es posible observar en estas algunas mitocondrias condensadas. Asimismo, se observan células con un incremento del tamaño celular, tumefacción escasa del citoplasma, aparición de vacuolas citoplasmáticas y mitocondrias con configuración tumefacta con crestas mitocondriales dilatadas (Fig. 14B).

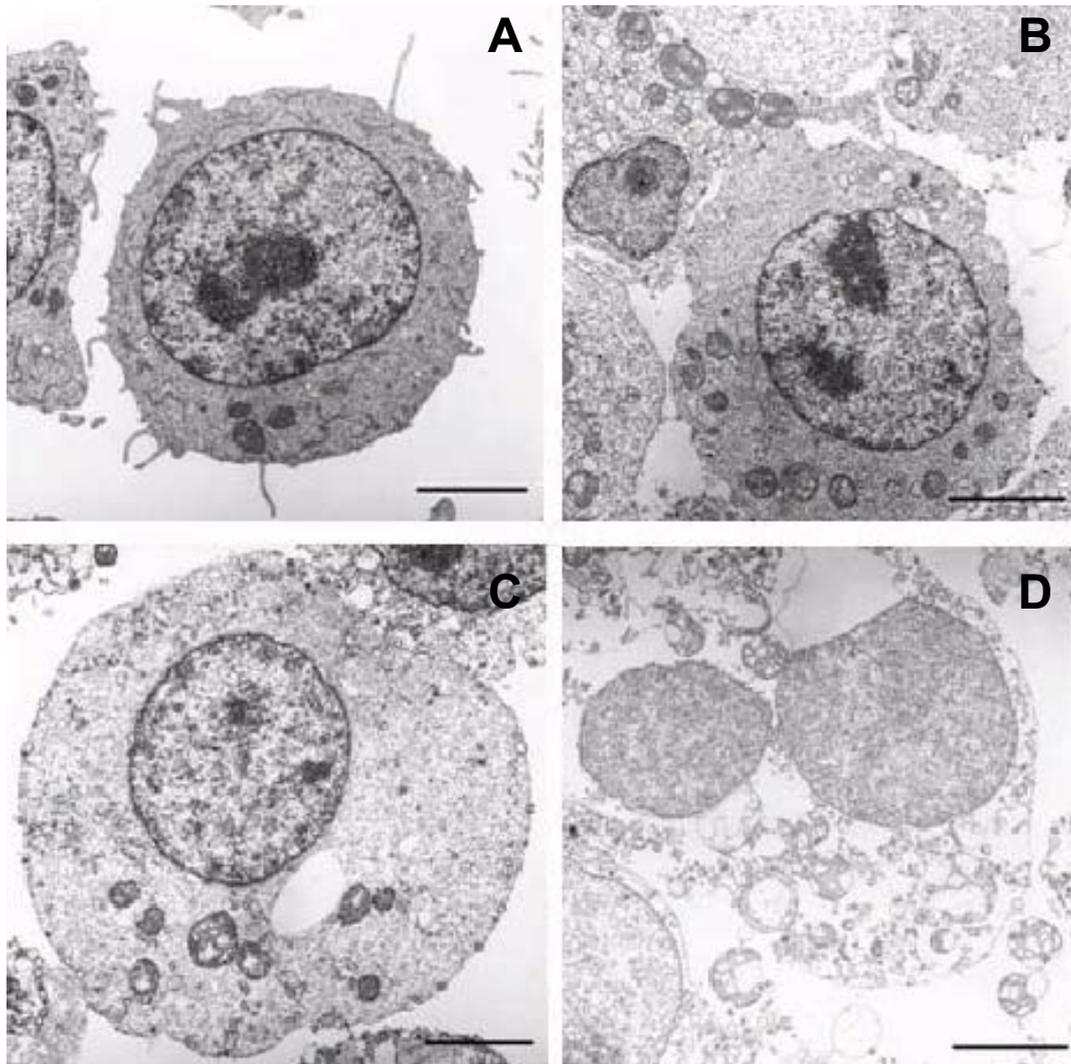


Fig.14. Efecto del Single Bond (3M) sobre la ultraestructura de las células U937. A) Las células controles muestran una morfología ortotípica. B) Tras 5 min se observa algunas mitocondrias condensadas y vacuolas citoplasmáticas. C) A los 30 min las células U937 evidencian un aumento de tamaño en su citoplasma, incipientes signos de cariólisis y una marcada degeneración mitocondrial. D) Tras 60 min se observan cambios degradativos importantes con disolución del citoplasma celular y desaparición de la membrana plasmática. Escala: 5 μ m.

Tras los 30 min, las células U937 se caracterizan por mostrar una morfología redondeada con superficie lisa con incremento del tamaño celular como consecuencia de la intensa tumefacción citoplasmática. A nivel nuclear destaca la presencia de incipientes signos de cariólisis, desaparición nucleolar y dilatación del espacio perinuclear de la envoltura nuclear. A nivel citoplasmático se observa dilatación de las cisternas del retículo endoplásmico y degeneración mitocondrial intensa (Fig.14C).

A partir de los 60 min, las células U937 tratadas con SB se caracterizan por mostrar cambios degradativos intensos con disolución nuclear –cariolisis- y citoplasmática, intensa tumefacción mitocondrial y desintegración de las mismas, así como ruptura y desaparición de la membrana plasmática (Fig.14D).

3.2. Efecto de HEMA (2-Hidroxietilmetacrilato)

En la Figura 15 presentamos el efecto de HEMA sobre la morfología de las células U937. Las células controles se caracterizan por presentar una forma irregularmente esférica con un retículo endoplásmico rugoso y mitocondrias con aspecto de ortotípico. Asimismo los núcleos presentan una ubicación central con abundante eucromatina y nucleolos evidentes (Fig.15A).

Tras 5 min y 15 min de la adición de HEMA se observan escasas modificaciones ultraestructurales. Es importante destacar en estos tiempos el desarrollo en las células de extensiones citoplasmáticas carentes de organelas celulares –blebs- (Fig.15B,C). A nivel nuclear no es posible observar cambios con respecto a las células controles.

Entre los 30 y 60 min de tratamiento con HEMA la morfología de las células muestran una superficie de marcada irregularidad respecto a las controles, debido a la presencia de acentuadas extensiones citoplasmáticas tipo blebs carentes de organelas (Fig.15D). Estas últimas no ofrecen modificaciones significativas. El tamaño celular no sufre modificaciones significativas con respecto a los controles. Los núcleos presentan características similares a los de las células controles.

A los 120 min las células U937 muestran ya procesos degradativos importantes a nivel citoplasmático –alteraciones de las organelas-, vacuolizaciones, desaparición o destrucción total de membrana plasmática y aparición a nivel nuclear de importantes signos de cariólisis y ocasional concentración de la cromatina (Fig.15E).

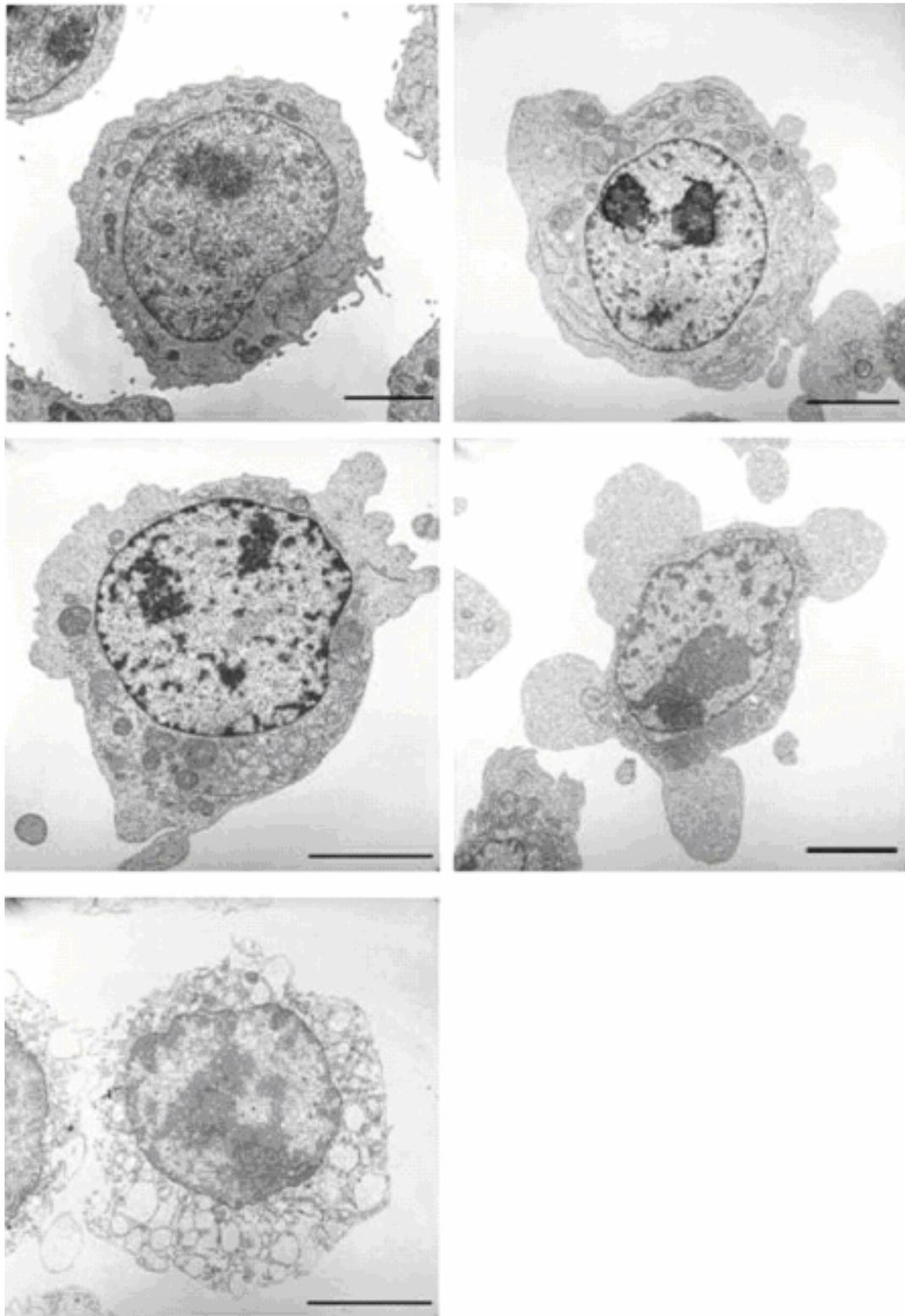


Fig.15. Efecto del HEMA sobre la ultraestructura de las células U937. A) Las células controles muestran una morfología ortotípica. B y C) Tras 5' y 15' se observan tumefacción de mitocondrias, vacuolas citoplasmáticas y la aparición de blebs a nivel de la superficie celular. D) A los 30' las células U937 muestran degeneración intensa de mitocondrias y deformaciones importantes a nivel de la superficie celular. E) Tras 120' se observa disolución del citoplasma celular así como desaparición de la membrana plasmática. Escala: 5 μ m

3.3. Efecto de los Sistemas Adhesivos Dentales sobre la composición elemental de la línea celular U937

3.3.1. Análisis Cualitativo

3.3.1.1. Efecto de Single Bond (3M)

En la Figura 16 mostramos los espectros de rayos X de células U937 controles y células a las que se le adicionó 5 μ l SB. El análisis cualitativo pone de relieve la presencia de los elementos Na, Mg, P, S, Cl y K (Fig.16A). Nuestros resultados denotan que la adición de SB induce cambios en dichos elementos. Tras 5 min podemos observar un incipiente crecimiento del Na y una leve disminución del K con respecto a los espectros obtenidos de los controles, mientras que el Cl se mantiene sin cambios (Figura 16B). A los 15 min esta situación se mantiene, observándose sólo un pequeño incremento del Cl (Fig.16C). Tras 30 min de adicionado SB se observa como el Na continua su ascenso mientras que el K evidencia una ligera disminución; así el Cl se mantiene sin cambios (Fig.16D). A los 60 min estamos en presencia de un gran incremento en el pico del Na y un ligero ascenso del Cl, el cual se acompaña de un descenso abrupto del K (Fig.16E). La Figura 16F se muestra el comportamiento de los espectros en los controles iniciales y finales. En relación al Ca no fue posible detectar su presencia en los espectros de rayos-X de células procedentes de células controles y tratadas.

3.3.1.2. Efecto del HEMA (2-Hidroxietilmetacrilato)

En la Figura 17 mostramos los espectros de rayos-X generados de células U937 controles y con la adición de HEMA. El análisis cualitativo pone de relieve la presencia de los elementos Na, Mg, P, S, Cl y K (Fig.17A). La exposición de las células U937 al HEMA produce cambios progresivos en los espectros de rayos-X generados por las muestras. Tras 5 min y 15 min no se observan cambios en la composición elemental de las células en contacto con HEMA con respecto a los controles (Fig.17B/C). Sin embargo a los 30 min comienza a vislumbrarse un ligero aumento del Na, mientras que el Cl y K se mantienen sin cambios. Asimismo, a los 60 min (Fig.D) vemos como el Na sigue su progresivo aumento alcanzando a los 120 min su máxima expresión (Fig.E). En relación al K se observa un descenso progresivo y absoluto en los tiempos referidos, mientras que el Cl no muestra

cambios algunos con respecto a los controles. En cuanto al Ca, como en la experiencia anterior, tampoco fue posible detectar células controles y tratadas con HEMA.

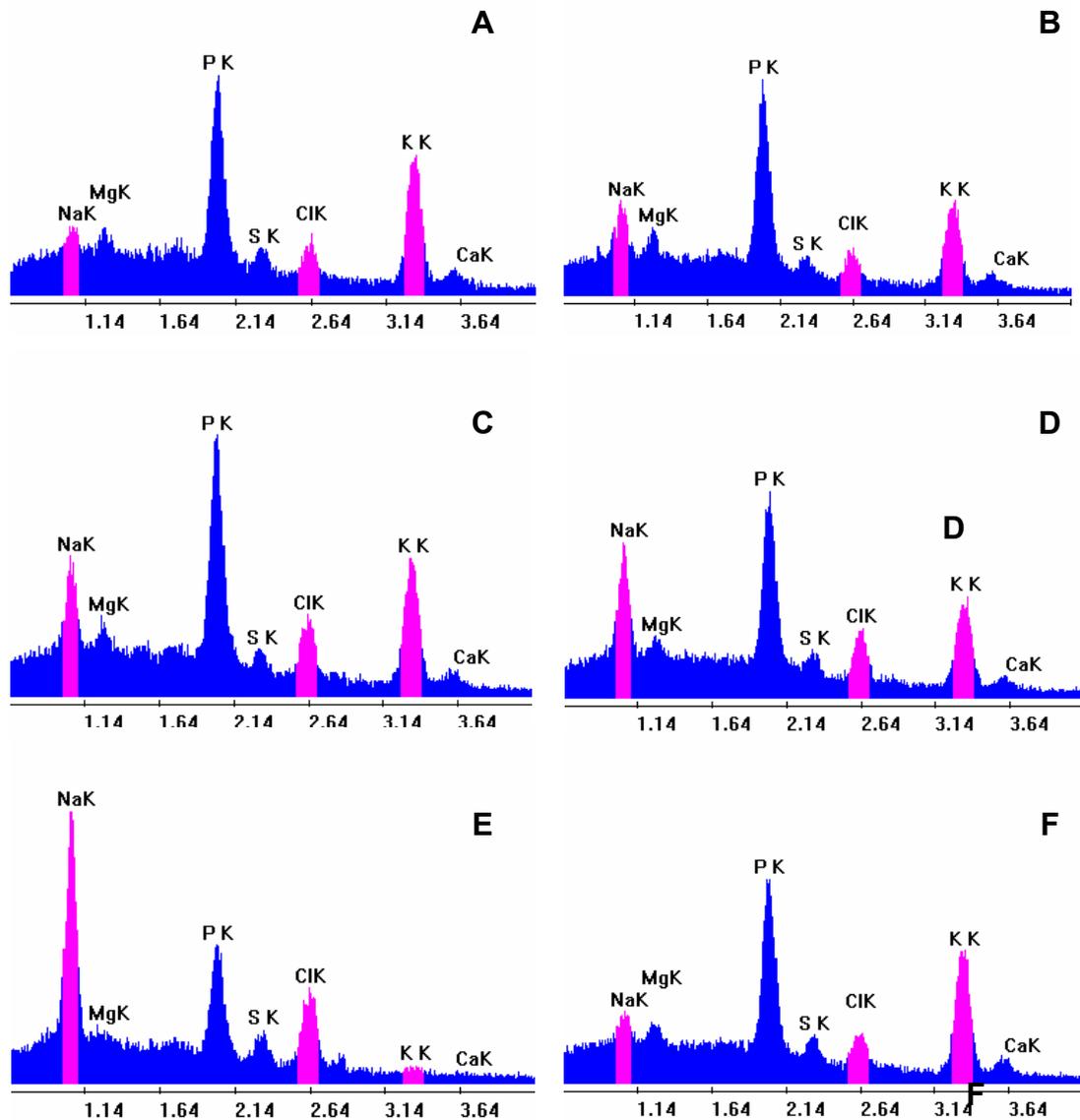


Fig.16. Espectros de rayos X de células U937. Control inicial (A) y final (F) y células tratadas con 5 μ l de SB durante 5 min (B), 15 min (C), 30 min (D), 60 min (E). Las células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodesecadas. Las muestras fueron analizadas bajo las condiciones descritas en Material y Métodos.

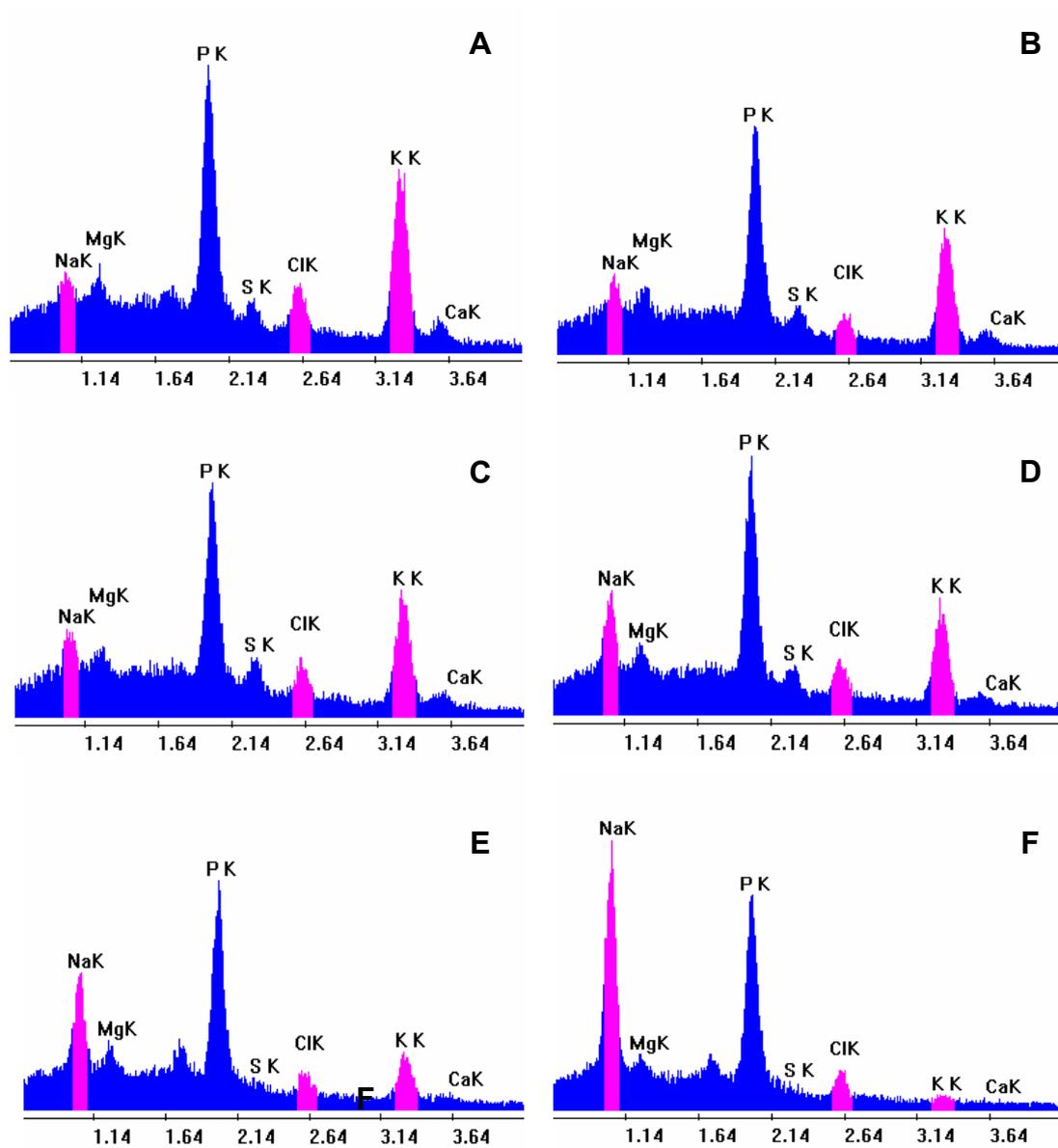


Fig.17. Espectros de rayos X de células U937. Controles (A) y células tratadas con 180 mM de HEMA durante 5 min (B), 15 min (C), 30 min (D), 60 min (E) y 120 min (F). Las células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodesecadas. Las muestras fueron analizadas bajo las condiciones descritas en Material y Métodos.

3.3.2. Análisis Cuantitativo

Para evaluar las alteraciones en las concentraciones de Na, Mg, P, S, Cl, K tras la exposición de las células U937 a los sistemas adhesivos dentales, se procedió al estudio cuantitativo aplicando el método de la razón pico/fondo (método P/B), calculando la concentración elemental -en mmol/kg masa seca- de todos los elementos en relación a patrones de calibración de dextrano 20% que contienen concentraciones conocidas de sales inorgánicas.

3.3.2.1. Efecto de Single Bond (3M)

a) Elementos difusibles

-Sodio (Na): el tratamiento con 5 μ l de SB induce un incremento progresivo y significativo en la concentración de Na (Fig.18). Dicho incremento es importante a los 5 min siendo levemente superior tras los 15 min y 30 min, llegando a los 60 min a su máxima expresión para luego disminuir a los 120 min, pero manteniéndose un aumento notablemente significativo con respecto al control. En la Figura 19 se muestra el Histograma de distribución de frecuencias para dicho elemento.

