

**UNIVERSIDAD NACIONAL
DE CÓRDOBA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA Y
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



“Evaluación de la biocompatibilidad de dos cementos de ionómeros vítreos en un modelo experimental de fibroblastos gingivales humanos.”

TESIS DOCTORAL

CARLOS ALFREDO ROZAS FERRARA

2010

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Carlos Alfredo Rozas Ferrara
D.L.: GR 2951-2010
ISBN: 978-84-693-2547-6



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Departamento de Histología

Grupo de Investigación de Ingeniería Tisular CTS - 115

**“Evaluación de la biocompatibilidad de
dos cementos de ionómeros vítreos en un modelo
experimental de fibroblastos gingivales humanos.”**

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

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

Fdo:

Granada, 26 Febrero de 2010

“Evaluación de la biocompatibilidad de dos cementos de ionómeros vítreos en un modelo experimental de fibroblastos gingivales humanos.”

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

Fdo: Carlos Alfredo Rozas Ferrara

VºBº El Director de Tesis

VºBº El Director de Tesis

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

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

VºBº El Director de Tesis

Fdo.: Dr. Ismael Angel Rodriguez
Profesor de la Cátedra de Histología “B”
Facultad de Odontología
Universidad Nacional de Córdoba (Argentina)

Departamento de Histología
Universidad de Granada
2010

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

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

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

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

A la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. A la Prof. Dra. María del Carmen Visvisian, Decana de la Facultad de Odontología de Córdoba sin cuyo apoyo no hubiese

sido posible la realización del doctorado. Por su compromiso y el constante estímulo a seguir creciendo.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Cementos de ionómero vítreo.....	6
1.2. Complejo Dentinopulpar	7
1.2.1. Dentina.....	7
1.2.1.1. Capa Estirada, deformada o smear layer	8
1.2.1.2. Permeabilidad	10
1.2.1.3. Acción del acondicionamiento ácido sobre dentina.....	11
1.2.2. Pulpa Dentaria	11
1.2.2.1 Zonas topográficas de la pulpa dental.....	12
1.3. Citotoxicidad de los biomateriales	13
1.3.1. Métodos de evaluación de citotoxicidad de los biomateriales.	14
OBJETIVOS	19
Objetivo General:	19
Objetivos Específicos:.....	19
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
2.1. Material y Reactivos.....	21
2.1.1. Material	21
2.1.2. Reactivos	21
2.2. Cementos de ionómero vítreo.....	21
2.3. Cultivo Celular. Obtención de la muestra	22
2.4. Obtención de cultivos primarios de fibroblastos de mucosa oral	22
2.5. Subcultivo de fibroblastos procedentes de cultivos primarios de mucosa oral	23
2.6. Tratamiento de las muestras	24
2.7. Estudio de la citotoxicidad mediante la cuantificación de LDH libre.....	24
2.8. Estudio de la citotoxicidad mediante la cuantificación de ADN libre	25
2.9. Estudio morfológico	25
2.9.1. Microscopía óptica.....	26
2.9.2. Microscopía láser confocal	26
2.10. Estudio de la citotoxicidad mediante microanálisis por energía dispersiva de Rayos X.	26
2.10.1. Adhesión de las células al soporte	26
2.10.2. Eliminación del medio extracelular	27
2.10.3. Criofijación y Criodesecación de las muestras	27
2.10.4. Montaje y recubrimiento de las muestras	28
2.10.5. Instrumentación.....	28
2.10.5.1. Parámetros analíticos y condiciones de observación.....	28
2.10.5.2. Observación de las muestras	28
2.11. Estudio estadístico.....	32

3. RESULTADOS	33
3.1. Resultados del estudio de la citotoxicidad mediante la cuantificación del LDH libre	34
3.2. Resultados del estudio de la citotoxicidad mediante la cuantificación de ADN libre.....	39
3.3. Resultados del estudio de la citotoxicidad mediante el análisis morfológico	43
3.3.1. Microscopía Óptica.	43
3.3.2. Microscopía Láser Confocal	45
3.4 Resultados del estudio de la citotoxicidad mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X	49
3.4.1 Análisis cualitativo.....	49
3.4.2 Análisis cuantitativo	49
4. DISCUSIÓN	74
5. CONCLUSIONES	86
6. RESUMEN	89
7. SUMMARY	91
8. BIBLIOGRAFÍA	93

1. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La protección del complejo dentino pulpar ha sido y es una preocupación para la Odontología Restauradora ya que al superar la unión amelodentinaria durante el tallado de una preparación cavitaria, inevitablemente se seccionan numerosos túbulos dentinarios, que contienen o no prolongaciones odontoblásticas y nervios y que generan como consecuencia la salida de fluido dentinario. Se produce así un desequilibrio en la interrelación existente entre los diversos componentes del tejido dentinario, lo que implica la necesidad de sellar y proteger el isosistema dentino-pulpar (Uribe Echevarría, 2002; Uribe Echevarría et al., 2003).

El advenimiento de los cementos de ionómero vítreo y sus propiedades adhesivas a los sustratos dentarios y específicamente a la dentina, ha transformado a este biomaterial en un material de elección para la protección del complejo dentino-pulpar. Sin embargo algunos autores señalan que determinados cementos de ionómeros vítreos podrían ser citotóxicos (Palmer et al., 1999; Costa et al., 2003; Souza et al., 2006).

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

En la actualidad se sabe que los materiales no son sustancias inertes y al ser aplicados sobre los tejidos, pueden no sólo originar daño tisular o celular, sino ocasionar una respuesta específica local y/o sistémica (Wataha et al., 1996).

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

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

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

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

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

1.1. Cementos de ionómero vítreo

Los cementos de ionómero vítreo son materiales de uso odontológico que se presentan comercialmente como polvo y líquido. El líquido está compuesto por ácidos polialquenoico, maleico, tartárico, itacónico, con sus sales y el polvo es un vidrio amorfo de sílice y alúmina modificado con fluoruros y óxidos metálicos. Este vidrio es capaz de reaccionar con soluciones ácidas en virtud de la facilidad con la que el aluminio es desplazado y liberado de la estructura vítrea.

Los ionómeros vítreos tienen la propiedad de adherirse a las estructuras dentarias a través de una unión química entre los grupos carboxílicos y el calcio de la hidroxiapatita del esmalte y la dentina (Edelberg, 2003). Al ser moléculas polares, tienen la capacidad de intercambiar iones con la estructura dentaria, y así el esmalte toma fluoruros del material, remineralizando su estructura y ayudando así a prevenir la aparición de caries además de favorecer la remineralización de caries incipientes del esmalte dental. Por tanto este material con características adhesivas resulta ser muy útil para el profesional que debe resolver distintas situaciones clínicas.

Los ionómeros de vítreos se clasifican en dos grandes grupos:

- Ionómeros Vítreos Convencionales (IVC), cuyo fenómeno de endurecimiento es químico por reacción ácido-base.
- Ionómeros Vítreos modificados con Resina, o Ionómeros Vítreos Híbridos (IVR), que endurecen por reacción ácido-base y por fotopolimerización de sus monómeros resinosos. Tienen como monómero resinoso principal al HEMA (Edelberg, 2003).

Ambos se preparan sobre un block de papel satinado con espátula de plástico y por lo general se mezcla una gota de líquido con una cucharada de polvo. Estos materiales pueden tener diferentes aplicaciones clínicas como (Edelberg, 2003):

- Selladores de fosas y fisuras oclusales.
- Cementado de prótesis fijas y bandas de ortodoncia.
- Liners o forros cavitarios.
- Bases protectoras dentino-pulpaes.

- Odontopediatría
- Técnica ART

1.2. Complejo Dentinopulpar

La dentina y la pulpa dental son consideradas un complejo en el que conforman en primer lugar, una unidad estructural, al transitar las prolongaciones de los odontoblastos dentro de los túbulos de la dentina y, en segundo lugar, una unidad funcional, ya que la pulpa mantiene la vitalidad de la dentina y la dentina protege la pulpa. En tercer lugar, la dentina y la pulpa comparten un mismo origen embriológico ya que derivan del ectomesénquima que forma la papila del germen dentario (Ferraris y Campos, 2009).