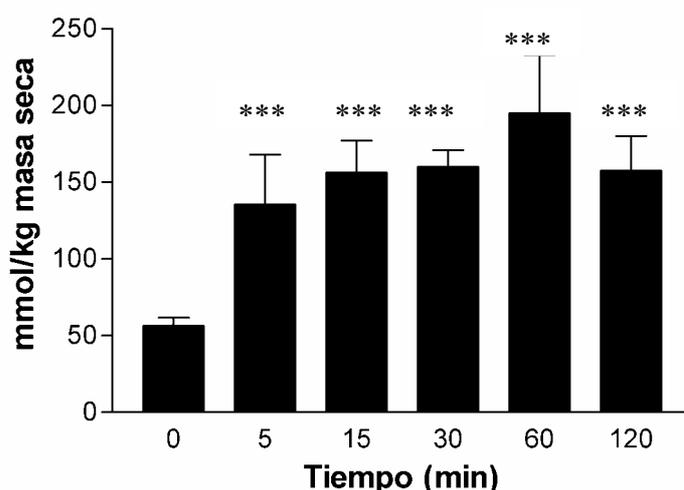


Fig.18. Efecto del Single Bond (3M) sobre el contenido elemental de Na (mmol/kg de masa seca). Las células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodesecadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en el apartado Material y Métodos. Los datos son representativos de la media de 4 experimentos independientes +/- error estándar de la media. (***) $p < 0.001$.

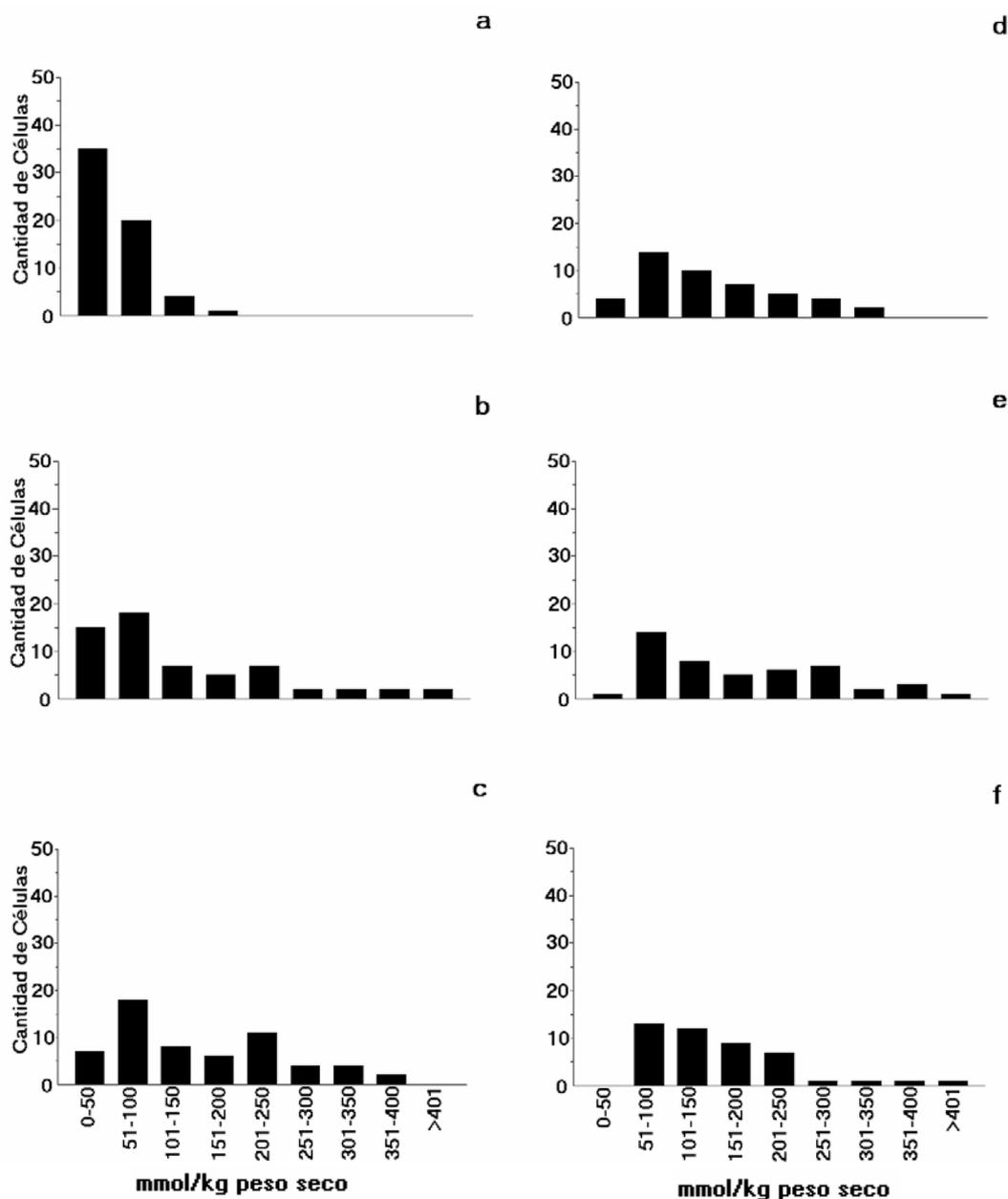


Fig.19. Histogramas de distribución de frecuencias del contenido elemental en Na. Células U937 controles (a) e incubadas con 5 μ l Single Bond (3M) durante 5 min (b), 15 min (c), 30 min (d), 60 min (e), 120 min (f). Las células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodesecadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en Material y Métodos. Los datos son representativos del análisis de 60 células procedentes de 4 experimentos independientes.

-Cloro (Cl): El SB no induce cambios llamativos en la concentración de Cl ya que vemos que existen variaciones leves de aumentos y descensos, pero que no son estadísticamente significativos (Fig.20). En la Figura 21 mostramos el histograma de distribución de frecuencias para dicho elemento.

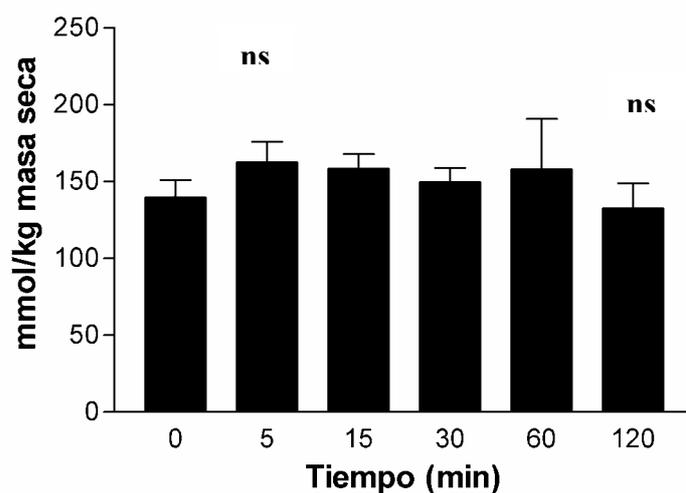


Fig.20. Efecto del Single Bond (3M) sobre el contenido elemental de Cl (mmol/kg de masa seca). Las células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodesecadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en el apartado Material y Métodos. Los datos son representativos de la media de 4 experimentos independientes +/- error estándar de la media (ns $p < 0.05$).

-Potasio (K): Las células U937 expuestas a SB muestran a los 5 min un descenso importante y estadísticamente significativo, el cual continúa en forma leve hasta los 15 min para luego tener a los 30 min un ligero incremento y volver a descender en forma abrupta a los 60 min. Tras 120 min vemos que se genera un pequeño incremento del K pero este sigue siendo significativamente menor con respecto al control (Fig.22). En la Figura 23 mostramos el histograma de distribución de frecuencias para dicho elemento.

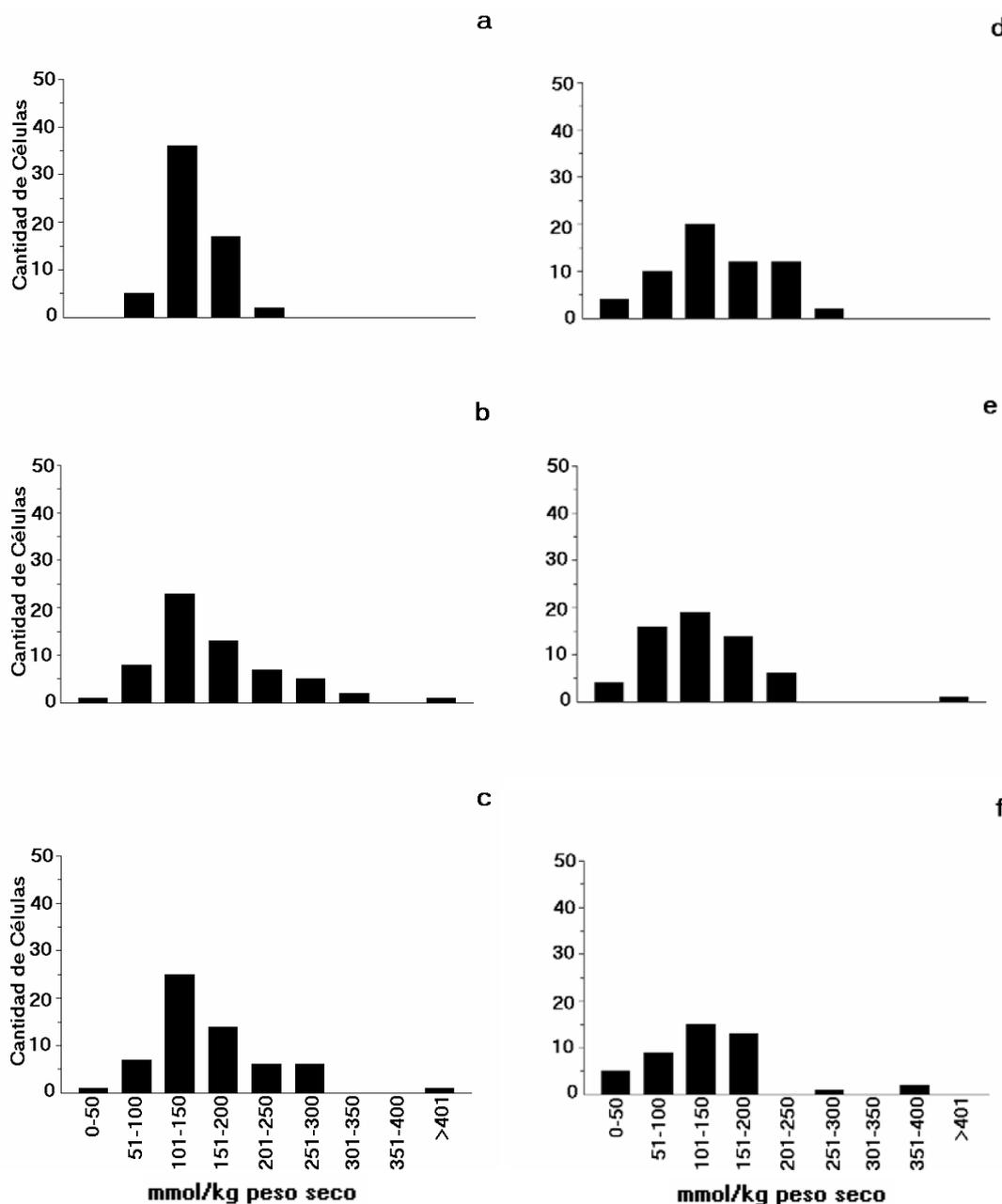


Fig.21. Histogramas de distribución de frecuencias del contenido elemental en Cl. Las células U937 controles (a) e incubadas con 5 μ l Single Bond (3M) durante 5' (b), 15' (c), 30' (d), 60' (e), 120' (f). Las células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodesecadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en Material y Métodos. Los datos son representativos del análisis de 60 células procedentes de 4 experimentos independientes.

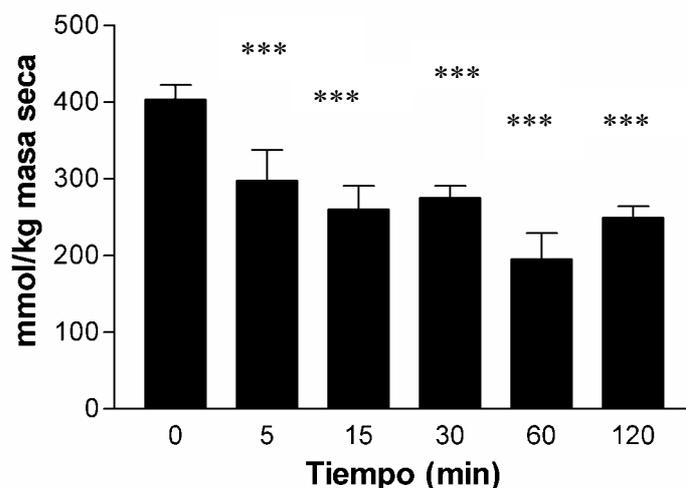


Fig.22. Efecto del Single Bond (3M) sobre el contenido elemental de K (mmol/kg de masa seca). Las células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodesecadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en el apartado Material y Métodos. Los datos son representativos de la media de 4 experimentos independientes +/- error estándar de la media. (***) $p < 0,001$

b) Elementos no difusibles

- Fósforo (P): Tras la adición de SB y a los 5, 15, 60 y 120 min se produce una disminución significativa en relación con las células controles (Fig.24).

-Magnesio (Mg): Tras la adición de SB se comprueba un descenso significativo a partir de los 15 min (Fig.25).

-Azufre (S): El SB generó sobre las células U937 oscilaciones no significativas hasta los 60 min. Nuestros resultados demuestran a los 120 min un descenso significativo (Fig.26).

En las Figuras 27, 28 y 29 mostramos el Histograma de distribución de frecuencias para el P, Mg, y S respectivamente.

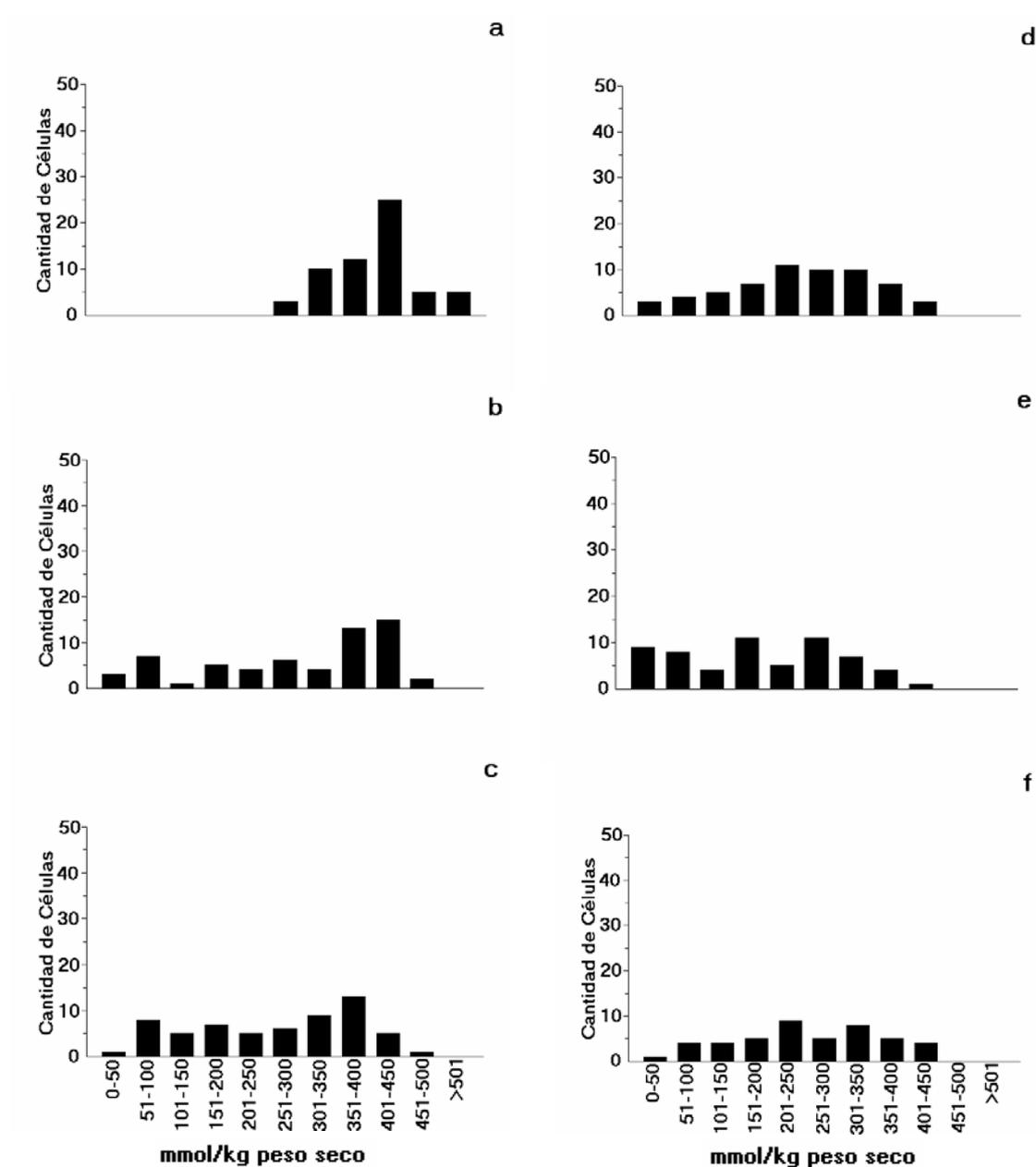


Fig.23. Histogramas de distribución de frecuencias del contenido elemental en K. Células U937 controles (a) e incubadas con 5 μ l Single Bond (3M) durante 5' (b), 15' (c), 30' (d), 60' (e), 120' (f). Las células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodeseccadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en Material y Métodos. Los datos son representativos del análisis de 60 células procedentes de 4 experimentos independientes.

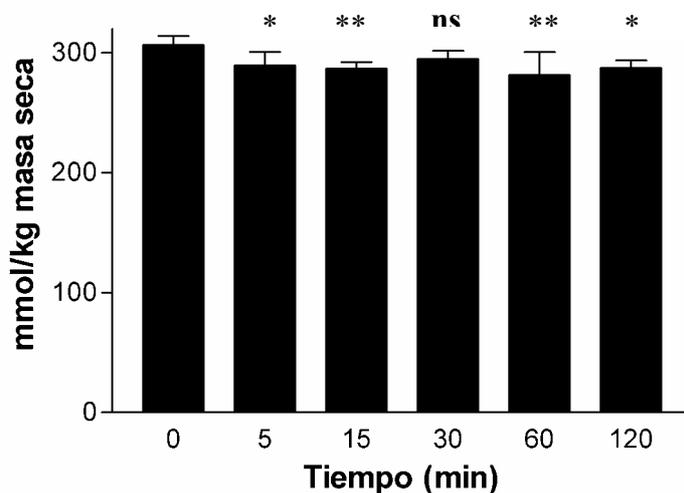


Fig. 24. Efecto del Single Bond (3M) sobre el contenido elemental de P (mmol/kg de masa seca). Las células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodesecadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en el apartado Material y Métodos. Los datos son representativos de la media de 4 experimentos independientes +/- error estándar de la media. (ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

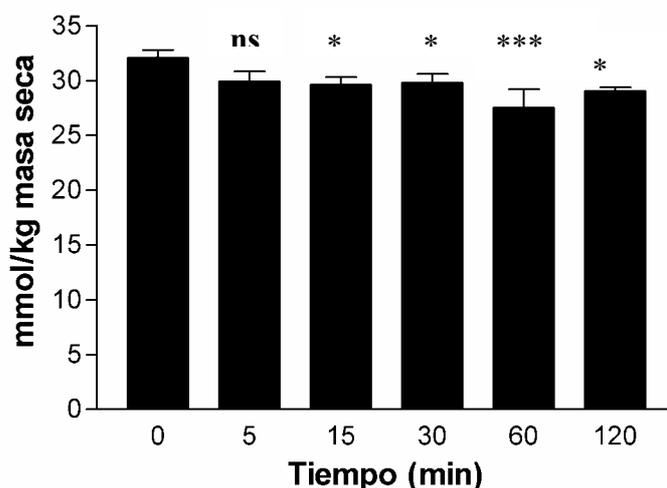


Fig.25. Efecto del Single Bond (3M) sobre el contenido elemental de Mg (mmol/kg de masa seca). Las células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodesecadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en el apartado Material y Métodos. Los datos son representativos de la media de 4 experimentos independientes +/- error estándar de la media (ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

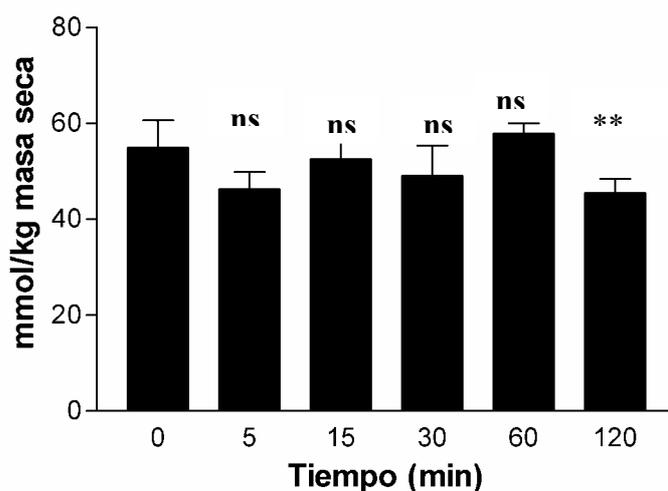


Fig.26. Efecto del Single Bond (3M) sobre el contenido elemental de S (mmol/kg de masa seca). Las células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodesecadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en el apartado Material y Métodos. Los datos son representativos de la media de 4 experimentos independientes +/- error estándar de la media (ns $p > 0,05$, ** $p < 0,01$).

c) Índice K/Na

El efecto del SB sobre la relación K/Na es mostrada en la Figura 30. Nuestros resultados muestran un descenso brusco y muy significativo a los 5 min para luego hacerlo en forma lenta y progresiva hasta los 120 min con respecto a las células control.

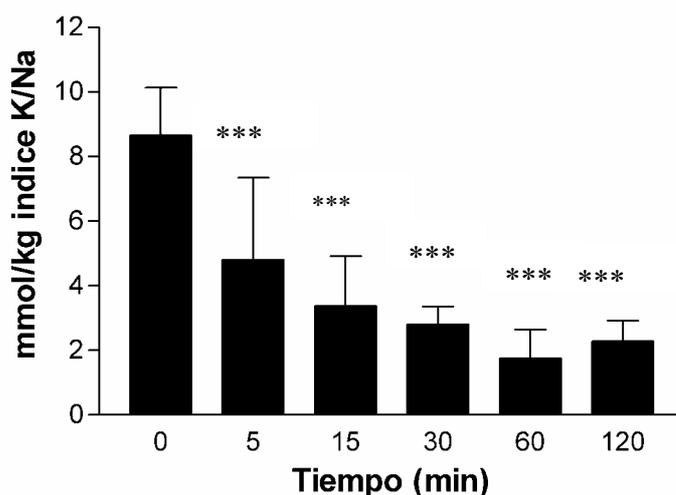


Fig.30. Efecto del Single Bond (3M) sobre el contenido elemental del índice K/Na (mmol/kg de masa seca). Las células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodesecadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en el apartado Material y Métodos. Los datos son representativos de la media de 4 experimentos independientes +/- error estándar de la media (***) $p < 0,001$.

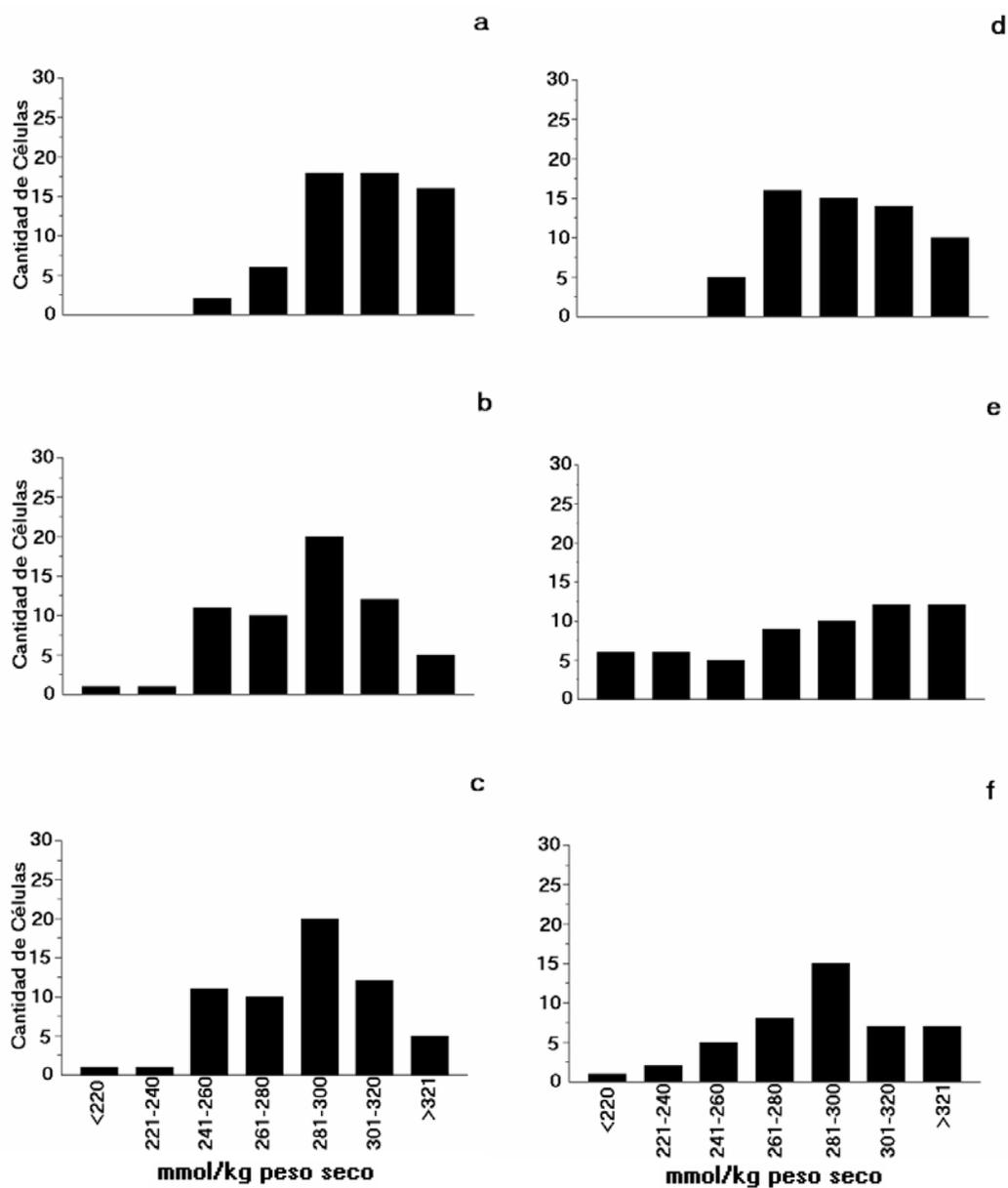


Fig.27. Histogramas de distribución de frecuencias del contenido elemental en *P.* Células U937 controles (a) e incubadas con 5 μ l Single Bond (3M) durante 5 min (b), 15 min (c), 30 min (d), 60 min (e), 120 min (f). Las células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodesecadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en Material y Métodos. Los datos son representativos del análisis de 60 células procedentes de 4 experimentos independientes.

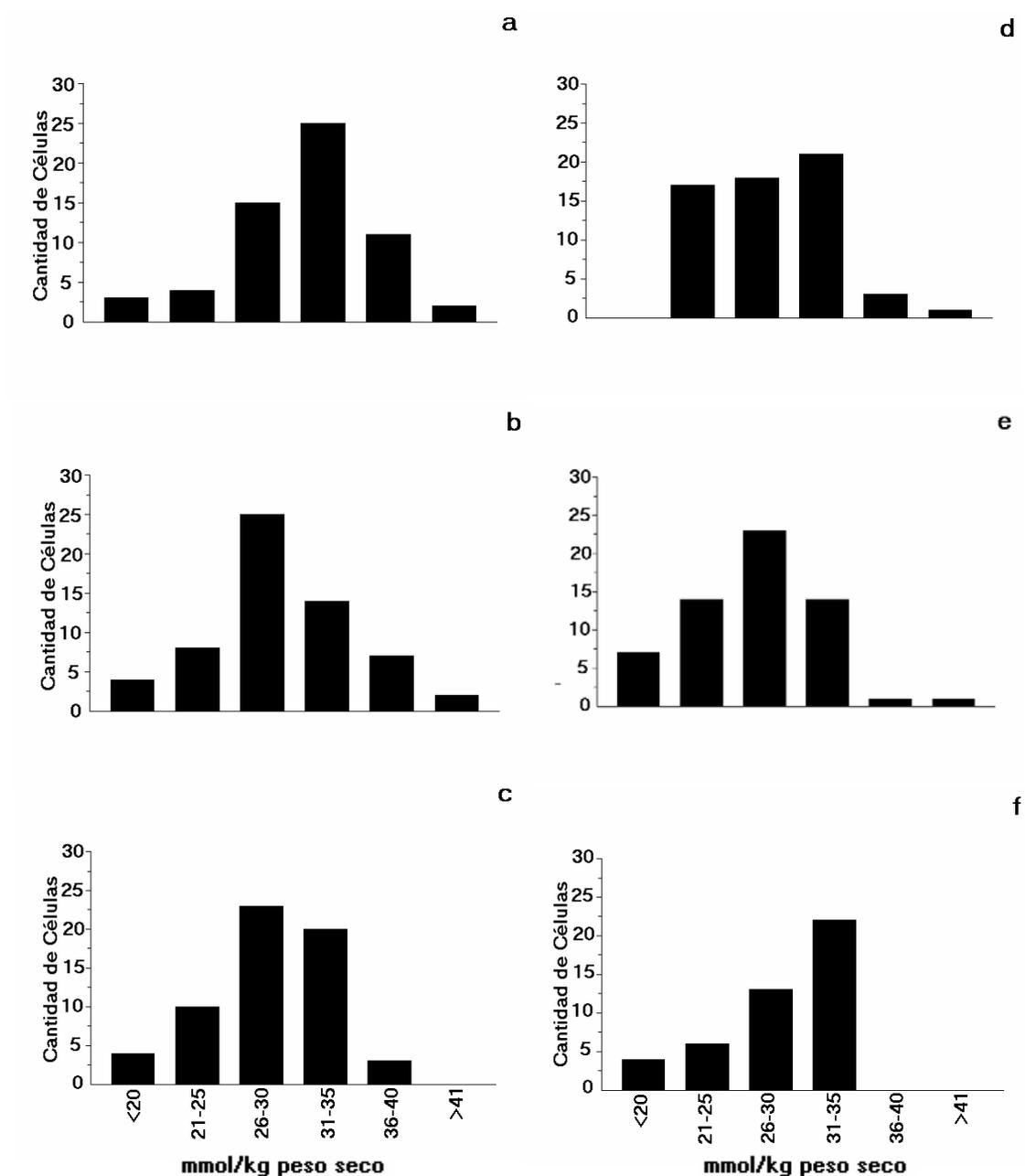


Fig.28. Histogramas de distribución de frecuencias del contenido elemental en Mg. Células U937 controles (a) e incubadas con 5 μ l Single Bond (3M) durante 5 min (b), 15 min (c), 30 min (d), 60 min (e), 120 min (f). Las células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodeseccadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en Material y Métodos. Los datos son representativos del análisis de 60 células procedentes de 4 experimentos independientes.

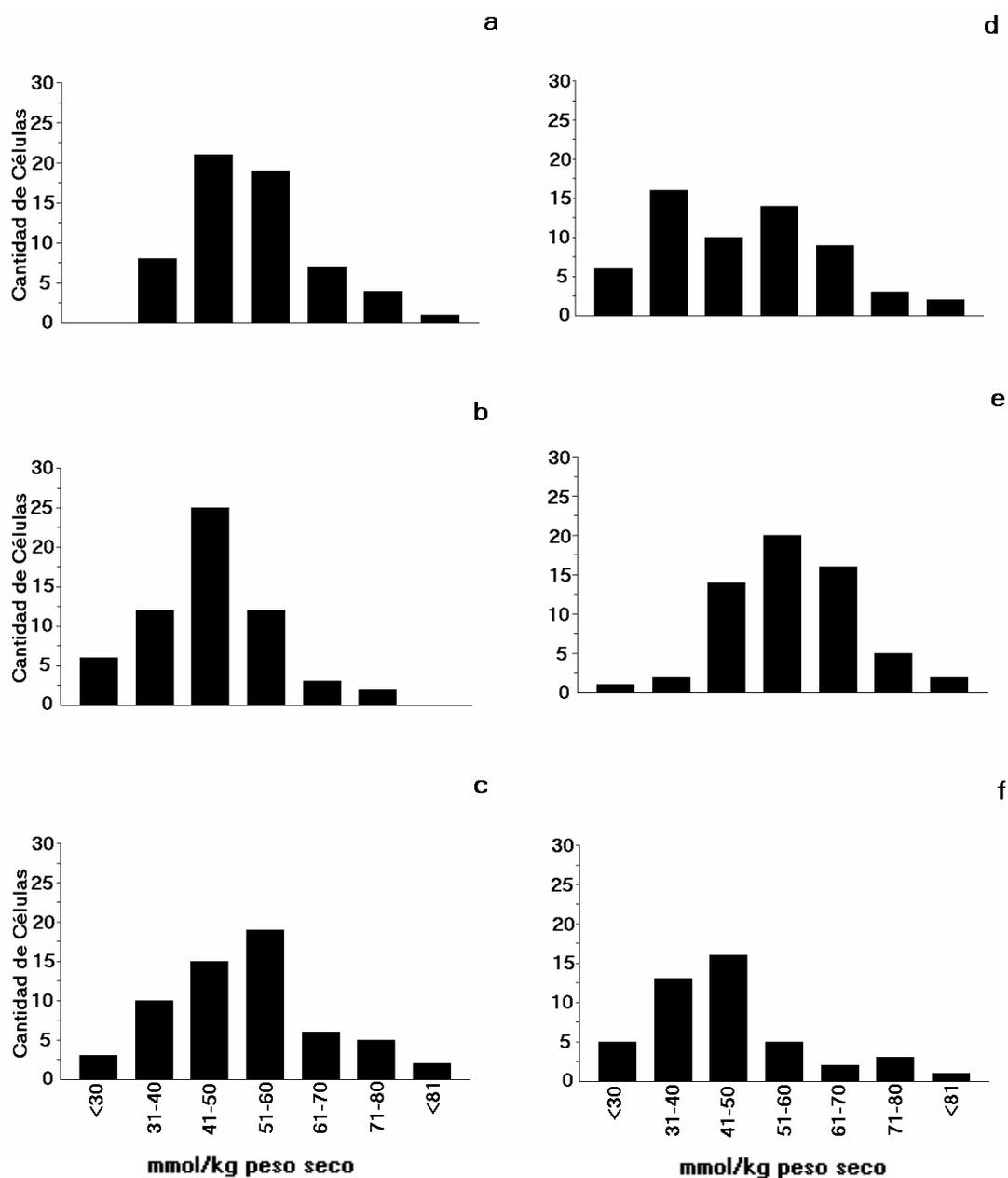


Fig.29. Histogramas de distribución de frecuencias del contenido elemental en *S. Células U937* controles (a) e incubadas con 5 μ l Single Bond (3M) durante 5 min (b), 15 min (c), 30 min (d), 60 min (e), 120 min (f). Las células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodeseccadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en Material y Métodos. Los datos son representativos del análisis de 60 células procedentes de 4 experimentos independientes.

3.3.2.2. Efecto de HEMA (2-Hidroxietilmetacrilato)

a) Elementos difusibles

-Sodio (Na): La adición de 180 mM de HEMA sobre las células U937 induce a un incremento progresivo y significativo en la concentración de Na (Fig.31). Durante los 5 min y 15 min el aumento es leve y mantenido alcanzando a los 30 min un incremento significativo. A los 60 y 120 min existe un ascenso significativo en relación con las células control.

-Cloro (Cl): El HEMA genera una disminución significativa a los 5, 15, 30 y 60 min. Transcurrido 120 min el Cl alcanza niveles levemente superiores y no significativos respecto a los controles (Fig.32).

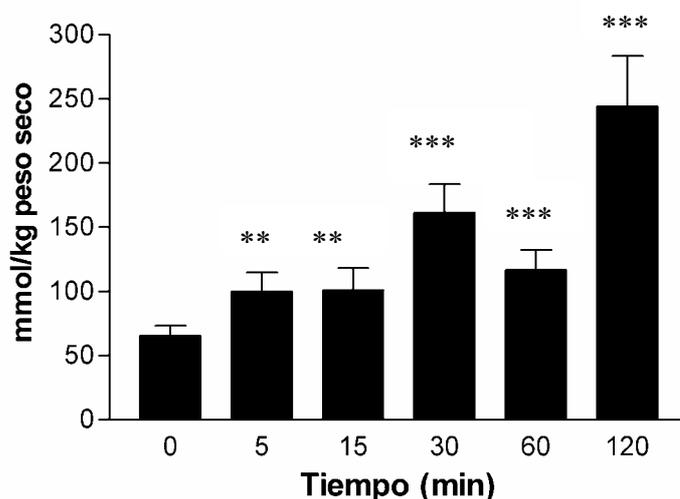


Fig.31. Efecto de HEMA sobre el contenido elemental del Na (mmol/kg de masa seca). Las células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodesecadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en el apartado Material y Métodos. Los datos son representativos de la media de 4 experimentos independientes +/- error estándar de la media. (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

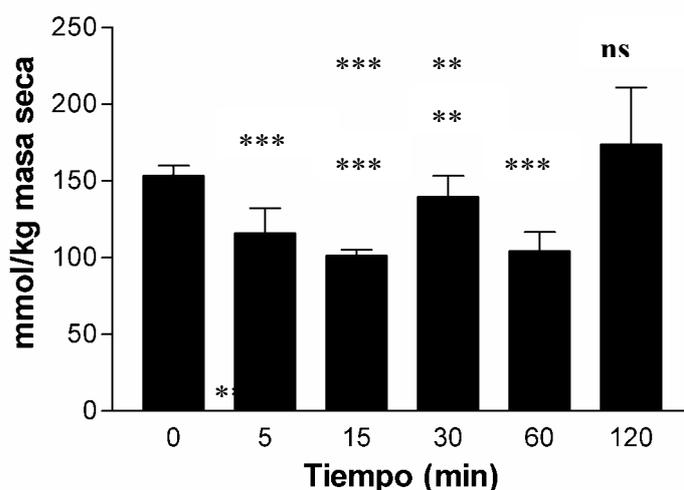


Fig.32. Efecto de HEMA sobre el contenido elemental del Cl (mmol/kg de masa seca) Células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodesecadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en el apartado Material y Métodos. Los datos son representativos de la media de 4 experimentos independientes +/- error estándar de la media. (***) $p < 0,001$, (**) $p < 0,01$, ns $p > 0,05$)

-Potasio (K): La adición del HEMA a las células U937 originan una disminución significativa a los 5, 15, y 30 min. A los 60 y 120 min existe un descenso significativo respecto a las células controles (Fig.33).

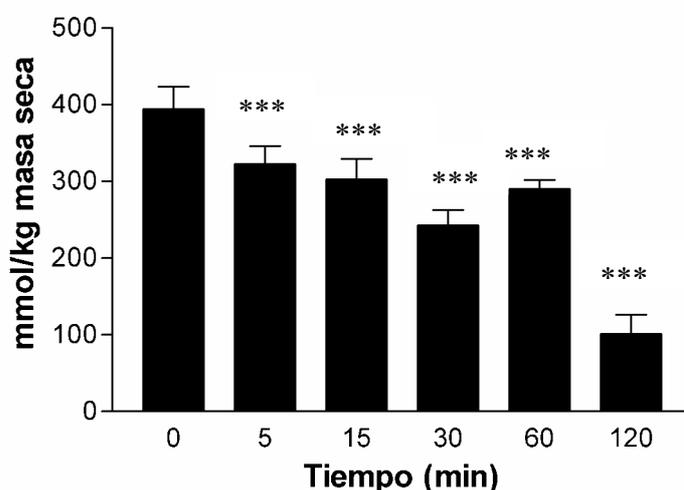


Fig.33. Efecto de HEMA sobre el contenido elemental del K (mmol/kg de masa seca). Células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodesecadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en el apartado Material y Métodos. Los datos son representativos de la media de 4 experimentos independientes +/- error estándar de la media (***) $p < 0,001$).

En las figuras 34, 35 y 36 mostramos los histogramas de distribución de frecuencias para el Na, Cl y K, respectivamente.

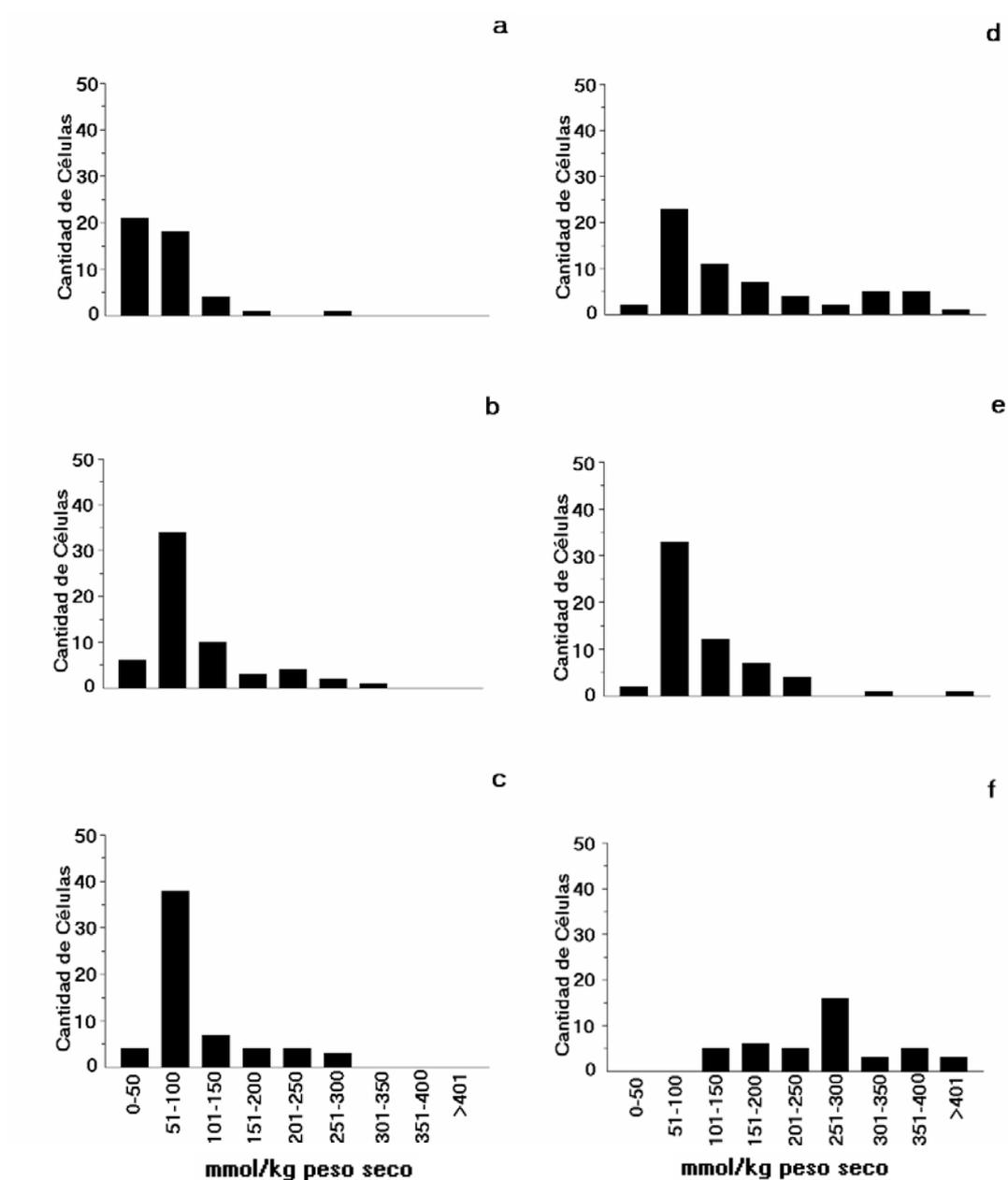


Fig.34. Histogramas de distribución de frecuencias del contenido elemental en Na. Células U937 controles (a) e incubadas con a 180 mM de HEMA durante 5 min (b), 15 min (c), 30 min (d), 60 min (e), 120 min (f). Las células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodesecadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en Material y Métodos.