1.2.1. Dentina

La dentina por tener en su interior las prolongaciones citoplasmáticas de los odontoblastos y por la presencia de linfa o licor dentinario que la nutre, es considerada un tejido vivo (Ferraris y Campos, 2009). Está compuesta por túbulos en medio de una matriz dentinaria parcialmente mineralizada. Alrededor de los túbulos hay una capa de dentina hipermineralizada denominada dentina peritubular. El número de túbulos varía según la profundidad oscilando entre 15.000 a 20.000 por mm^2 en la dentina superficial para llegar de 45.000 a 65.000 por mm^2 en la dentina profunda (Carda y Peydró, 2006). La luz de los túbulos es variable según la profundidad y alcanza su mayor valor en las proximidades de la pulpa, siendo tres veces mayor que en la dentina superficial. En consecuencia, esto determina una mayor permeabilidad del tejido en profundidad que disminuye considerablemente a medida que se acerca a la unión amelodentinaria. La continua formación de dentina durante toda la vida determina un aumento del grosor de la dentina peritubular, que en un diente joven es de 400nm en las proximidades de la pulpa y de 750nm cerca del esmalte, ocasionando la reducción del diámetro interno de estos túbulos, que es mayor en las proximidades de la pulpa (Costa, 1997). Esta dentina se caracteriza por su carencia en fibras colágenas. La aposición de dentina es un mecanismo protector natural para proteger la pulpa de las lesiones y es la respuesta normal a

estímulos crónicos, como caries de avance lento, irritación leve por materiales dentales, atrición lenta y microfiltraciones. En cambio, las lesiones traumáticas, las preparaciones cavitarias que inducen cambios térmicos, las deshidrataciones o vibraciones y el uso imprudente de los materiales de restauración irritan en forma aguda a la pulpa y por lo tanto, la respuesta defensiva es distinta (Studervant et al., 1996).

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

Estas características estructurales sufren importantes modificaciones con la edad. La dentina peritubular se ensancha, disminuyendo el diámetro interno de los túbulos por el depósito de material calcificado. Este proceso se denomina esclerosis fisiológica de la dentina para diferenciarla de la esclerosis reactiva de la dentina que se produce en respuesta a un estímulo leve. (Avery, 1994; Studervant et al., 1996).

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

1.2.1.1. Capa Estirada, deformada o smear layer

Es una capa de 1 a 5 micrometros de espesor, constituida por los cristales submicroscópicos de hidroxilapatita, envueltos en restos orgánicos alterados,

producidos durante el corte o desgaste de los tejidos dentarios que se deposita sobre las paredes de la preparación cavitaria a las que se adhiere mecánica y químicamente (Uribe Echevarría et al., 2003).

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

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

El smear layer y el smear plugs pueden reducir la permeabilidad dentinaria hasta en un 86% (Erickson et al., 1992). La presencia o no de esta capa juega un papel importante en el grado de permeabilidad del sustrato dentinario y en los mecanismos de adhesión. Su eliminación con sustancias ácidas durante la aplicación de protocolos adhesivos no es aceptado totalmente. Se produce la ampliación de la luz de los túbulos por descalcificación, presencia de fibras de colágeno parcialmente desnaturalizadas, una intensa salida de fluido dentinario del interior del tejido pulpar y se favorece la difusión de los monómeros hidrófilos hacia el interior de los túbulos.

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

1.2.1.2. Permeabilidad

Se denomina permeabilidad dentinaria o transdentinaria al movimiento del fluido dentinario a través de los túbulos desde la pulpa dentaria hacia la unión amelodentinaria y viceversa (Uribe Echevarría et al., 2003) Este movimiento constante hace que el complejo dentino pulpar se comporte como una bomba aspirante-impelente y sea el responsable del estímulo hidrodinámico. (Pashley, 1992, 1996; Uribe Echevarría, 1997, 2003). La teoría hidrodinámica de Bränström es en la actualidad, la más aceptada para explicar el mecanismo de la sensibilidad dentinaria (Ferraris y Campos, 2009). Por otra parte, la difusión intratubular e intertubular se refiere a el flujo de sustancias exógenas hacia el interior de la dentina (Pashley, 1984, 1992).