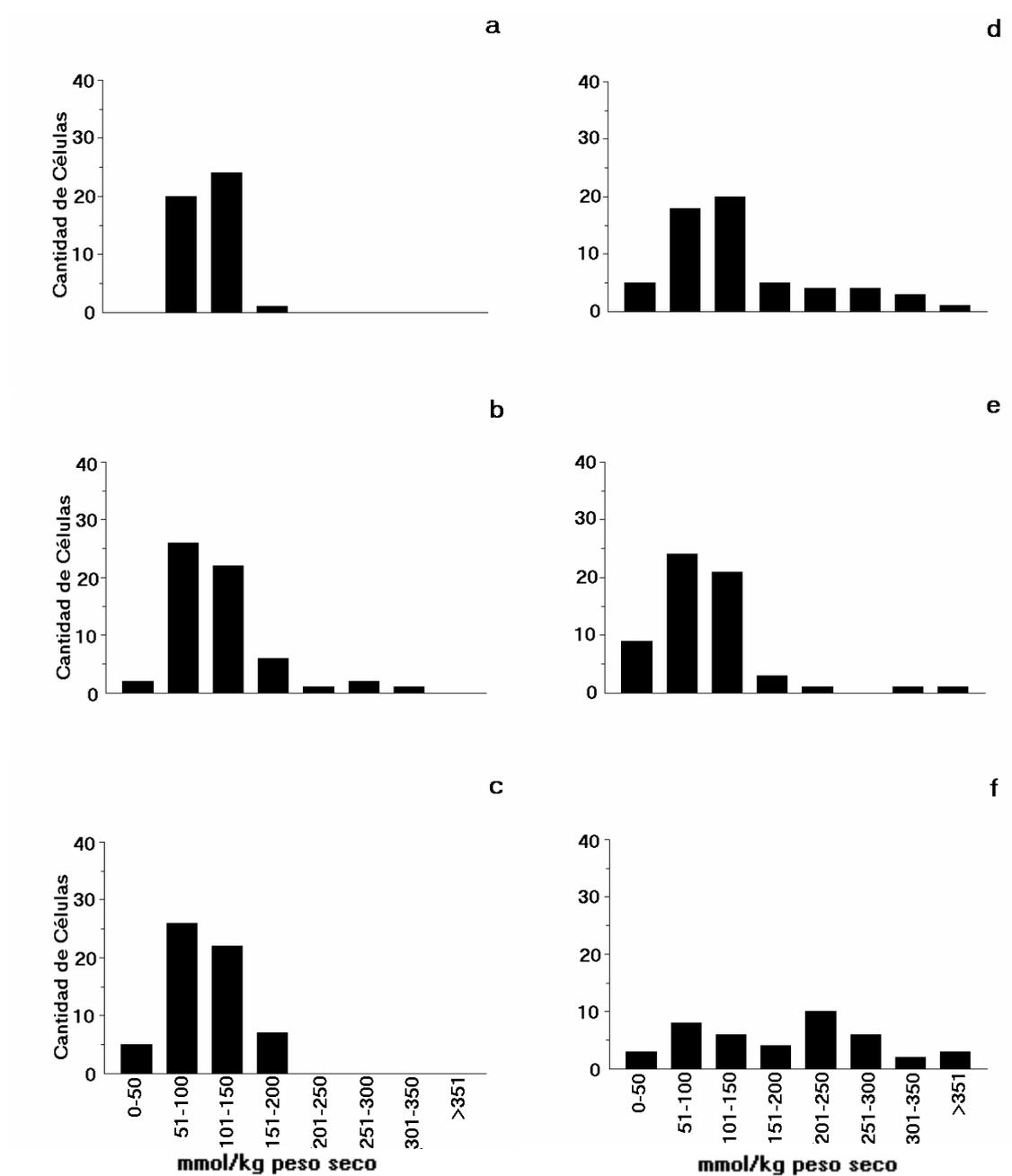


Fig.35. Histogramas de distribución de frecuencias del contenido elemental en Cl. Células U937 controles (a) e incubadas con 180 mM de HEMA durante 5 min (b), 15 min (c), 30 min (d), 60 min (e), 120 min (f). Las células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodesecadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en Material y Métodos.

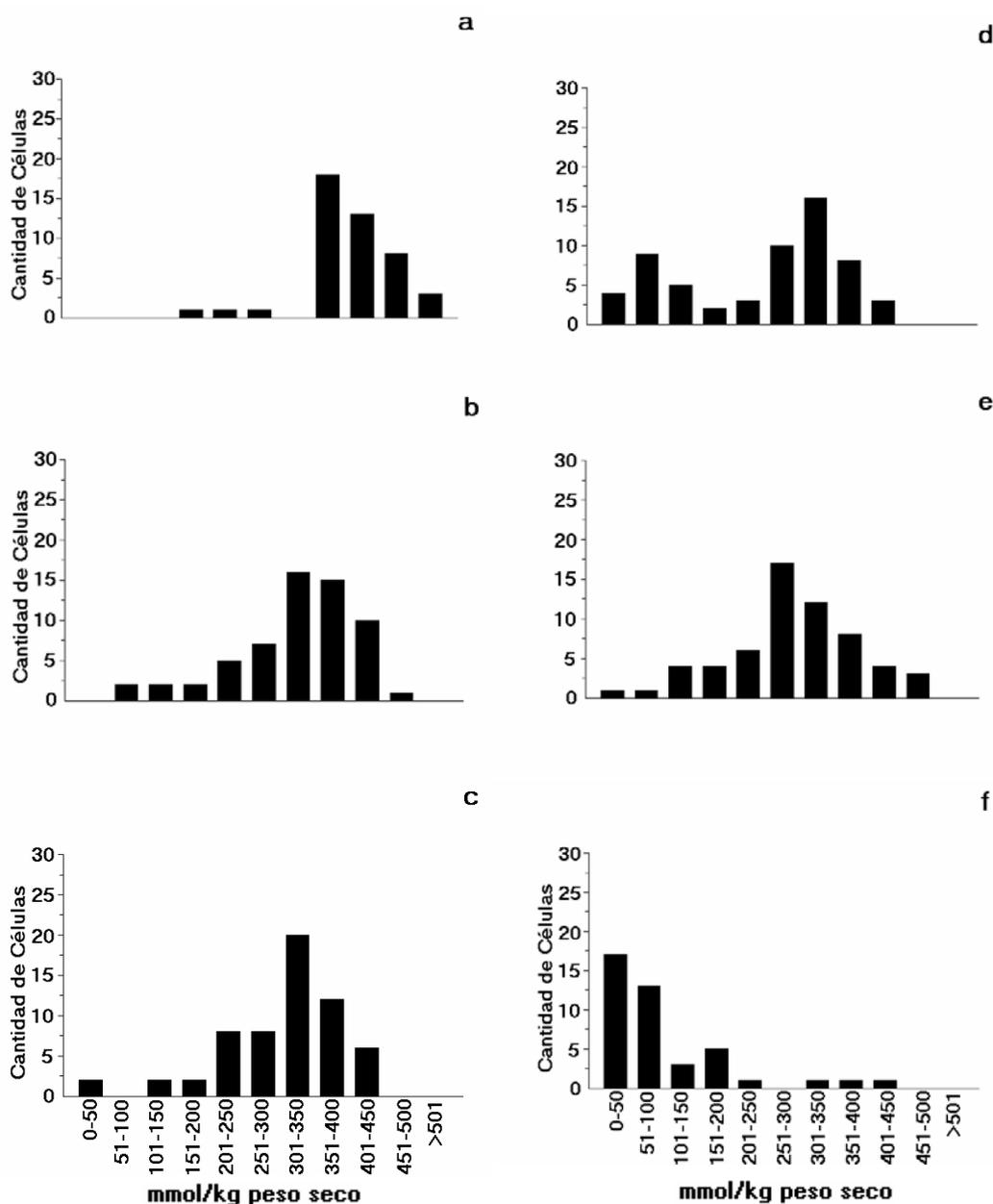


Fig.36. Histogramas de distribución de frecuencias del contenido elemental en K. Células U937 controles (a) e incubadas con 180 μ l de HEMA durante 5 min (b), 15 min (c), 30 min (d), 60 min (e), 120 min (f). Las células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodeseccadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en Material y Métodos.

b) Elementos no difusibles

-Fósforo (P): La adición del HEMA a las células no produce cambios significativos durante los primeros 60 min. A los 120 min se evidencia una ligera y significativa disminución con respecto al control (Fig.37).

-Magnesio: La adición de HEMA a las células no produce cambios de importancia, aunque existen ligeras variaciones de aumento y descenso. Transcurridos los 120 min se evidencia una disminución significativa con respecto a las células controles (Fig.38).

-Azufre (S): La adición de HEMA a las células no induce cambios significativos hasta los 60 min. Tras 120 min de incubación la disminución llega a niveles estadísticamente significativos con respecto a las células controles (Fig.39).

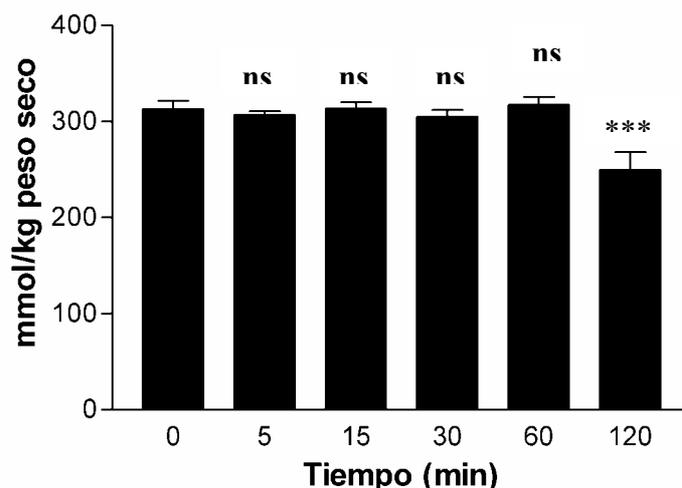


Fig.37. Efecto de HEMA sobre el contenido elemental del P (mmol/kg de masa seca). Las células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodesecadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en el apartado Material y Métodos. Los datos son representativos de la media de 4 experimentos independientes +/- error estándar de la media. (ns $p > 0,05$, *** $p < 0,001$)

En las figuras 40, 41 y 42 mostramos los histogramas de distribución de frecuencias para el P, Mg y S, respectivamente.

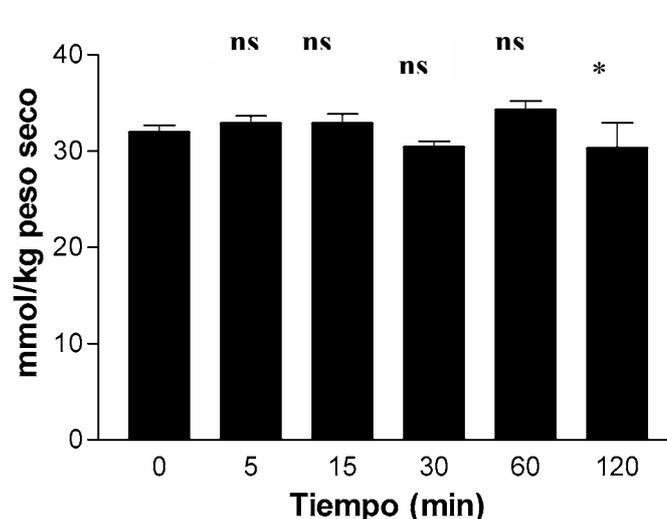


Fig.38. Efecto de HEMA sobre el contenido elemental del Mg (mmol/kg de masa seca). Las células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodesecadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en el apartado Material y Métodos. Los datos son representativos de la media de 4 experimentos independientes +/- error estándar de la media (ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$).

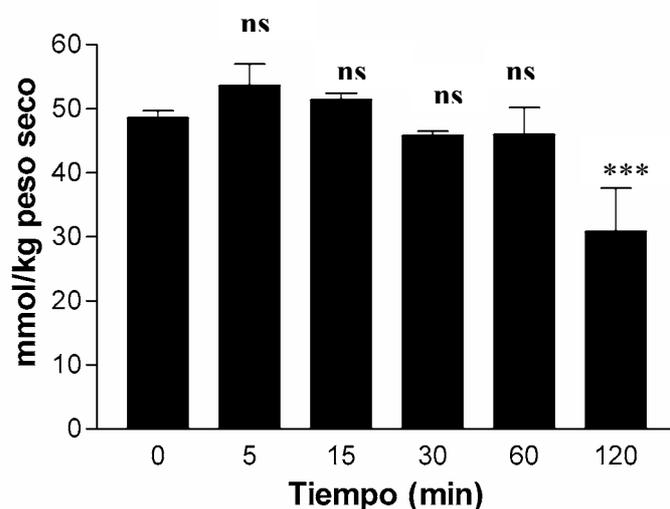


Fig.39. Efecto de HEMA sobre el contenido elemental del S (mmol/kg de masa seca). Las células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodesecadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en el apartado Material y Métodos. Los datos son representativos de la media de 4 experimentos independientes +/- error estándar de la media. (ns $p > 0,05$, *** $p < 0,001$)

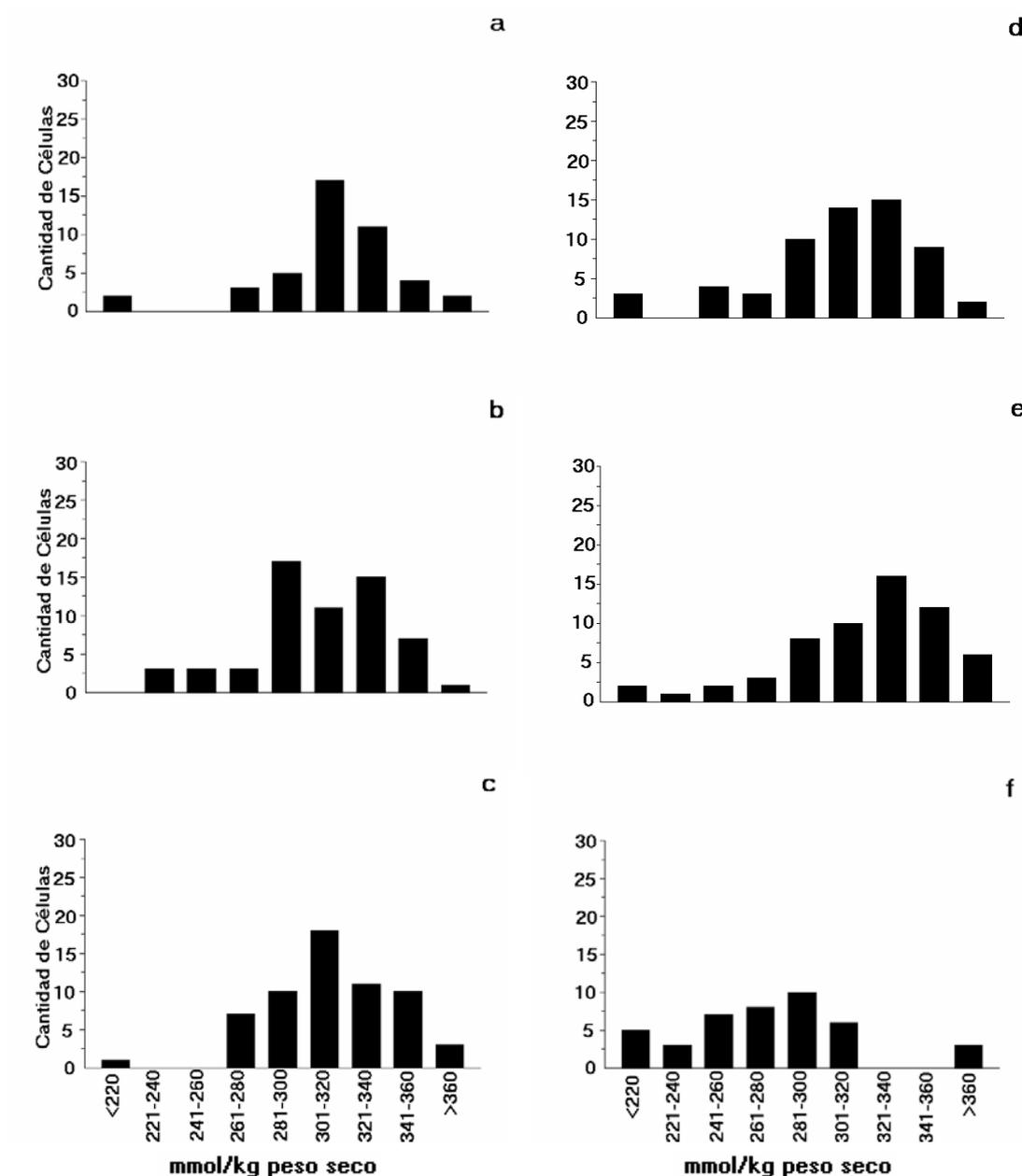


Fig.40. Histogramas de distribución de frecuencias del contenido elemental en P. Células U937 controles (a) e incubadas con 180 mM de HEMA durante 5 min (b), 15 min (c), 30 min (d), 60 min (e), 120 min (f). Las células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodeseccadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en Material y Métodos.

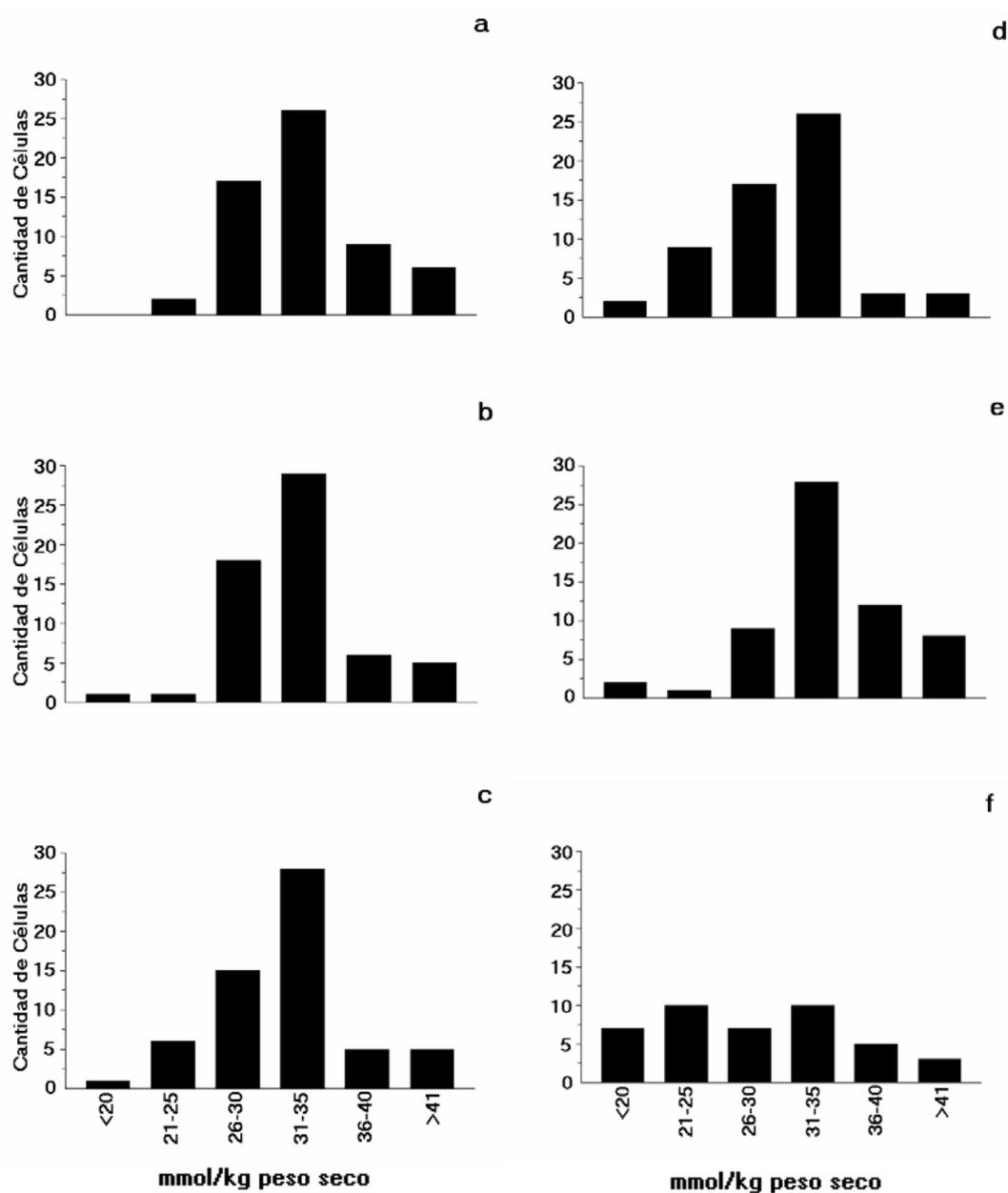


Fig.41. Histogramas de distribución de frecuencias del contenido elemental en Mg. Células U937 controles (a) e incubadas con 180 mM de HEMA durante 5 min (b), 15 min (c), 30 min (d), 60 min (e), 120 min (f). Las células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodeseccadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en Material y Métodos.

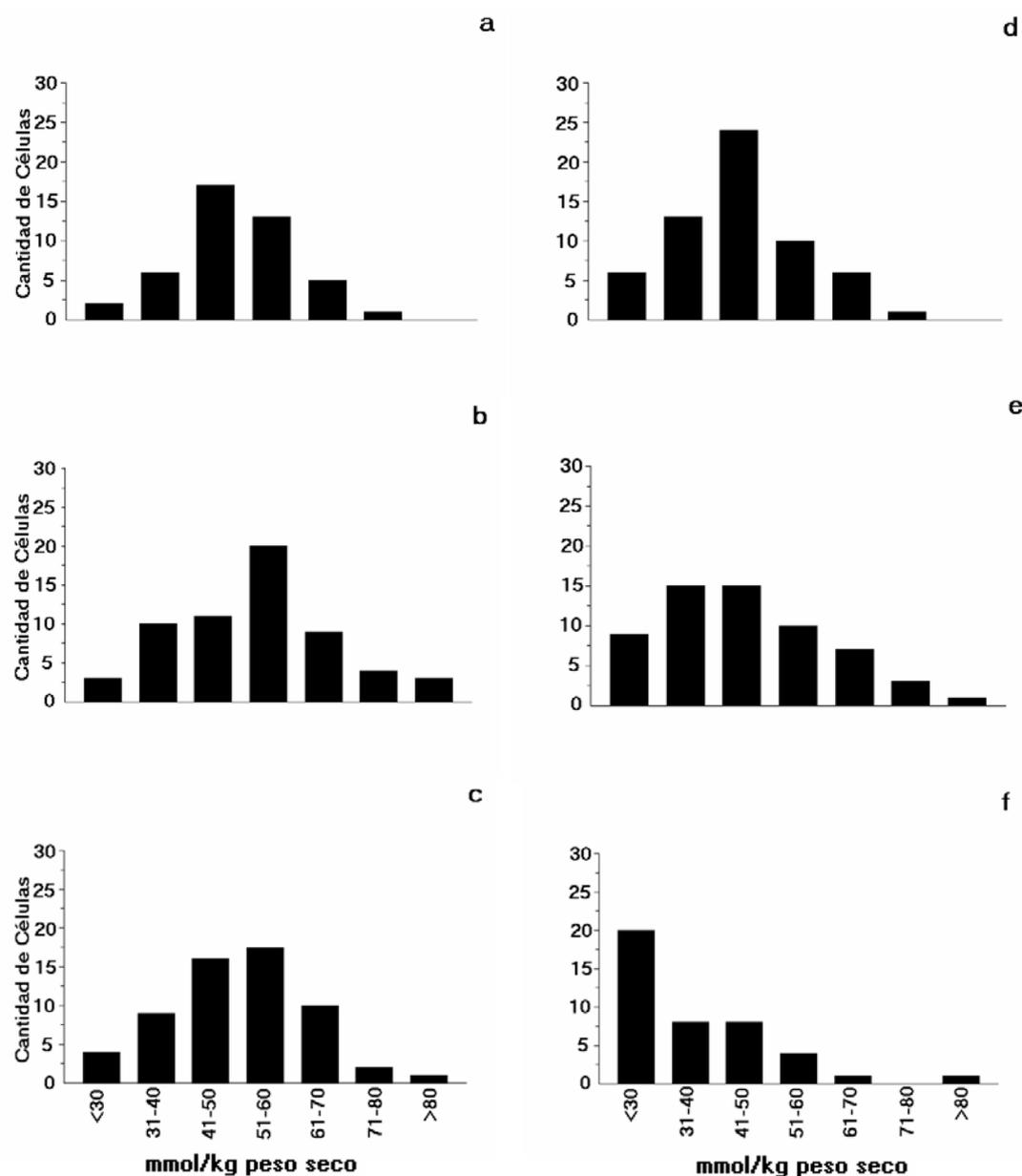


Fig.42. Histogramas de distribución de frecuencias del contenido elemental en *S. Células U937* controles (a) e incubadas con 180 mM de HEMA durante 5 min (b), 15 min (c), 30 min (d), 60 min (e), 120 min (f). Las células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodeseccadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en Material y Métodos.

c) Índice K/Na

El efecto del HEMA sobre la relación K/Na es mostrada en la Figura 43. Nuestros resultados indican un descenso significativo a los 5 min que se hace progresivo hasta los 120 min.

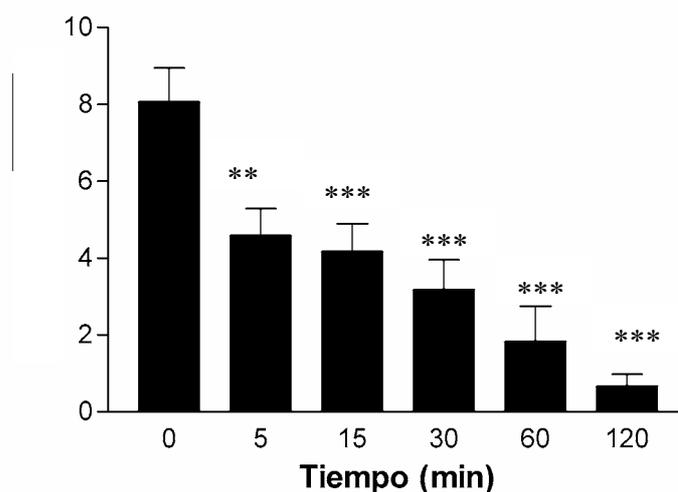


Fig.43. Efecto de HEMA sobre el contenido elemental del K/Na (mmol/kg de masa seca). Las células fueron depositadas sobre filtros de policarbonato mediante centrifugación, lavadas con agua destilada, criofijadas con nitrógeno líquido y criodesecadas. Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en el apartado Material y Métodos. Los datos son representativos de la media de 4 experimentos independientes \pm error estándar de la media (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

DISCUSIÓN

Los sistemas adhesivos dentales son materiales muy utilizados en la odontología de nuestros días, ya que los mismos han permitido mejorar significativamente el resultado terapéutico de las restauraciones dentales. En los últimos años se ha intensificado el estudio de estos materiales y sus efectos sobre el complejo dentino-pulpar para hacerlos más eficaces y evitar su posible toxicidad.

En este sentido algunos autores que han trabajado en dientes de primates o roedores, afirman que los sistemas adhesivos dentales estimulan la dentina terciaria reparadora en la exposición pulpar contribuyendo a formar puente dentinario (Akimoto et al., 1999; Cox et al., 1998; Murray et al., 2002; Kitasako et al., 2000). Por el contrario, otros estudios *in vivo* han descrito alteraciones citotóxicas de distinta naturaleza. Hebling et al. (1999) demostró que cuando las exposiciones pulpares en preparaciones cavitarias de premolares humanos eran recubiertas por el sistema adhesivo All Bond 2 (Bisco), el tejido pulpar mostraba células con degeneración hidrópica, intensa vasodilatación y un importante proceso de hialinización en la matriz extracelular. Además, a estas lesiones se añadía la ausencia total del puente dentinario y un proceso inflamatorio crónico, con numerosas células gigantes y macrófagos que rodeaban a los componentes del sistema adhesivo dental utilizado. Por su parte Pereira et al. (2000), describe lesiones similares sobre el tejido pulpar cuando realiza un recubrimiento pulpar directo con el sistema adhesivo Scotchbond MP-Plus (3M). Costa y Hebling (2003) demuestra, asimismo, que los componentes del Scotchbond MP-Plus (3M) son los principales responsables del proceso degenerativo de la pulpa, con independencia de que se utilicen previamente o no ácidos grabadores en el procedimiento de protección pulpar. Todo ello indica en palabras de Costa y Hebling (2003) “que el uso de algunos materiales dentales como los sistemas adhesivos dentales parece no ser apropiado para aplicarse en procedimientos clínicos de recubrimiento pulpar directo, que estos mismos se encuentran en un proceso de evolución y adecuación para su uso sobre el tejido dentinario, lo cual exige ser conocido en su totalidad. La indicación de material resinoso sobre exposiciones pulpares parece ser una equivocación que tal vez constituya una acción precipitada e irresponsable”.

En consecuencia, ante la necesidad de conocer el mecanismo de acción de los sistemas adhesivos dentales sobre las células del tejido pulpar, se han desarrollado distintos modelos “*in vitro*” con el objeto de evaluar la citotoxicidad de los mismos. Estos últimos surgen ante la necesidad de buscar una alternativa a la experimentación animal con la finalidad de poder evaluar con más facilidad la seguridad de los distintos compuestos que

actúan en el organismo humano. Los modelos “in vitro” poseen una serie de ventajas fundamentales que a continuación pasamos a enumerar: 1º constituyen una fuente inagotable de material biológico; 2º las células pueden ser manipuladas con mas facilidad que los animales; 3º las poblaciones celulares de los cultivos son homogéneas, por lo que es factible la reproductibilidad en los ensayos biológicos; y 4º se economiza tiempo y dinero así como el sacrificio de animales (Freshney, 1994). Entre los inconvenientes o desventajas que presenta este procedimiento metodológico es importante destacar la contaminación que pueden sufrir los cultivos si las condiciones de manipulación de las células no se realiza con la más absoluta asepsia, y por otro lado las alteraciones en la homogeneidad de los mismos si se realizan numerosos subcultivos (Freshsney, 1994).

Las células que habitualmente se utilizan para los ensayos “in vitro” son de origen embrionario o adulto y se emplean, en cultivos primarios recién obtenidos o transformadas en líneas celulares continuas. Las células embrionarias y las de origen tumoral se adaptan con más facilidad al desarrollo en cultivo que las células derivadas de tejidos adultos normales. En general, las células pueden ser mantenidas en forma de suspensión en un medio nutritivo adecuado, o adheridas a un soporte sólido formando una monocapa celular más o menos confluyente. Se denominan líneas celulares primarias a las obtenidas mediante subcultivos procedentes de un cultivo primario. En este caso, son células normales, inicialmente diferenciadas, pero que sufren un proceso de senescencia en cultivo que altera sus características morfológicas y que limita su vida. En el caso de las líneas continuas, las células se han hecho inmortales mediante un proceso de transformación que puede ocurrir de forma espontánea o ser inducida experimentalmente por virus, agentes químicos carcinogénicos o por radiaciones y constituyen el modelo experimental mas utilizado para evaluar la citotoxicidad a xenobióticos (Zucco, 1992). Las líneas celulares que se han utilizado en estudios experimentales de citotoxicidad de sistemas adhesivos dentales han sido de distinta naturaleza y origen, destacando entre ellos los fibroblastos de ratón 3T3 (Ratanasathien et al., 1995) y L929 (Kaga et al., 2001), las células odontoblástoides MDPC-23 (Costa et al., 1999), los monocitos-macrófagos humano THP-1 (Bouillaguet et al., 2000), las células neuronales (Kraemer et al., 1999) las células pulmonares A549 y L2 (Kehe et al., 2001), las células epiteliales de ratón (RK13) (Schuster et al., 2000), las células de pulpa humana (Spagnuolo et al., 2004a) y los fibroblastos humanos (Spagnuolo et al. 2004b) .

En la presente Tesis doctoral y con el objetivo de evaluar la citotoxicidad de los sistemas adhesivos dentales hemos utilizado como modelo experimental “in vitro” la línea

celular monoblástica de humano U937. Esta línea celular asegura una fuente de material biológico permanente y representa un buen material para los estudios de citotoxicidad. En este sentido, la línea celular U937 ha sido utilizada por distintos autores para evaluar morfológica, bioquímica y molecularmente los mecanismos de muerte celular inducidos por vía experimental (Fernandez-Segura et al., 1999; Zabiti et al., 2001; Lee et al., 2003; Tommasini et al., 2004; Yokohama et al., 2003; Ekelund et al., 2002; Tamura et al., 2002). A nuestro juicio constituye, por tanto, un excelente modelo celular para el diagnóstico diferencial del tipo de muerte celular inducido por el tratamiento y exposición a los sistemas adhesivos dentales. Recientemente Blottiere et al. (1995) y Cimpan et al. (2000) proponen la línea celular U937 como modelo para la evaluación de la citotoxicidad “in vitro” de biomateriales. Cimpan et al. (2000), además sugiere que debido al linaje monocítico de esta línea celular, la alteración de sus funciones al contacto con las resinas acrílicas podría afectar el comportamiento inmunológico local. En nuestro estudio, la utilización de la línea celular continua U937 nos ha permitido alcanzar los objetivos propuestos, esto es, evaluar la citotoxicidad de los sistemas adhesivos dentales mediante los ensayos de azul tripán, el estudio de los cambios morfológicos e iónicos a través de la microscopía electrónica de transmisión y la microscopía electrónica analítica respectivamente.

En relación con los estudios de citotoxicidad “in vitro” de los sistemas adhesivos dentales Ratanasathien et al. (1995), investigó los efectos originados por BISGMA, HEMA, TEGDMA y UDMA, componentes de los sistemas adhesivos dentales. En el estudio realizado, sobre la línea celular de fibroblastos de ratón 3T3, se evaluaron los efectos de cada uno de ellos así como los que originaban la interacción simultánea de los mismos. En este estudio se comprobó, asimismo, que el orden decreciente de toxicidad fue: BISGMA, UDMA, TEGDMA y HEMA después de 24 h y 72 h de exposición a estos productos en estado fluído y en distintas concentraciones. Hanks et al. (1991) estudió el efecto de 11 componentes de resinas compuestas sobre fibroblastos de ratón 3T3 entre ellos BISGMA, UDMA, TEGDMA, BPE, Alcanforquinona, Bisphenol A, mostrando que los mismos producían un efecto inhibitor importante sobre la síntesis de ADN, contenido total de proteínas y síntesis de proteínas. Tsutsui et al. (1998) por su parte, observó que el Bisphenol A producía una importante actividad genotóxica y de transformación celular. Por otra parte Hanks et al. (1992) mostró que 16 $\mu\text{mol/L}$ pueden causar un efecto irreversible en la síntesis de ADN, síntesis de proteínas, contenido total de proteínas y respiración mitocondrial a las 24 h.. Bouillaguet et al. (2000) por su parte comprobó que el HEMA en concentraciones subletales de hasta 1,5 mmol/L provocaba, en el transcurso de seis

semanas, una disminución en la proliferación de monocitos-macrófagos TPH-1 y alteraciones en la respiración mitocondrial. Los valores de HEMA hasta ahora comentados son muy inferiores a los que existen en los sistemas adhesivos utilizados en la clínica (Costa y Hebling, 2003).

En relación con el estudio de citotoxicidad de los sistemas adhesivos dentales Costa et al. (1999) ha investigado "in vitro" en estado fluído y polimerizado los sistemas adhesivos dentales Single Bond, Prime & Bond NT y Syntac Sprint aplicándolos sobre la línea celular odontoblastoide MDPC-23. A las 2 h, el material en estado fluído produjo importantes alteraciones morfológicas y trastornos en la respiración mitocondrial, así como una importante disminución en el número de células. La citotoxicidad se redujo cuando estos materiales se presentaron fotopolimerizados. Por su parte Kraemer et al. (1999) estudió el efecto citotóxico de cinco adhesivos dentales (Single Bond, Clearfil Liner Bond 2, Syntac SC, Prime & Bond 2.1 y Optibond Solo) sobre células neuronales, y comprobó que los mismos producían alteraciones importantes sobre la dinámica del citoesqueleto celular.

Los autores antes citados coinciden en el poder citotóxico de los sistemas adhesivos dentales y los monómeros que forman parte de ellos. Demuestran además que estos materiales poseen un comportamiento de dosis tiempo dependencia que dan origen a distintas alteraciones sobre las diferentes líneas celulares utilizadas.

En nuestro trabajo de Tesis doctoral y a los fines de evaluar la citotoxicidad de los sistemas adhesivos dentales se utilizaron SB, P&B NT, SS y el HEMA, componente muy presente en la mayoría de ellos. Los resultados de nuestros ensayos han puesto de relieve la disminución progresiva, en el transcurso de 2 h, de la viabilidad en la línea celular U937 cuando entran en contacto con los distintos sistemas adhesivos dentales en estado fluído. En nuestros ensayos el grupo de los productos comerciales SB, P&B NT y SS mostró una relación dosis tiempo dependencia destacando al SB como el que, con menor dosis, alcanzaba la DL_{50} a los 60 min. En cuanto a la respuesta temporal los tres productos mostraron una disminución gradual de la viabilidad, observándose que en caso del SB la curva se acentuaba más a las 2 h en relación con el resto. Nuestros ensayos ponen en evidencia que el SB es el más tóxico para la línea U937.

Por otro lado, el HEMA en los ensayos de viabilidad realizados en nuestra tesis doctoral, se comporta de modo similar a lo expuesto anteriormente en relación con los

sistemas adhesivos dentales. La particularidad consiste en que la DL_{50} la alcanza con una mayor dosis que la que se necesita para los productos comerciales y que la respuesta temporal se desarrolla con más regularidad. Nuestros resultados corroboran lo citado por otros autores, en cuanto al carácter citotóxico de los sistemas adhesivos dentales y del HEMA y ponen asimismo en evidencia la relación dosis tiempo dependencia. Estos resultados no necesariamente son compatibles con los estudios realizados en materiales fotopolimerizables (Costa et al., 1999).

En nuestro estudio para evaluar citotoxicidad hemos utilizado el método de exclusión vital del tripán azul, el cual permitió determinar la alteración a nivel de membrana. En este sentido Bouillaguet et al. (2000) seleccionó también este método, lo que le permitió observar una disminución en la proliferación de la línea monocito-macrófago THP-1, cuando esta se sometía a concentraciones subletales de HEMA. La determinación de las alteraciones de la permeabilidad de la membrana plasmática es uno de los métodos mas utilizados para poder evaluar el inicio de la lesión celular irreversible. Entre estos métodos destacan los del tripan azul, que hemos utilizado en esta tesis, yoduro de propidio y la determinación de la liberación de la enzima láctico deshidrogenasa (LDH). Chen y Wargner (2001) describen que en la pérdida de la membrana plasmática durante un proceso de anoxia se ponen de manifiesto tres fases. La fase inicial, donde la membrana plasmática es permeable a moléculas de 0,7 kDa, como el yoduro de propidio pero no al tripan azul. La fase 2 que se caracteriza porque la permeabilidad de la membrana es posible para moléculas de aproximadamente 3 kDa y por tanto incluye al tripan azul. Esta fase no reversible coincide con la aparición de mitocondrias no funcionales caracterizadas por un descenso en el potencial de membrana mitocondrial a diferencia de la fase 1. Ya en la fase 3 se describe un gran incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática y en consecuencia una facilitación para el paso de moléculas de tamaño más elevado como la LDH (140 kDa). En vista de estos resultados los citados autores sugieren no utilizar el yoduro de propidio para evaluar la integridad de la membrana plasmática al no poner en evidencia alteraciones irreversibles. Esta ha sido una de las razones para seleccionar en nuestro estudio el método de tripán azul. Se trata de un método que si bien permite caracterizar alteraciones de la membrana de tipo irreversible, no ofrece información alguna sobre el mecanismo involucrado en la muerte celular tanto desde una perspectiva morfológica como bioquímica.

Como expone Bouillaguet et al. (2000) el mecanismo por el que los sistemas adhesivos dentales actúan sobre las células es desconocido, aunque existe alguna

evidencia según la cual los monómeros resinosos de los sistemas adhesivos dentales se incorporarían a la bicapa lipídica de la membrana celular, la cual sería solubilizada por los propios monómeros y provocaría la muerte (Fujisawa et al., 1998; Caughman et al., 1999; Shuster et al., 2000). Por su parte Soheili Majd et al. (2003) y Walter et al. (2004) sugieren que el estrés oxidativo sería el causante de la citotoxicidad y que por tanto los antioxidantes podrían prevenir los posibles daños pulpares. Janke et al. (2003) por su parte observó que TEGDMA, en concentraciones de entre 5 a 7 mmol/L a las 24 h, desencadena un proceso de muerte apoptótico en fibroblastos humanos caracterizado por la traslocación de fosfatidilserina a la región externa de la membrana celular. Recientemente, Spagnuolo et al. (2004b) describe que tras la exposición de células de fibroblasto humano a concentraciones de hasta 10 mmol/L de HEMA, se desencadenaría una activación de caspasas, determinando, por tanto, un proceso de muerte celular apoptótico.

Los estudios que evalúan la citotoxicidad de los sistemas adhesivos dentales “in vitro” utilizan métodos que miden respiración mitocondrial, síntesis de proteínas, contenido total de proteínas, síntesis de ADN y permeabilidad de membrana. Todos ellos forman parte del gran desarrollo que en los últimos años han tenido las diferentes técnicas bioquímicas, y por tanto, nos ayudan a comprender mejor el mecanismo de muerte celular que tiene lugar en estas circunstancias, pero en ningún caso la define y tipifica desde una perspectiva integral. Es por ello que con el objeto de profundizar en los mecanismos de muerte involucrados en la citotoxicidad por sistemas adhesivos dentales, creímos fundamental utilizar la microscopía electrónica de transmisión al permitir, la utilización de esta metodología, sistematizar con mas claridad los mecanismos de apoptosis y necrosis celular (Kerr et al., 1972; Kerr, 2002). El criterio morfológico constituye aún en la actualidad el método mas apropiado para analizar el mecanismo de muerte celular inducido en diferentes condiciones experimentales (Lecoeur et al., 2001a; 2001b; Zabiti, 2002; Van Cruchten y Van Den Broeck, 2002; Otsuki, 2003).

De la bibliografía consultada escasos han sido los trabajos que han puesto de relieve la existencia de cambios ultraestructurales en relación con la toxicidad por sistemas adhesivos dentales. Podemos citar solamente a Cimpan et al. (2000) quién realizó una descripción de las alteraciones morfológica de las células U937 sometidas al contacto con resinas acrílicas de polimetacrilato. En el mismo el autor indica que las células U937 expuestas a resinas acrílicas, en distintas concentraciones a 24 y 48 h, inducen procesos de muerte celular por apoptosis y en menor proporción por necrosis. Los procesos

apoptóticos de las células U937 se caracterizaron por la disminución del volumen celular, condensación de la cromatina y fragmentación nuclear. Las mitocondrias, complejo de Golgi y retículo endoplásmico se redistribuyen en el citoplasma. En caso de las células que desarrollaron un proceso de necrosis se observó la presencia de células con un aumento de volumen, tumefacción de mitocondrias y retículo endoplásmico, y finalmente, destrucción de membrana plasmática (Cimpan et al., 2000). Dicho autor no describe alteraciones nucleares significativas en las primeras fases.

Para nuestro estudio con microscopía electrónica de transmisión seleccionamos al SB y HEMA. Ambos representan respectivamente, un modelo de sistema adhesivo multimonomérico de composición compleja y un componente monomérico singular, y ambos representan, asimismo, dos productos de máxima y mínima citotoxicidad en los ensayos experimentales de viabilidad realizados en nuestro trabajo.

En nuestros estudios con microscopía electrónica de transmisión hemos observado que las células U937 en condiciones normales, se caracterizan por presentar una morfología irregularmente esférica, con escaso número de prolongaciones tipo microvillis. En el citoplasma se observa un gran número de mitocondrias y cisternas de retículo endoplásmico con una configuración ortotípica. El núcleo se dispone en posición central con abundante eucromatina y nucleolos evidentes. Cuando adicionamos el SB y HEMA, las células U937 mostraron alteraciones ultraestructurales progresivas y diferenciadas en el transcurso de dos horas que dura el experimento.

Las células tratadas con el SB mostraron un incremento rápido y notable de volumen configurando una imagen esferoidal que finalmente desaparece tras la desintegración de la membrana plasmática. Las mitocondrias comienzan a mostrar desde las primeras fases signos de tumefacción y progresivamente dilataciones y ruptura de sus crestas. Asimismo se observan dilataciones a nivel del retículo endoplásmico. La presencia de blebs es ocasional y poseen muy escaso volumen. Todos esos cambios indican la existencia de un mecanismo de muerte celular por necrosis oncótica.

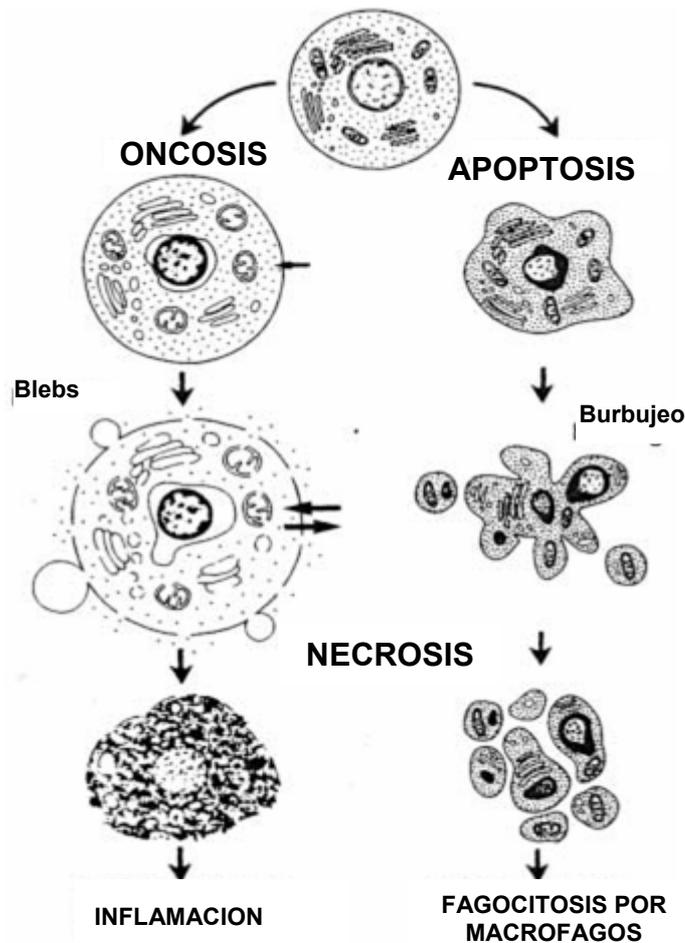


Fig.44. Ilustración de apoptosis y oncosis de acuerdo con Majno y Joris (1995).