El grado de permeabilidad y difusión dentinaria varía según la profundidad de las lesiones y/o preparaciones cavitarias, la dirección de las paredes y la edad del paciente. Es significativamente mayor en dentina profunda por el mayor número y diámetro de los túbulos por área y en las paredes pulpares, donde los túbulos están seccionados transversalmente, mientras que en las paredes laterales donde los túbulos son sorprendidos longitudinalmente no influyen en el grado de permeabilidad. De ello resulta que este sustrato dentinario ofrece características muy diferentes para los mecanismos de adhesión, siendo la pared pulpar, la que presenta mayores dificultades para lograr adhesión, además del riesgo que significa la posibilidad de difusión de sustancias iones, bacterias, toxinas o sustancias citotóxicas, al estar en estrecha relación con el tejido pulpar.

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

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

1.2.1.3. Acción del acondicionamiento ácido sobre dentina

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

El acondicionamiento ácido no debe ser utilizado indiscriminadamente sin observar algunos principios básicos como concentración del ácido, tipo de ácido y su capacidad de disociación iónica, que sería un factor de irritación pulpar en cavidades profundas o con pulpa expuesta.

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

1.2.2. Pulpa Dentaria

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

La capa exterior de la pulpa que contacta con la capa interior de la dentina, está formada por los cuerpos celulares de los odontoblastos, (células diferenciadas y terminales que no tiene mitosis). Inmediatamente por debajo de esta capa se

encuentra una zona acelular, rica en terminaciones nerviosas sensitivas y capilares sanguíneos. La mayor parte del tejido pulpar esta formado por células mesenquimatosas, células defensivas y fibroblastos, colágeno, sustancia fundamental, arteriolas, capilares y vénulas, vasos linfáticos, troncos nerviosos sensitivos y terminaciones sensitivas libres. Este tejido brinda a los odontoblastos el aporte metabólico durante la formación inicial dentinaria como durante el desarrollo de la dentina de reacción. Si por alguna razón los odontoblastos mueren pero sobreviven los restantes tejidos de la pulpa, se pueden diferenciar nuevos odontoblastos a partir del ectomesénquima pulpar y depositar dentina reparadora irregular (Avery, 1994; Mount y Bryant, 1999).

1.2.2.1 Zonas topográficas de la pulpa dental.

Zona Odontoblástica: Está conformada por células específicas llamadas odontoblastos que se disponen adyacente a la predentina, formando una sola capa en la periferia de la pulpa. Pertenecen tanto a la pulpa como a la dentina, porque si bien su cuerpo se localiza en la periferia pulpar, sus prolongaciones se alojan en los túbulos de la dentina (Ferraris y Campos, 2009).

Los odontoblastos aparecen dispuestos como en empalizada con características morfológicas variadas, columnares en la zona coronaria y cuboides en la raíz. Estas células se asocian unas a otras por los sistemas de unión lo que le permite entre sus variadas funciones, cambios metabólicos (Costa y Hebling, 2003). En la parte coronaria el número de estas células y por lo tanto de túbulos es aproximadamente de 45.000 por mm^2 en la dentina coronaria. Su forma puede variar de acuerdo a la actividad funcional, cuando se encuentra en estado de reposo se presenta aplanada con escaso citoplasma, mientras que el odontoblasto activo se presenta como una célula grande con citoplasma basófilo (Ten Cate, 1986). La prolongación odontoblástica comienza en el mismo cuello de la célula y se extiende dentro del túbulo dentinario emitiendo prolongaciones laterales que los conectan entre si. La longitud de su extensión es discutida, aunque existen trabajos con microscopía electrónica de barrido y de transmisión, que demuestran que pueden llegar hasta la conexión amelodentinaria.

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

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

Zona rica en células: Junto a la zona acelular existe una capa rica en células denominadas mesenquimales indiferenciadas. Estas células embrionarias están relacionadas con el mantenimiento de la capa odontoblástica y la respuesta reparativa del tejido pulpar (Fitzgerald, 1979; Avery, 1994). Constituyen por tanto una población de reserva que tiene la capacidad de diferenciarse en nuevos odontoblastos productores de dentina o también en fibroblastos productores de matriz pulpar, según el estímulo que actúe sobre ellos (Avery, 1994; Ferraris y Campos, 2009).