La necrosis oncótica es una denominación que surge a partir de la propuesta de Majno y Joris (1995), autores que indican que los términos apoptosis y necrosis deben ser revisados (Fig.44). En tal sentido afirman que la oncosis es un proceso caracterizado por la tumefacción del citoplasma celular y una progresiva cariólisis que se opone a los cambios nucleares y citoplasmáticos característicos de la muerte celular por apoptosis. Ambas –la oncosis y la apoptosis- conducirían a los cambios degradativos que tipifican la necrosis celular. Estos conceptos han sido ratificados recientemente en trabajos experimentales (Zabiti, 2002; Navas Parejo, 2004; Boulanger et al., 2004; Krysko et al., 2004; Liu et al., 2004; Copple et al., 2004; Jaeschke y Lemasters, 2003; Kostin et al., 2003) y recogido por el Comité de la Sociedad de Patología Toxicológica, en relación con la nomenclatura a utilizar para denominar los mecanismos de muerte celular que acontecen en modelos experimentales “in vitro” (Levin, 1998).

Las células tratadas con HEMA mostraron un significativo desarrollo de los blebs, sin que se modificara el tamaño celular en relación con los controles. No existen alteraciones significativas de las organelas celulares hasta la última fase del proceso de muerte celular. La fase final es semejante a la descrita para el SB. Estos cambios indican la existencia de un mecanismo de muerte celular distinto al descrito tras utilizar el SB que sin embargo comparte una etapa final común. Resulta evidente que el mecanismo de muerte celular desarrollado con DL₅₀ de HEMA no corresponda a un proceso clásico de muerte por apoptosis ni tampoco a un proceso de oncosis como el que tiene lugar cuando se utiliza SB. Se sabe que la actuación del HEMA conduce a muerte por apoptosis en dosis subletales (hasta 10mmol/L) si bien se advierte que a dosis mas altas el mecanismo de muerte no sería de tipo apoptótico (Spagnuolo et al., 2004).

Existen muchos ejemplos de características morfológicas y bioquímicas de más de un tipo de muerte celular programada en una misma célula (Proskuryakov et al., 2003). La inhibición de una forma de muerte celular puede provocar asimismo el predominio de la otra (Pohl et al., 1999). Estos estudios experimentales apoyan la existencia de un espectro de muertes programadas en las células. Formigli et al. (2000) encuentran que la antimicina A, un tóxico que altera el complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial, induce un tipo de muerte celular que muestra características bioquímicas, moleculares y morfológicas de apoptosis y necrosis, la cual fue denominada aponecrosis (otros autores como Sperandio et al. -2000- y Ramos et al. -2003-, utilizan el término paraptosis). Morfológicamente, se caracteriza por alteraciones citoplasmáticas características de necrosis, como la aparición de vacuolas, junto con condensación de la cromatina, típica de la apoptosis. La inhibición de la caspasa-3 en este modelo experimental provocó el cambio de aponecrosis hacia necrosis. Asimismo, la utilización de altas dosis de antimicina A originó necrosis. El análisis de los depósitos de energía mostró que los niveles de ATP eran determinantes para el inicio de un tipo u otro de muerte celular (apoptosis, aponecrosis o necrosis). La aponecrosis estaría precedida por un marcado descenso en los niveles de ATP. Por el contrario, la apoptosis se caracterizaría por un mantenimiento en los niveles de ATP. Estos y otros hallazgos recientes indican que la apoptosis y la necrosis, como hemos comentado con anterioridad, no son necesariamente dos caminos independientes y pueden mostrar algunas características comunes, al menos en el sistema de transmisión de señales. Lemasters (1999) introduce el término necrapoptosis para enfatizar dicha hipótesis. Esta idea es consistente con la observación de que genes antiapoptóticos como el bcl-2, son capaces de inhibir ambos tipos

de muerte celular (Sperandio et al., 2000; Willie y Golstein, 2001; Ramos et al., 2003; Yakolev y Faden, 2004; Papucci et al., 2004).

Nuestros resultados permiten establecer en relación con lo que se acaba de indicar, que el HEMA a la DL₅₀ muestra un mecanismo de muerte singular que se caracteriza por cambios citoplasmáticos compatibles con la apoptosis, pero sin la existencia de cambios nucleares significativos específicos de dicho proceso. La interpretación microscópica, que luego complementaremos al realizar la discusión de los datos microanalíticos, nos induce a pensar que nos encontramos ante un mecanismo de muerte celular “híbrido” en el cual, el proceso de involución citoplasmático supera el desarrollo y aparición de los cambios ultraestructurales a nivel nuclear, y alcanza un nivel de degradación incompatible con la supervivencia celular. El mecanismo de muerte tras la administración de HEMA a DL₅₀ podría recibir, de acuerdo con el patrón ultraestructural descrito, la denominación de necrosis oncoapoptótica (Fig.45).

A los fines de poder establecer el comportamiento en la composición iónica intracelular durante la exposición de la línea celular U937 a los diferentes sistemas adhesivos dentales se utilizó en el presente trabajo de tesis la técnica de microanálisis por energía dispersiva de rayos X, técnica que permite el análisis cualitativo y cuantitativo del perfil iónico de una muestra biológica de forma simultánea a su observación. Sin embargo hay que destacar que la aplicación del microanálisis por energía dispersiva de rayos X en Biología, Medicina y Odontología presenta algunas dificultades derivadas, fundamentalmente, de las características intrínsecas del material biológico. En primer lugar, el principal componente de las células y tejidos es el H₂O, componente que es incompatible con las condiciones de vacío requeridas en el microscopio electrónico. Esto condiciona la necesidad de eliminar o estabilizar el H₂O manteniendo los elementos de interés en su localización original durante el procesamiento de las muestras, evitando la posible pérdida parcial o total y/o su redistribución, y en particular de los elementos difusibles (Zierold et al., 1988; 2000; Taylor et al., 1999). En segundo lugar, las células y tejidos no constituyen sistemas estáticos, sino que por el contrario deben ser considerados como sistemas dinámicos donde su estructura y composición cambian con las diferentes condiciones fisiológicas y microambientales. Finalmente, el microanálisis por rayos X proporciona datos físicos a partir de especímenes criohidratados y/o criodesecados, los cuales deben ser transformados en datos cuantitativos para su utilidad en biomedicina (Warley et al., 1993). Todo esto condiciona la elección de un método adecuado de preparación de los

especímenes biológicos. Dicha elección dependerá, además, de la instrumentación utilizada, del tipo de espécimen, de los elementos de interés y del propósito del experimento.

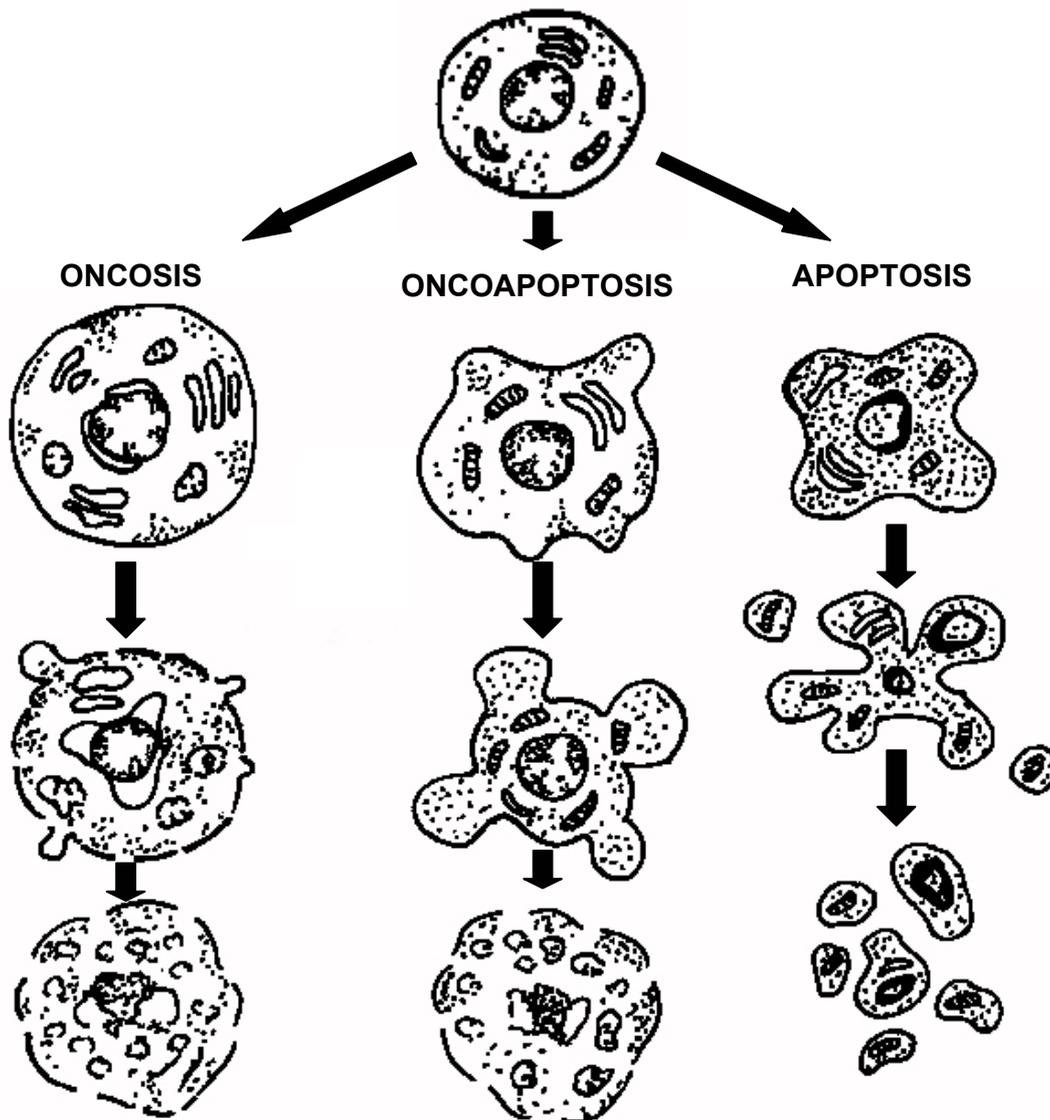


Fig.45. Esquema de Oncosis, Apoptosis y Oncoapoptosis.

En nuestro grupo de investigación, se ha desarrollado en los últimos años un procedimiento técnico para analizar células completas en cultivo, de crecimiento en monocapa y en suspensión, para microanálisis por energía dispersiva de rayos X mediante microscopía electrónica de barrido, con el objetivo de examinar el papel de los diferentes elementos (Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca) en distintas condiciones experimentales (Fernández-Segura et al., 1997a; 1997b; 1999). Este procedimiento consta básicamente de tres fases: 1)

adaptación de las células sobre un sustrato sólido compatible con el crecimiento celular, el microanálisis por energía dispersiva de rayos X y la microscopía electrónica de barrido, 2) eliminación del medio extracelular que puede interferir con el espectro de rayos X procedente de la célula y 3) criopreparación de los especímenes.

Una de las fases más críticas en la preparación de células en cultivo es la adaptación y crecimiento de las mismas sobre un sustrato sólido compatible con el microanálisis por energía dispersiva de rayos X. A este respecto, el sustrato no debe contener elementos que puedan contribuir al espectro de rayos X y no debe interferir con el análisis celular. Asimismo, el soporte debe ser inerte para la vitalidad celular (Abraham et al., 1985; Warley et al., 1994a). La principal ventaja de adaptar y/o cultivar las células directamente sobre el soporte radica en la posibilidad de analizar las células tras diferentes condiciones experimentales, sin la intervención de procedimientos intermedios (tratamientos enzimáticos), que pueden ocasionar daños en la membrana celular causando alteraciones en la permeabilidad celular y originando cambios en la composición elemental (Warley et al., 1994a). Los sustratos utilizados, hasta el momento presente, han sido muy diversos – cubreobjetos de vidrio y plástico, discos de grafito y rejillas (Au, Ti) de microscopía electrónica recubiertas con películas plásticas (fomvar, pioloform) -, siendo, en ocasiones, necesario recubrir la superficie del sustrato con películas de poli-L-lisina o componentes de la matriz extracelular como el colágeno (von Euler et al., 1993) y la lámina (Warley et al., 1994b) para favorecer la adhesión celular.

Nuestro grupo propone la utilización de las unidades Millicell® para cultivo celular sobre membrana, las cuales constituyen una herramienta de gran utilidad, tanto para el estudio de líneas celulares de crecimiento en monocapa (MCF-7, LLC-PK₁) y en suspensión (U937) (Fernández-Segura et al., 1997a; 1997b; 1999). Los resultados demuestran que estas unidades proporcionan estabilidad al contenido elemental y no interfieren con los elementos del espectro de rayos X procedentes de la célula. Además, estas unidades, insertables en pocillo de placa de cultivo, permiten un acceso a ambos dominios, (apical y basolateral) de la monocapa celular, posibilitando el establecimiento de modelos toxicológicos y farmacológicos “in vitro”.

Uno de los principales problemas al utilizar células en cultivo completas, no seccionadas, lo constituye el medio de cultivo, el cual debe ser eliminado para no interferir con el microanálisis de las células. Esta eliminación debe realizarse previamente al proceso

de criopreparación mediante el lavado de las células con soluciones lavadoras, las cuales deben eliminar de una forma efectiva el medio de cultivo, no deben interferir con el análisis y no deben alterar la permeabilidad de la membrana plasmática o causar alteración y redistribución de la composición iónica intracelular (Zierold et al., 1988; Warley et al., 1997). Tres tipos, fundamentales, de soluciones han sido empleadas: 1) soluciones isotónicas volátiles como el acetato de amonio, 2) soluciones isotónicas no volátiles como la sacarosa y el manitol, y 3) el agua destilada. Desde el punto de vista fisiológico, las soluciones isotónicas deben ser las soluciones lavadoras más efectivas debido al escaso riesgo de efectos osmóticos. Paradójicamente diferentes grupos de investigación han demostrado, a este respecto, que el agua destilada a 4°C constituye, desde el punto de vista morfológico y microanalítico, la solución lavadora más efectiva (Roomans, 1991; Warley et al., 1994b; Fernandez-Segura et al., 1997a).; solución esta que fue, en consecuencia, utilizada en nuestra tesis doctoral.

Como hemos comentado anteriormente, la aplicación del microanálisis por energía dispersiva de rayos X al material biológico requiere la elección de métodos de preparación que eviten o reduzcan la pérdida y/o redistribución de los diferentes elementos y en especial de los elementos difusibles. A este respecto, los métodos convencionales de preparación de muestras biológicas para microscopía electrónica -y que tiene por base la utilización de fijadores químicos, la deshidratación, la inclusión en material plástico, la polimerización a temperaturas altas y el ultracorte- no constituyen un procedimiento adecuado para preservar la integridad del contenido de los elementos a analizar. Por el contrario, las técnicas de criopreparación constituyen, en la actualidad, los métodos ideales para el estudio de la composición elemental, y muy especialmente de los elementos difusibles, de células y tejidos, mediante técnicas microanalíticas (Zierold et al., 1988; Warley, 1997; Warley y Skepper, 2000; Fernandez Segura, 1999). En nuestra opinión, las células aisladas y en cultivo, constituyen los especímenes biológicos más adecuados para llevar a cabo los procedimientos de criopreparación. Esta característica radica en el pequeño tamaño de las muestras, que permite un procesamiento con escaso número de artefactos analíticos debido sobre todo a la escasa aparición y grado de extensión de los cristales de hielo.

En relación con los métodos de cuantificación en muestras biológicas se puede distinguir, fundamentalmente, dos métodos: 1) métodos de medida de la masa elemental por unidad de masa –método de la normalización del fondo- y 2) métodos de medida de la masa elemental por unidad de volumen –método del estándar periférico- (Rick et al., 1979). El

método mas utilizado es el método de la normalización del fondo o método de Hall et al. (1973) desarrollado inicialmente para secciones finas y microscopio electrónica de transmisión. El fundamento de este método es que la concentración de un elemento en el área de análisis es proporcional al número de cuentas netas bajo el pico característico de ese elemento, mientras que la radiación de fondo o blanca es una medida de la masa total en el área de análisis. A este respecto, cuando se analizan especímenes criodisecados, los datos cuantitativos son obtenidos en mmol/kg masa seca; por el contrario, cuando el material es analizado en un estado congelado e hidratado los datos son obtenidos en mmol/kg masa húmeda.

No obstante, el método de la normalización del fondo no constituye un procedimiento apropiado para el análisis cuantitativo de especímenes gruesos. Por este motivo, diferentes autores han propuesto una extensión del método de Hall: el método de la razón pico/fondo (P/B) (Staham et al., 1978; Boekestein et al., 1984). En nuestra tesis utilizamos este método ya que la señal de fondo es medida debajo del pico característico de cada elemento, en vez de elegir una región del espectro de rayos X libre de picos (4.2-6.2 keV). Por tanto, el fundamento del método de la razón P/B es que la concentración de un elemento en el área de análisis en la muestra es proporcional al número de cuentas netas de la señal característica de ese elemento dividido por el fondo existente debajo del pico. El interés del método P/B es que resulta independiente de las variaciones en la intensidad de corriente, así como de la absorción debida a las irregularidades de la superficie de la muestra siendo, por tanto, el método de elección para el análisis cuantitativo de la composición elemental de especímenes biológicos gruesos examinados en un microscopio electrónico de barrido.

El microanálisis por energía dispersiva de rayos X ha sido utilizado hasta el momento para evaluar alteraciones en el transporte iónico tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Roomans, 1999; 2002a; 2002b; Roomans y Von Euler 1996; Zhang y Roomans 1997; 1998; Hongpaisan y Roomans 1999). Esta metodología ha comenzado también a utilizarse para evaluar más correctamente los procesos de muerte celular denominados por necrosis y por apoptosis a través de las alteraciones iónicas que acontecen en estos fenómenos. En este sentido, y en relación con la muerte celular por necrosis, diferentes autores han analizado las alteraciones en la composición iónica, fundamentalmente en relación con el ion Ca, en cultivos de células cardíacas neonatales de rata sometidas a diferentes condiciones experimentales como hipoxia química, inhibición de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa dependiente y de la depleción de ATP intracelular (Morris et al., 1989; Jones

et al., 1989; McLaughlin et al., 2004; Akar et al., 2003; Salido et al., 2001; 2004; Skepper, 1999; Buja, 1985; Thandroyen, 1992). Fernandez Segura et al. (1999) estudió el comportamiento iónico en la células apoptóticas y su alteración tras ser inducidas por la irradiación con luz ultravioleta. Estas células se caracterizan por mostrar un incremento en el contenido de Na y un descenso en el contenido de Cl y K. Asimismo Skepper et al. (1999) describe resultados microanalíticos similares en un modelo de apoptosis en macrófagos. Recientemente estos hallazgos han sido confirmado en células prostáticas tratadas con etoposido (Salido et al., 2001; 2004; Vilches et al., 2004).

Sin embargo, la mayoría de estos estudios no ofrecen una información detallada de las alteraciones iónicas desde una perspectiva temporal ni indican el posible papel que pueden desempeñar los diferentes iones en el desencadenamiento, control y progresión de la lesión celular, y muy especialmente el papel que pueden desempeñar los iones monovalentes en los distintos tipos de muerte celular. En nuestro estudio y mediante la aplicación de esta metodología hemos descrito las alteraciones en la composición intracelular durante la lesión celular inducida por los sistemas adhesivos dentales. Nuestros resultados han puesto de manifiesto que el incremento en las concentraciones de Na y descenso de Cl y K intracelular se relacionan directamente con las alteraciones morfoestructurales las cuales acontecen de forma previa a la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, evaluada mediante parámetros bioquímicos.

Finalmente, nuestro estudio apoya la hipótesis establecida por Bauer et al. (1976) al indicar que las concentraciones intracelulares de sodio y potasio constituyen uno de los criterios mas sensibles y fiables de viabilidad celular. Roomans (2001) corrobora este hecho, sugiriendo además que el cociente ó razón K/Na constituye un excelente indicador del daño celular, desde el punto de vista microanalítico. En este sentido, nuestro estudio mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X ha permitido comprobar como la alteración en la concentración intracelular de ambos iones así como el cociente K/Na en caso del SB y HEMA muestran una cinética comparable a la obtenida mediante la evaluación de la integridad de la membrana plasmática con el ensayo de exclusión del tripán azul.

El estudio con microanálisis por energía dispersiva de rayos X pone de relieve una importante alteración en la composición iónica intracelular de las células U937, cuando las mismas toman contacto con los sistemas adhesivos dentales. Descrito el proceso de muerte celular en base a los parámetros bioquímicos analizados (alteración de la permeabilidad de

la membrana plasmática) y morfoestructurales, nuestro estudio ha puesto de manifiesto un comportamiento característico y distintivo para cada ión monovalente. Destaca básicamente en este proceso, como acabamos de indicar, una alteración significativa de los iones Na, Cl y K tras la aplicación de SB y HEMA, materiales utilizados en esta tesis doctoral.

En relación con el SB los resultados microanalíticos ponen de relieve un incremento muy rápido del Na, altamente significativo estadísticamente, que se asocia a un descenso simultáneo de K asimismo significativamente estadístico. En relación con el Cl los valores detectados no revelan variaciones significativas produciéndose un incremento escaso, que se mantiene durante prácticamente las dos horas que dura el experimento. En el análisis individual de las células, tras utilizar los histogramas de distribución de frecuencias, se observan células que muestran en los primeros momentos un incremento notable de Cl. Los histogramas de la célula en la última fase del proceso ponen de relieve que existe una población semejante a la del grupo control junto a células necróticas inviables para su evaluación con nuestra instrumentación microanalítica.

Reeves y Shah (1994) muestran que durante la fase tardía de la lesión necrótica es cuando ocurre la entrada de Cl y una vez que ha ocurrido una depleción significativa en el contenido de ATP intracelular y tras una profunda alteración de la homeostasis intracelular de los cationes. Asimismo Waters y Scharellman (1996) sugieren la posibilidad de utilizar el Cl como un indicador tardío de lesión necrótica; Zabiti en 2002 confirma estos resultados. La falta de un incremento significativo del Cl en relación con el incremento de los valores del Na, en nuestro estudio, no tiene en principio una fácil explicación. Sabemos que el incremento de volumen asociado a la muerte celular por necrosis oncótica, precisamente la que se origina por la acción de SB, está o debe estar acompañada por una activación de canales catiónicos y aniónicos similares a los que participan en el incremento regulado de volumen en situación hiperosmótica, esto es a los canales que conducen a incrementar el Na y Cl intracelularmente (Maeno et al., 2000; Szabò et al., 1998). En nuestra opinión la situación que acontece en nuestro caso estaría relacionada por tanto con una profunda alteración de estos mecanismos. La consecuencia de ello es la alteración “at initio” del sistema autorregulador del volumen celular.

El magnesio es un catión divalente que interviene en un número muy amplio de reacciones intracelulares. El mismo es posible verlo en su forma iónica Mg^{2+} interviniendo en reacciones de fosforilación y replicación de ADN. Estudios previos han demostrado un

descenso en la concentración elemental del Mg en correlación al descenso en la concentración de ATP (Buja et al., 1985; Di Francesco et al., 1998). Nuestros estudios coinciden con estas conclusiones ya que observamos un descenso rápido y significativo a partir de los 15 min en la concentración de Mg. Sin embargo Zabiti (Zabiti, 2002) no ha podido evidenciar ninguna modificación significativa en relación con el contenido total de Mg durante la lesión inducida en células U937 por la hipoxia metabólica.

El fósforo es un elemento que se ha relacionado, desde el punto de vista microanalítico, con la masa celular analizada, concentración de constituyentes orgánicos intracelulares, contenido en ácidos nucleicos y nivel de fosforilación celular. Roomans (2002b) indica que la concentración de fósforo permanece constante en células que no muestran un daño estructural; por el contrario las células caracterizadas por un daño estructural grave se caracterizan por una disminución en la concentración intracelular del fósforo. Zabiti (2002) observa en las células sometidas a un proceso de hipoxia metabólico, un ligero descenso que se hace significativo, en los últimos estadios del proceso oncótico. Nuestros resultados que ultraestructuralmente reflejan un daño estructural importante, ponen de relieve desde los primeros cinco minutos una progresiva disminución del fósforo. Estos resultados ratifican asimismo las profundas alteraciones que revelan los valores de Na, K y Cl anteriormente comentados.

Los valores de azufre que se relacionan con las proteínas y proteoglicanos (Sanchez Quevedo et al., 1989; Roomans, 2002a) muestran oscilaciones en su concentración evidenciando la progresiva lisis de las organelas celulares.

Por último en relación con la acción citotóxica del SB es importante señalar que en nuestro trabajo la determinación del índice K/Na se configura, según indicamos previamente, como un excelente instrumento para evaluar microanalíticamente la viabilidad celular. Los valores del índice que evidencia el protocolo experimental seguido demuestra, con alta significación estadística, la progresiva afectación celular constituyendo un indicador patognomónico del estado vital de la célula.

Una vez discutida la acción del SB sobre la composición iónica celular pasaremos a discutir los efectos del HEMA. Nuestros resultados ponen de relieve un incremento de Na y una disminución de K progresivos y altamente significativos que, a diferencia de lo descrito y discutido en relación con el SB, coincide con una disminución significativa en los valores

intracelulares de Cl. El descenso significativo de Cl y K puede relacionarse con un proceso de autorregulación volumétrica que además de otros factores, conduce a la célula a mantener el volumen homeostático por un lado o a un proceso de naturaleza apoptótico por otro. Nuestros resultados son coincidentes con los hallazgos de varios autores (Fernandez Segura et al., 1999; Salido et al., 2000; 2004; Skepper et al., 1999) que demuestran que la disminución de Cl y K asocia al descenso del volumen celular y al inicio de la apoptosis. En nuestro caso la acción del HEMA conduce en la dosis letal utilizada a un proceso de muerte celular híbrido que previamente interpretamos desde una perspectiva microscópica y que ahora confirmamos desde una perspectiva microanalítica. Los valores elevados de Na simultáneo a los descensos de Cl y K, propio de la apoptosis, indican la existencia de dos mecanismos confluentes en el proceso de muerte celular que desencadena el HEMA a dosis letal. La característica de esta confluencia conduce al proceso que comentamos en relación con los resultados ultraestructurales. Esto es, a un proceso de involución rápida a nivel del citoplasma fruto de un proceso de autorregulación volumétrica fallido.

Por otra parte dicho proceso no deplecciona significativamente los valores de ATP como evidencia el indicador de Mg a nivel intracelular en nuestros resultados; pues prácticamente se mantiene en el tiempo. Existe en consecuencia la condición necesaria para disparar el proceso fiel de la apoptosis. En aquellas condiciones experimentales en la que el proceso de autorregulación volumétrica finalice con éxito la apoptosis con sus fenómenos nucleares específicos pudiera tener lugar. En nuestro caso y a la DL₅₀ del HEMA el proceso queda abortado evidenciándose el mecanismo celular híbrido que describimos en su momento y al que convinimos en denominar necrosis oncoapoptótica. Los resultados microanalíticos del P y S son coincidentes con el mantenimiento de la estructura celular durante la mayor parte del proceso a diferencia de lo que ocurre cuando se utiliza SB. El índice K/Na constituye asimismo, en nuestros datos con HEMA, un excelente indicador de la viabilidad celular, lo que pone de relieve que dicho indicador microanalítico lo es con independencia del tipo de muerte celular.

Finalmente en relación con la discusión de esta tesis es importante reseñar que los resultados ultraestructurales y microanalíticos alcanzados en la misma no solo nos ha permitido establecer los mecanismos de muerte celular a DL₅₀ de los compuestos SB y HEMA, ampliamente utilizados en Odontología, sino que además nos ha permitido identificar y describir microscópica y microanalíticamente un mecanismo de muerte celular híbrido de

carácter oncoapoptótico que puede contribuir a esclarecer el complejo fenómeno de la involución y la muerte celular.

CONCLUSIONES

1. El método "in vitro" propuesto, basado en la línea celular monoblástica humana U937, constituye un sistema experimental idóneo para evaluar la citotoxicidad por sistemas adhesivos dentales con criterios microscópicos y microanalíticos. Dicho modelo permite, asimismo, la correlación de los datos aportados utilizando ambos tipos de criterios.

2. La evaluación de la integridad de la membrana celular, mediante ensayos de exclusión vital con tripán azul, en la línea celular monoblástica humana U937 tras la aplicación de los sistemas adhesivos SB, P&B NT y SS, pone de relieve que el SB y el SS a DL_{50} constituyen los productos multimonoméricos más tóxico y menos tóxico respectivamente. Dichos ensayos ponen asimismo de relieve, la existencia de una relación dosis tiempo dependencia en todos los productos utilizados.

3. La evaluación de la integridad de la membrana celular, mediante ensayos de exclusión vital con tripán azul, en la línea celular monoblástica humana U937 tras la aplicación de HEMA -componente básico de los sistemas adhesivos dentales- a DL_{50} pone de relieve que su toxicidad es inferior a la de cualquiera de los sistemas adhesivos dentales multimonoméricos utilizados en este estudio. El ensayo con el HEMA presenta asimismo una relación dosis tiempo dependencia.

4. El estudio con microscopía electrónica de transmisión de la lesión celular inducida a DL_{50} por el SB en la línea celular monoblástica humana U937, pone de relieve la existencia de un mecanismo de muerte celular por necrosis oncótica cuyo patrón microscópico se caracteriza por tumefacción del citoplasma celular, alteración significativa de las organelas, progresiva cariólisis y ruptura final de la membrana celular.

5. El estudio con microscopía electrónica de transmisión de la lesión celular inducida a DL_{50} por HEMA en la línea celular monoblástica humana U937, pone de relieve la existencia de un mecanismo de muerte celular de carácter híbrido que se caracteriza por la coexistencia de un citoplasma que evoluciona desde un patrón apoptótico a un patrón oncótico y que conduce a la ruptura final de la membrana. La evolución del núcleo se incardina asimismo en un patrón microscópico de carácter oncótico. Para el mecanismo descrito proponemos la denominación de muerte celular por necrosis oncoapoptótica.

6. El estudio con microscopía analítica por energía dispersiva de rayos X de la lesión celular inducida a DL_{50} por el SB en la línea celular monoblástica humana U937, pone de relieve la

existencia de un patrón microanalítico en los niveles intracelulares de Na, Cl, K, Mg, P, y S que se correlaciona con el patrón microscópico de la necrosis oncótica. Los valores detectados revelan la alteración del sistema que autorregula el volumen celular, la disminución progresiva de la reserva energética y la desestructuración, asimismo progresiva, de los componentes celulares.

7. El estudio con microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X de la lesión celular inducida a DL₅₀ por HEMA en la línea celular monoblástica humana U937, pone de relieve la existencia de un patrón microanalítico en los niveles intracelulares de Na, Cl, K, Mg, P y S que se correlaciona con el patrón microscópico de la necrosis oncoapoptótica. Los valores detectados revelan indicadores microanalíticos de apoptosis, la no disminución progresiva de las reservas energéticas y el mantenimiento estructural de los compartimentos celulares hasta la fase final de ruptura de la membrana plasmática.

8. El estudio con microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X de las lesiones celulares inducidas a DL₅₀ por SB y HEMA, en la línea celular monoblástica humana U937, pone de relieve que el índice K/Na constituye un excelente indicador de la viabilidad celular con independencia del mecanismo de muerte celular.

9. El estudio con microscopía electrónica de transmisión y la microscopía analítica por energía dispersiva de rayos X de las lesiones celulares inducidas por SB y HEMA permite determinar la viabilidad celular con carácter previo a la ruptura de la membrana plasmática y por tanto con anterioridad al diagnóstico que se alcanza por el método de ensayo de permeabilidad de membrana.

BIBLIOGRAFÍA

Abate P (1997) Adhesión en Operatoria Dental. Sistemas Adhesivos. Actas Jornadas Aniversario de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba 26:211-215.

Abraham EH, Breslow JL, Epstein J, Chang-Sing P, Lechene C (1985) Preparation of individual human diploid fibroblasts and study of ion transport. *Am J Physiol* 248:154-164.

Aguilar Hi, Botla R, Arora AS, Bronk SF, Gores GJ (1996) Induction of the mitochondrial permeability transition by protease activity in rats: A mechanism of hepatocyte necrosis. *Gastroenterology* 110:558-566.

Akar JG, Everett TH, Ho R, Craft J, Haines DE, Somlyo AP, Somlyo AV (2003) Intracellular chloride accumulation and subcellular elemental distribution during atrial fibrillation. *Circulation* 107:1-6.

Akimoto N, Kohno A, Otsuki M, Cox CF (1999) Biocompatibilidad del sistema Clearfil Liner Bond 2 y Clearfil AP-X sobre dientes expuestos y no expuestos de primates. *Quintessence Ed. Española* 12:303-316.

Bal-Price A, Brown GC (2000) Nitric-oxide-induced necrosis and apoptosis in PC12 cells mediated by mitochondria. *J Neurochem* 75:1455-1464.

Bauer PS, Bolton WE, Barranco SC (1976) Electrón microscopy and microchemical análisis of the cystic fibrosis diploid fibroblast in vivo. *Texas Rep Biol Med* 34:113-136.

Blanco-Colio LM, Hernandez-Presa MA, Ortego M, Martín-Ventura JL, Tuñón J, Egido J (2000) Papel potencial de la apoptosis en la aterosclerosis. *Cardiovasc Risk Factors* 9:131-137.

Blottiere HM, Daculsi G, Anegon I, Pouezat JA, Nelson PN, Passuti N (1995) Utilization of activated U937 monocytic cells as a model to evaluate biocompatibility and biodegradation of synthetic calcium phosphote. *Biomaterials* 16:497-503.

Boekestein A, Stols ALH, Stadhouders (1980) Quantitative in X-ray microanalysis of biological bulk specimens. *Scanning Electron Microsc II*:321-324.

Boekestein A, Thiel F, Stols ALH, Bouw E, Stadhouders A (1984) Surfaces roughness and the use of peak to background in the X-ray microanalysis of bulk bio-organic sample. *J Microsc* 134:327-334.

Borgmann S, Granitzer M, Crabbe J, Beck FX, Nael W, Dörge A (1994) Electron microprobe analysis of electrolytes in whole cultured epithelial cells. *Scanning Electron Microsc VIII*:139-148.

Bouillaguet S, Wataha JC, Virgillito M, Gonzalez L, Rakich DR, Meyer JM (2000) Effect of sub-lethal concentrations of HEMA (2-hydroxyethylmethacrylate) on THP-1 human monocyte-macrophages, in vitro. *Dent Mater* 16:213-217.

Boulanger E, Wautier MP, Gane P, Mariette C, Devuyst O, Wautier JL (2004) The triggering of human peritoneal mesothelial cell apoptosis and oncosis by glucose and glycoxydation products. *Nephrol Dial Transplant* 19:2208-2216.

Bränström M (1981) Dentin and pulp in Restorative Dentistry. In: *Dental Therapeutics AB Cap 3: Nacka, Suecia* pp 67.

Brecht M, Brecht C, De Groot H (1992) Late steady increase in cytosolic Ca^{2+} preceding hypoxic injury in hepatocytes. *Biochem J* 283:399-402.

Buja LM, Hagler HK, Parsons D, Chien K, Reynolds RC, Willerson JT (1985) Alterations of ultrastructure and elemental composition in cultured neonatal rat cardiac myocytes after metabolic inhibition with iodoacetic acid. *Laboratory Investigation* 53:397-411.

Buja LM, Eigenbrodt MD, Eigenbrodt EH (1993) Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med* 117:1208-1214.

Bunnachak D, Almeida RPA, Wetzels FMJ, Gengaro P, Nemenoff RA, Burke TJ, Shcrier RW (1994) Ca^{2+} uptake, fatty acid, and LDH release during proximal tubule hypoxia: effects of mepacrine and dibucaine. *Am J Physiol* 266:196-201.

Carini R, Autelli R, Bellomo G, Dianzani MU, Albano E (1995) Sodium-mediated cell swelling is associated with irreversible damage in isolated hepatocytes exposed to hypoxia or mitochondrial toxins. *Biochim Biophys Res Commun* 206:180-185.

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

Carini R, De Cesaris MG, Bellomo G, Albano E (1999) Intracellular Na⁺ accumulation and hepatocyte injury during cold storage. *Transplantation* 68:294-297.

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

Cascales M (2003) Bases moleculares de la apoptosis. *Anal Real Acad Nal Farm* 69:36-64.

Caughman GB, Shuster GS, Rueggeberg FA (1999) Cell lipid alterations resulting from prolonged exposure to dimethylaminoethylmethacrylate. *Clin Oral Investig* 3:181-187.

Chen W-H, Chu K-Ch, Wu SH-J, Wu J-Ch, Shui H-A, Wu M-L, (1999) Early metabolic inhibition-induced intracellular sodium and calcium increase in rat cerebellar granule cells. *J Physiol* 515:133-146.

Chen J, Wargner MC (2001) Altered membrane-cytoskeleton linkage and membrane blebbing in energy-depleted renal proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:619-627.

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

Copple BL, Rondelli CM, Maddox JF, Hoglen NC, Ganey PE, Roth RA (2004) Modes of cell death in rat liver alter monocrotaline exposure. *Toxicol Sci* 77:172-182.

Costa CAS (1997) Compatibilidad Dentino-Pulpar de los sistemas adhesivos. En: *Actas Jornadas Aniversario de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.* 28:222-228.

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

Costa CAS et al. (2001) Testes de Citotoxicidade em cultura de células in estrela. *Metodología científica- Ensino e Pesquisa en Odontología* 9:147-160.

Costa CAS, Hebling J (2003) Biología del Complejo Dentino Pulpar en relación a su protección mediante adhesivos. En: Gilberto Henostroza H Editor. *Adhesión en Odontología*. Editora MAIO. 7:163-193.

Cotran RS, Kumar V, Collins T (2000) Patología celular I: Lesión y muerte celulares. En: Cotran RS, Kumar V, Collins T (eds) *Patología estructural y funcional*, Edición McGraw-hill Interamericana, Madrid, pp 1-31.

Cox CF, Hafez AA, Akimoto N, Otsuki M, Suzuki S, Tarim B (1998) Biocompatibility of primer adhesive and resin composite systems on non-exposed and exposed pulps of non-human primate teeth. *Am J Dent* 10:55-63.

Craig RG (1997) *Restorative Dental Materials*. 10 Edition, C V Mosby, St. Louis, pp 137-71.

Crespo PV, López Escamez JA, Cañizares FJ, Campos A (1993) X-ray microanalytical determination of P, S and K concentration in the gelatinous membrane of the utricle. *Acta otolaryngol* 113:176-180.

Cummings BS, Schnellman RG (2002) Cisplatin induced renal cell apoptosis: caspase 3-dependent and independent pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 302:8-17.

Cummings BS, McHowat J, Schnellmann RG (2002) Role of an endoplasmic reticulum Ca^{2+} independent phospholipase A_2 in oxidant-induced renal cell death. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:492-498.

Cummings BS, Mchowat J, Schnellman RG (2000) Phospholipase A_{2s} in cell injury and death. *J Pharmacol Exp Ther* 294:793-799.

Devarajan P, Savoca M, Castañeda MP, Park MS, Esteban-Cruciani N, Kalinec F (2002) Cisplatin induced apoptosis in auditory cells: role of death receptor and mitochondrial pathways. *Hear Res* 174:45-54.

Di Francesco A, Desnoyer RW, Covacci V, Wolf FI, Romai A, Cittadini A and Bond M (1998) Changes in Magnesium content and subcellular distribution

during retinoic acid-induced differentiation of HL60 cells. *Arch Biochem Biophys* 360:149-157.

Ekelund S, Larsson R, Nygren P (2002) Metabolic effects of the cytotoxic guanidino-containing drug CHS 828 in human U937 lymphoma cells. *Anticancer Res* 22:2269-2274.

Ferraris ME, Campos A (2002) *Histología y embriología bucodental*, 2nd ed, Editorial Medica Panamericana, Madrid.

Ferrer M, Izeboud T, Ferreira CG, Span SW, Giaccone G, Kruyt FAE (2003) Cisplatin triggers apoptotic or nonapoptotic cell death in Fanconi anemia lymphoblasts in a concentration-dependent manner. *Exp Cell Res* 26:381-395.

Frank A, Rauen U, Groot H (2000) Protection by glycine against hypoxic injury of rat hepatocytes: inhibition of ion fluxes through nonspecific leaks. *J. Hepatol* 32:58-66.

Fernandez-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Revelles F, Campos A (1997a) Electron probe x-ray microanalysis of cultured epithelial tumor cells with scanning electron microscopy. *Cell Biol Int* 21:665-669.

Fernandez-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Revelles F, Campos A (1997b) Backscattered electron imaging of cultured cells: Application to electron probe X-ray microanalysis using a scanning electron microscope. *J Microsc* 188:72-78.

Fernandez-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Warley A, Campos A (1999) Changes in elemental content during apoptotic cell death studied by electron Probe X-ray microanalysis. *Exp Cell Res* 253:454-462.

Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandi GE, Capaccioli S, Orlandini Z (2000) Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol* 182:41-49.

Fujisawa S, Kadoma Y, Kodoma Y (1998) ¹H and ¹³NMP studies of the interaction of eugenol, phenol, and triethylenglycoldimethacrylate with phospholipid liposome as a model system for odontoblast membranes. *J Dent Res* 67:1438-1441.

Freshney AR (1994) Culture of animals cells. A manual of basic technique. In: Alan R Liss, 2 edición, New York.

Gasbarrini A, Borle AB, Farghali H, Bender C, Francavilla A, Van Thiel D (1992) Effect of anoxia on intracellular ATP, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, and cytotoxicity in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 267:6654-6663.

Gill JS, Windebank J (1998) Cisplatin-induced apoptosis in rat dorsal ganglion neurons is associated with attempted entry into the cell cycle. *J Clin Invest* 101:2842-2850.

Goldstein JI, Roming AD, Newbury DE, Lyman CE, Echlin P, Fioro C, Joy DC, Lifshin E (1992) Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. Plenum Press, New York.

González VM, Fuertes MA, Alonso C, Pérez JM (2001) Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis?. *Mol Pharmacol* 59:657-663.

Griffiths JE (1999) Reversal of mitochondrial Na⁺/Ca⁺ exchange during metabolic inhibition in rat cardiomyocytes. *FEBS Lett* 453:400-404.

Hall TA, Anderson HC, Appleton TC (1973) The use of thin specimens for X-ray microanalysis in biology. *J Microsc* 99:177-182.

Hall TA, Gupta BL (1986) EDXS quantitation and application to biology. Principles of analytical electron microscopy. In: Joy DC, Romir AD, Goldstein JI (eds) Plenum Publish. Co., London pp 219-248.

Hanks CT, Straw SE, Wataha JC, Craig RG (1991) Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblast. *J Dent Res* 70:1450-1455.

Hanks CT, Wataha JC, Parsell RR, Straw SE (1992) Delineation of cytotoxic concentrations of two dentin bonding agents in vitro. *J Endod* 12:589-596.

Hanks CT, Wataha JC, Sun Z (1996) "In vitro" models of biocompatibility. A review *Dent Mater* 12:186-193.

Harman AW, Nieminen AL, Lemasters JJ, Herman B (1990) Cytosolic free magnesium, ATP, and belbing during chemical hypoxia in cultured rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 170:477-483.

Hebling J, Giro EM, Costa CA (1999) Biocompatibility of an adhesive system applied on exposed human pulp. *J Endod* 25:676-82.

Henostroza G (2003) Perspectiva Histórica. En: Gilberto Henostroza editor. Adhesión en Odontología Restauradora. Editora MAIO. 1:13-25.

Hongpaisan J (1997) Use of in vitro systems for X-ray microanalysis in biomedical research. Scanning Microsc Suppl 8:109-116.

Hongpaisan J, Roomans GM (1999) Retaining ionic concentrations during in vitro storage of tissue for microanalytical studies. J Microsc 193:257-67.

Jaeschke H, Lemasters JJ (2003) Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. Gastroenterology 125:1246-1257.

Janke V, Von Neuhoff N, Schlegelberger B, Leyhausen G, Geurtsen W (2003) TEGDMA causes apoptosis in primary human gingival fibroblast. J Dent Res 82:814-818.

Jones DC, Gunasekar PG, Borowitz JL, Isom GE (2000) Dopamine-induced apoptosis is mediated by oxidative stress and is enhanced by cyanide in differentiated PC12 cells. J Neurochem 74:2296-2304.

Jones RL, Miller JC, Hagler HK, Chien KR, Willerson JT, Buja ML (1989) Association between inhibition of arachidonic acid release and prevention of calcium loading during ATP depletion in cultured rat cardiac myocytes. *Am J Pathol* 135:541-56.

Kaga M, Noda M, Ferracane JL, Nakamura W, Oguchi H, Sano H (2001) The in vitro cytotoxicity of eluates from dentin bonding resins and their effect on tyrosine phosphorylation of L929 cells. *Dent Mater* 17:333-339.

Kehe K, Reichl FX, Durner J, Walther U, Hickel R, Forth W (2001) Cytotoxicity of dental composite components and mercury compounds in pulmonary cells. *Biomaterials* 22:317-322.

Kerr JFR, Gobé GC, Winterford CM, Harmon BV (1995) Anatomical methods in cell death. In: Schwartz LM, Osborne BA (eds) *Cell Death* pp 1-28.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissues kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.

Kerr JF (2002) History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 181-182:471-474.

Kimoto T, Hino K, Koya-Miyata S, Yamamoto Y, Takeuchi M, Nishizaki Y, Micallef MJ, Ushio S, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M (2001) Cell differentiation and apoptosis of monocytic and promyelocytic leukemia cells (U937 and HI60) by tryptanthrin, an active ingredient of polygonum tinctorium lour. *Pathol Int* 51:315-325.

Kitasako Y, Nakajima M, Pereira PNR, Okuda M, Sonoda H, Otsuki M, Tagami J (2000) Monkey pulpal response and microtensile bond strength beneath a one application resin bonding system in vivo. *J Dent* 28:193-198.

Kinney JH, Balloch M, Marshall SJ, Marshall GW, Weishs TP (1996) Hardness and Young's modulus of peritubular and intertubular dentine. *Arch Oral Bio* 41 (1):133-5.

Kostin S, Pool L, Elsasser A, Hein S, Drexler HC, Arnon E, Hayakawa Y, Zimmermann R, Bauer E, Klovekorn WP, Schaper J (2003) *Circ Res* 92:715-724.

Kraemer E, Bonafe A, Uribe Echervarría LJ, Cáceres A, Uribe Echevarría J (1999) Efectos de los adhesivos dentinarios sobre la morfología y organización del citoesqueleto neuronal. Actas de XXXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Odontológicas. -305.

Krysko O, De Ridder L, Cornelissen M (2004) Phosphatidylserine exposure during early primary necrosis (oncosis) in JB6 cells as evidenced by immunogold labeling technique. *Apoptosis* 9:495-500.

Krieger C, Duchon Mr (2002) Mitochondria, Ca^{2+} and neurodegenerative disease. *Eur J Pharmacol* 447:177-188.

Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE (2001) Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 495:12-15.

Kristián T, Siesjö BK (1998) Calcium in ischemic cell death. *Stroke* 29:705-718.

Lechne C (1989) Electron probe analysis of transport properties of cultured cells. In: Zierold K, Hagler HK. (Eds). Springer-Verlag, Berlin pp 236-247.

Lecoeur H, Ferrier M, García S, Riviera Y, Gougeon ML (2001a) A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 253:177-187.

Lecoeur H, Prevost MC, Gougeon ML (2001b) Oncosis is associated with exposure of phosphatidylserine residues on the outside layer of the plasma membrane: a reconsideration of the specificity of the annexin V/propidium iodide assay. *Cytometry* 44:65-72.

Lee YG, Kim JY, Lee KW, Kim KH, Lee HJ (2003) Peptides from anchovy sauce induce apoptosis in a human lymphoma cell (U937) through the increase of caspase-3 and -8 activities. *Ann N Y Acad Sci* 1010:399-404.

Leinfelder KF (1993) Current developments in dentin bonding systems guide to technical exhibits. San Francisco 134 ADA Annual Session 208-212.

Lemasters JJ, Diguseppi J, Nieminen AL, Herman B (1987) Blebbing, free Ca²⁺ and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature* 325:78-81.

Lemasters JJ (1999) Mechanisms of hepatic toxicity V Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol* 276:1-6.

Leist M, Nicotera P (1997) The shape of cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 236:1-9.

Levin S (1998) Apoptosis, necrosis, or oncosis: what is your diagnosis? A report from the Cell Death Nomenclature Comittee of the Society of Toxicologic Pathologist. *Toxicol Sci* 41:155-6.

Liu X, Van Vleet T, Schenllman RG (2004) The role of calpain in oncotic cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:349-370.

LoPachin RM, Lehning EJ (1997) Mechanism of calcium entry during axon injury and degeneration. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997 143:233-244.

López-Escamez JA, Campos A (1994) Standards for X-ray microanalysis of calcified structures. *Scanning Microsc* 8:171-185.

Lutri MS (1991) Defectos de polimerización de los sistemas resinosos compuestos. Soluciones clínicas. Tesis Doctoral. Facultad de Odontología Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazama A, Okada Y (2000) Normotic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:9487-9492.

Majno G, Joris I (1995) Apoptosis, Oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146:3-15.

Matsuo A, Watanabe A, Takahashi T, Futamura M, Mori S, Sugiyama Y, Takahashi Y, Saji S (2001) A simple method for classification of cell death by use of thin layer collagen gel for the detection of apoptosis and/or necrosis after cancer chemotherapy. *J Cancer Res* 92:813-820.

McLaughlin CW, Zellhuber-McMillan S, Macknight ADC, Civan MM (2004) Electron microprobe analysis of ouabain-exposed ciliary epithelium: PE-NPE cell couplets form the functional units. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:1376-1389.

Melcion C, Adolphe M, Marano F (1995) Méthodes générales d'études de la cytotoxicité. En: Adolphe M, Guillouzo A, Marano F (eds). Toxicologie Cellulaire in vitro Méthodes et applications: 49-68.

Meng X, Reeves BW (2000) effects of chloride channel inhibitors on H² O₂-induced renal epithelial cell injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:83-90.

Minamikawa T, Williams DA, Bowser DN, Nagley P (1999) Mitochondrial permeability transtition and swelling can occur reversibly without inducing cell death in intact human cells. *Exp Cell Res* 246:26-37.

Morris AC, Hagler HK, Willerson JT, Buja LM (1989) Relationship between calcium loading and impaired energy metabolism during Na⁺, K⁺ pump inhibition and metabolic inhibition in cultured neonatal rat cardiacmyocytes. *J Clin Invest* 83:1876-1887.

Morris EJ, Geller GM (1996) Induction of neuronal apoptosis by camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase-I: evidence for cell cycle-independent toxicity. *J Cell Biol* 134:757-770.

Müller M (2000) Effects of chloride transport inhibition and chloride substitution on neuron function and on hypoxic spreading-depression-like depolarisation in rat hippocampal slices. *Neuroscience* 97:33-45.

Murata M, Mondem M, Umeshita K, Nakano H, Kanai T, Gotoh M, Mori T (1994) Role of intracellular calcium in superoxide-induced hepatocyte injury. *Hepatology* 19:1223-1228.

Murray PE, Hafez AA, Smith AJ, Cox CF (2002) Bacterial microleakage and pulp inflammation associated with various restorative materials. *Dent Mater* 18:470-478.

Navas Parejo JM (2004) Citotoxicidad inducida por cisplatino. Estudio experimental in vitro en células de feocromocitoma de rata PC12. Tesis Doctoral, Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada e Instituto Dr Oloriz, Granada, España.

Newman GV, Sharpe LH (1966) On the wetability of the surfaces: preliminary investigation. *NJ ST Dent Ass* 37:289-293.

Nicotera P, Thor H, Orrenius S (1989) Cytosolic-free Ca^{2+} and cell killing in hepatoma LcLc cells exposed to chemical anoxia. *FASEB J* 3:59-64.

Otsuki Y, Li Z, Shibata MA (2003) Apoptotic detection methods-from morphology to gene. *Prog Histochem Cytochem* 38:275-339.

Pashley DH (1996) Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med* 7:104-133.

Papucci L, Formigli L, Schiavone N, Tani A, Donnini M, Lapucci A, Perna F, Tempestini A, Witort E, Morganti M, Nosi D, Orlandini GE, Orlandini SZ, Capacioli S (2004) Apoptosis shifts to necrosis via intermediate types of cell death by a mechanism depending on c-myc and bcl-2 expression. *Cell Tis Res* (In press)

Peña C, Pilar G (2000) Early morphologic alterations in trophically deprived neuronal death in vitro occur without alterations in cytoplasmic Ca^{2+} . *J Comp Neurol* 424:377-396.

Pereira JC, Segala AD, Costa CA (2000) Human pulp response to direct capping with an adhesive system. Histology study. *Am J Dent* 13:139-147

Pérez RP (1998) Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur J Cancer* 34:1535-1542.

Pohl D, Bittigau P, Ishimaru MJ, Stadthaus D, Hubner C, Olney JW (1999) N-Methyl-D-aspartate antagonist and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2508-2513.

Priotto E et al (1995) Morphological and numerical characteristics of dentine tubules destined to adhesion. *J Dent Res* 74:743.

Priotto E et al (1996) Adhesive resistance to shear of adhesive resin systems according to dentine morphology. *J Dent Res* 75:1064 .

Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL (2003) Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res* 283:1-16.

Ramos B, Lahti JM, Claro E, Jackowski S (2003) Prevalence of necrosis in C₂-ceramide-induced cytotoxicity in NB16 neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol* 64:502-511.

Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB (1995) Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res* 74:1602-1606.

Reeves WB, Shah S (1994) Activation of potassium channels contributes to hypoxic injury in proximal tubules. *J Clin Invest* 94:2289-2294.

Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Cell Biol* 17:208-212.

Rick R, Dorge A, Bauer R, Gehring K, Tharau K (1979) Quantification of electrolytes in freeze-dried cryosections by electron microprobe analysis. *Scanning Electron Microsc II*:619-626.

Roomans GM (1988) Quantitative X-ray microanalysis of biological specimens. *J Electron Microsc Tech* 9:19-43.

Roomans GM (1991) Cryopreparation of tissue for clinical applications of X-ray microanalysis. *Scanning Microsc* 5:95-106.

Roomans GM, von Euler A (1996) X-ray microanalysis in cell biology and cell pathology. *Cell Biol Int* 20:103-109.

Roomans GM (1999) X-ray microanalysis of cultured cells in the scanning electron microscope and the scanning transmission electron microscope: a comparison. *Scanning Microsc* 13:159-165.

Roomans GM (2001) Pharmacological treatment of the ion transport defect in cystic fibrosis. *Expert Opin Investig Drugs* 10:1-19.

Roomans GM (2002a) Application of X-ray microanalysis to the study of cell physiology in cell attached to biomaterials. *Eur Cell Mater* 18:1-8.

Roomans GM (2002b) X-ray microanalysis of epithelial cell coculture. *Methods Mol Biol*. 188:273-89.

Rose CR, Waxman SG, Ransom BR (1998) Effects of glucose deprivation, chemical hypoxia, and simulated ischemia on Na⁺ homeostasis in rat spinal cord astrocytes.

J Neurosci 18:3554-3562.

Rosser CR, Gores JG (1995) Liver cell necrosis: Cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 108:252-275.

Spagnuolo G, Galler K, Schmalz G, Cosentino C, Rengo S, Schweikl H (2004a) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase amplifies TEGDMA-induced apoptosis in primary human pulp cells. *J Dent Res* 83:703-704.

Spagnuolo G, Mauro C, Leonardi A, Santillo M, Paterno R, Schweikl H, Awedimento EV, Rengo S (2004b) NF- κ B protection against apoptosis induced by HEMA. *J Dent Res* 83:837-842.

Salido M, Vilches J, López A (2000) Neuropeptides bombesin and calcitonin induce resistance to etoposide induced apoptosis in prostate cancer cell line. *Histol Histopathol* 15:729-738.

Salido M, Vilches J, Lopez A, Roomans GM (2001) X-ray microanalysis of etoposide-induced apoptosis in the PC-3 prostatic cancer cell line. *Cell Biology International* 25:499-508.

Salido M, Vilches J, Roomans GM (2004) Changes in elemental concentrations in LNCaP cells are associated with a protective effect of neuropeptides on etoposide-induced apoptosis. *Cell Biology International* 28:397-402.

Sanchez Quevedo MC, Crespo PV, García JM, Campos A (1989) X ray microanalytical histochemistry of human circumpulpar and mantle dentine. *Bone Miner* 6:323-329.

Sastry PS, Rao KS (2000) Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* 74:1-20.

Saura J, MacGibon G, Dragunow M (1997) Etoposide induced PC12 cell death: apoptotic morphology without oligonucleosomal DNA fragmentation or dependency upon de novo protein syntesis. *Mol Brain Res* 48:382-388.

Scheffler IE (2001) Mitochondria make a come back. *Adv Drug Deliv Rev* 49:3-26.

Schloffer D, Horky M, Kotala V, Wesierska-Gadek J (2003) Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human cervix carcinoma cells during therapy by cisplatin. *Cancer Detec Prev* 27:481-493.

Schuster GS, Caughman GB, Rueggeberg FA (2000) Changes in cell phospholipid metabolism in vitro in the presence of HEMA and its degradation products. *Dent Mater* 16:297-302.

Soheili Madj E, Goldberg M, Stanislawski L (2003) In vitro effects of ascorbate and Trolox on the biocompatibility of dental restorative materials. *Biomaterials* 24:3-9.

Sharikabad NM, Ostbye MK, Bros O (2001) Increased $(Mg^{2+})_o$ reduces Ca^{2+} influx and disruption of mitochondrial membrane potential during reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:2113-2123.

Simbula G, Glascott PA Jr, Akita S, Hoek JB Farber JL (1997) Two mechanisms by which ATP depletion potentiates induction of the mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol Cell Physiol* 273:479-488.

Skepper JN, Karydis I, Garnett MR, Hegyi L, Hardwick SJ, Warley A, Mitchinson MJ, Cary NR (1999) Changes in elemental concentrations are associated with early stages of apoptosis in human monocyte-macrophages exposed to oxidized low-density lipoprotein: an X-ray microanalytical study. *J Pathol* 188:100-106.

Slater K (2001) Cytotoxicity test for high-throughput drug discovery. *Curr Opin Biotechnol* 12:70-74.

Sperandio S, Belle I, Bredesen DE (2000) An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14379-14381.

Statham PJ, Pawley JB (1978) A new method of particle X-ray microanalysis on peak to background measurements. *Scanning Electron Microsc* 1:469-478.

Sundstrom C, Nilsson K (1976) Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U937). *Int J Cancer* 17:565-577.

Syntichaki P, Tavernarakis N (2002) Death by necrosis: Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? *Embo Rep* 3:604-609.

Szabò I, Lepple-Wienhues A, Kaba K, Zoratti M, Gulbins E, Lang F (1998) Tyrosine kinase-dependent activation of a chloride channel in CD95-induced apoptosis in T lymphocytes. *J Bio Chem* 273:6169-6174.

Tamura T, Sadakata N, Oda T, Muramatsu T (2002) Role of zinc ions in ricin-induced apoptosis in U937 cells. *Toxicol Lett* 132:141-151.

Thandroyen FT, Belloto D, Katayama A, Hagler HK, Willerson JT, Buja LM (1992) Subcellular electrolyte alterations during progressive hypoxia and following reoxygenation in isolated neonatal rat ventricular myocytes. *Circulation Research* 71:106-119.

Taylor CP, Weber ML, Gaughan CL, Lehning EJ, Lopachin RM (1999) Oxygen/glucose deprivation in hippocampal slices: altered intraneuronal elemental composition predicts structural and functional damage. *J Neurosci* 19:619-629.

Tsutsui T, Tamura Y, Yagi E, Hasegawa K, Takahashi M, Maizumi N, Yamaguchi F, Barret JC (1998) Bisphenol-A induces cellular transformation, aneuploidy and DNA adduct formation in cultured Syrian hamster embryo cells. *Int J Cancer* 75:290-294.

Ten Cate AR (1986) *Histología Oral: desarrollo, estructura y función*, 2da eds, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina.

Tomasini I, Guidarelli A, Cantoni O (2004) Non-toxic concentrations of peroxynitrite commit U937 cells to mitochondrial permeability transition

dependent necrosis that is however prevented by endogenous arachidonic acid. *Biochem Pharmacol* 67:1077-1087.

Trump BF, Berezesky IK (1996) The role of altered $(Ca^{2+})_i$ regulation in apoptosis, oncosis, and necrosis. *Biochim Biophys Acta* 1313:173-178.

Uribe Echevarría J (1990) *Operatoria Dental, Ciencia y Práctica*. Ediciones Avances Medico-Dentales S.L. Madrid, España.

Uribe Echevarría J (1996) Edax energy dispersion microanalysis of phosphorus calcium balance in dentine with smear layer. *J Dent Res* 75:1059.

Uribe Echevarría J (1997) *Capa de Hibridación Dentina-Resina ¿Es una adhesión efectiva? Odontología Clínica a Fines de Milenio*. Editorial Kent-von Düring. Córdoba. Argentina 29: 229-241.

Uribe Echevarría J (1999) The influence of cavity configuration resin layer thickness and dentin treatment on resin adaptation. *J Dent Res* 78:477.

Uribe Echevarría J, Priotto E, Lutri MS (2003) Adhesión a esmalte y dentina con adhesivos poliméricos. En: Gilberto Hinostroza H Editor. Adhesión en Odontología. Editora MAIO 4:71-111.

Van Cruchten S, Van Den Broeck W (2002) Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 31:214-223.

Van Merbeck (2001) Enamel and Dentin Adhesion. In: Summitt J, Robins W, Schwartz R 2th eds. *Fundamentals of Operative Dentistry a contemporary approach*. Chicago. Quintessence 8:178-235.

Vilches J, Salido M, Fernandez-Segura E, Roomans GM (2004) Neuropeptides, apoptosis and ion changes in prostate cancer. *Methods of study and recent developments. Histol Histopathol* 19:951-961.

Vogt C (1842) Untersuchungen über die entwicklungsgeschichte der geburtshelferkröte (*alytes obstetricians*). En Gannman, J U Solothurn:130.

Von Euler A, Palsgard E, Vult Von Steyern C, Roomans GM (1993) X-ray microanalysis of epithelial and secretory cells in culture. *Scanning Microsc* 7:191-202.

Waters SL, Miller GW, Aleo Md, Schnellmann RG (1997a) Neurosteroid inhibition of cell death, *Am J Physiol* 273:869-876.

Waters SL, Sarang SS, Wang KKW, Schnellman RG (1997b) Calpains mediated Calcium and chloride influx during the late phase of cell injury. *J. Pharmacol Exp Ther* 238:1177-1184.

Waters SL, Schnellman RG (1996) Extracellular acidosis and chloride channel inhibitors acts in the late phase of celular injury to prevent death. *J. Pharmacol Exp Ther* 278:1012-1017.

Warley A (1993) Quantitative X-ray microanalysis on this sections in biology: appraisal and interpretation of results . In: Sige DC, Morgan AJ, Summer AT, Warley A (eds). *X-ray microanalysis: comparison of whole cells with cryosections. J Microsc* 175:143-153.

Warley A (1994a) The preparation of cultured cells for X-ray microanalysis. *Scanning Microsc* VIII:129-138.

Warley A, Cracknell KPB, Cammish HB, Twort CHC, Ward JPT, Hisrt SJ (1994 b) Preparation of cultured airway smooth muscle for study of

intracellular element concentration by X-ray microanalysis: comparison of whole cells with cryosections. *J Microsc* 175:143-153.

Warley A (1997) *X-ray microanalysis for biologists*. Portland Press, London, UK.

Warley A, Skepper JN (2000) Long freeze-drying times are not necessary during the preparation of thin sections for X-ray microanalysis. *J Microsc* 198:116-23.

Walther UI, Siagan II, Walther SC, Reich FX, Hickel R (2004) Antioxidate vitamins decrease cytotoxicity of HEMA and TEGDMA in cultured cell lines. *J Biomed Mater Res* 49:125-131.

William D (1987) *Definitions in Biomaterials*. Oxford Elsevier.

Wyllie AH, Goldstein P (2001) More than one way to go. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11-13.

Wroblewski J, Muller RM, Wroblewski R, Roomans GM (1983) Quantitative X-ray microanalysis of semi-thick cryosections. *Histochem* 77:447-463.

Wroblewski J, Roomans GM (1984) X-ray microanalysis of single and cultured cells. *Scanning Electron Microsc IV*:1875-1882.

Wroblewski R, Johansson H, Grimelius L (1996) X-ray microanalysis of elemental changes in human parathyroid glands in primary and secondary hyperparathyroidism. *Histochem Cell Biol* 105:467-473.

Yamada Y, Fukuda A, Tanaka M, Shimano Y, Nishino H, Muramatsu K, Togari H, Wada Y (2001) Optical imaging reveals cation--Cl(-) cotransporter-mediated transient rapid decrease in intracellular Cl(-) concentration induced by oxygen--glucose deprivation in rat neocortical slices. *Neurosci Res* 39:269-80.

Yakolev AG, Faden AI (2004) Mechanism of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies. *J Am Soc Exp Neurother* 1:5-16.

Yokohama Y, Okubo T, Kano I, Sato S, Kano K (2003) Induction of apoptosis by mono (2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) in U937 cells. *Toxicol Lett* 144:371-381.

Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme *Cell* 75:641-652.

Yu SP, Canzoneiro LMT, Choi DW (2001) Ion homeostasis and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 13:405-411.

Zabiti S, Arrebola F, Cañizares FJ, Cubero MA, Fernández-Segura E, Crespo PV, Campos A (2001) Elemental composition during the apoptotic degradation phase. *Int J of Develop Biol*, A45, suplemento:163-164. Estados Unidos.

Zabiti S (2002) Alteración de la homeostasis iónica durante la lesión celular inducida por hipoxia metabólica. Papel de los iones monovalentes. Tesis Doctoral, Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, España.

Zhang AL, Roomans GM (1997) Ion transport in cultured pig tracheal submucosal gland acinar cells studied by X-ray microanalysis. *Eur Respir J* 10:2204-2209.

Zhang W, Roomans GM (1998) Volume-induced chloride transport in HT29 cells studied by X-ray microanalysis. *Microsc Res Tech* 40:72-78.

Zierold K (1997) Effects of cadmium on electrolyte ions in cultured rat hepatocytes studied by X-ray microanalysis of cryosections. *Toxicol Appl Pharmacol* 144:70-76.

Zierold K (2000) Heavy metal cytotoxicity studied by electron probe X-ray microanalysis of cultured rat hepatocytes. *Toxicol in Vitro* 14: 557-536.

Zierold K, Schäfer D (1988) Preparation of cultured and isolated cells for X-ray microanalysis. *Scanning Microsc.* 2:1775-1790.

Zucco F (1992) Use of continuous cell lines for toxicological studies. In: Castell JV, Gómez Lechón MJ (eds). *In vitro alternative to animal pharmacotoxicology*. Farmaindustria, Madrid.