Zona de la pulpa propiamente dicha:

En esta zona están presentes los fibroblastos que son las células más abundantes del tejido conectivo pulpar. Su función es la de formar y mantener la matriz de la pulpa. Secretan los precursores de las fibras colágenas, reticulares y elásticas y la sustancia fundamental de la pulpa. Son células multifuncionales, pues tienen también la capacidad de degradar el colágeno, como respuesta ante distintos estímulos fisiológicos del medio interno. Se piensa también que estas células pueden tener la capacidad de originar nuevos odontoblastos en la periferia de la pulpa (Ten Cate, 1986; Ferraris y Campos Muñoz, 2009; Avery, 1994).

1.3. Citotoxicidad de los biomateriales

Diversos autores a través de estudios “in vivo” e “in vitro”, han demostrado que, en general, los componentes que forman los adhesivos dentales son de naturaleza citotóxica. Así componentes como el HEMA (hidroxietilmetacrilato), el BISGMA (bis-glicidil-metacrilato), el TEGDMA (trietilenglicoldimetacrilato), el UDMA (uretan-dimetacrilato), han sido analizados, en su actividad citotóxica, por separado o bien en forma combinada, en dosis y tiempos diferentes sobre distintas líneas celulares (Costa et al., 1997; Hebling et al., 1999; Schuster et al., 2000; Soheili et al., 2003;

Rodriguez et al., 2008). Ahora, si bien es conocido el efecto citotóxico de estos materiales cuando se ponen en contacto directo con la pulpa dental, estudios recientes afirman que los mecanismos específicos de muerte celular no son del todo claro. El efecto citotóxico de los adhesivos dentales constituye por ello, una limitación todavía no resuelta en este tipo de terapia odontológica (Bouilaguet et al., 1996; Kehe et al., 2001).

La mayoría de los adhesivos resinosos tienen como componente monomérico principal al HEMA, el cual posee un bajo peso molecular, lo que le permite una mayor capacidad de difusión por los túbulos dentinarios. Es por ello que “los productos comerciales de los agentes adhesivos dentinarios, no recomiendan la utilización de los ácidos acondicionadores en alta concentración o de los agentes adhesivos sobre dentina profunda o sobre la pulpa misma, sino que se exalta el valor de la protección pulpar con los cementos de hidróxido de calcio o de ionómero de vidrio” (Uribe Echevarría et al., 2003).

Ocurre que los ionómeros vítreos modificados con resina, también tienen como monómero principal al HEMA y utilizados en dentina profunda, estos monómeros parcialmente polimerizados, permanecen libres en el fluido dentinario pudiendo llegar a través de los túbulos dentinarios a la pulpa; comportándose como tóxico y agresivo para esta. De esta forma, un material que es biocompatible cuando se aplica en dentina superficial y media perdería esa propiedad al usarlo en dentina profunda con elevada permeabilidad. Sin embargo, los estudios de biocompatibilidad de los cementos de ionómero de vidrio presentes en la literatura son controversiales (Olio, 1991; Six et al., 2000; Souza et al., 2006).

1.3.1. Métodos de evaluación de citotoxicidad de los biomateriales.

La capacidad de los diferentes tóxicos para ocasionar el daño celular, es decir, la citotoxicidad, va a depender de las propiedades físicas y químicas de estos, si bien su vía común final va a consistir en incidir sobre un sistema enzimático, dando lugar a una inhibición que será reversible o irreversible. Por otro lado, tal acción estará localizada de forma selectiva sobre sitios específicos de la célula. Tal es el caso de las lesiones sobre la membrana, en las que generalmente se ve alterada la estructura lipoproteica y con ello la permeabilidad de ésta, lo que conlleva a la salida

de nutrientes o de iones. También puede actuar a nivel endocelular, donde a su vez los bloqueos pueden ocasionarse por diversos mecanismos (ciclo de Krebs, síntesis de ácidos grasos, etc.). Por último, la lesión ocasionada por estas sustancias puede tener también como objetivo a veces las organelas celulares, tales como las mitocondrias (responsables de los mecanismos de oxidación), el sistema microsómico, los ribosomas (síntesis de proteínas) y el sistema retículo-endoplásmico (inducción enzimática y biodegradación) y las lesiones del núcleo (replicación del ADN y síntesis de proteínas nucleares) (Gisbert, 1998).

La forma de valorar la citotoxicidad puede llevarse a cabo en diferentes fases. Por una parte encontramos las pruebas iniciales, que incluyen modelos para la citotoxicidad in vitro, en la que los materiales han de ponerse en contacto directo con células cultivadas en laboratorio. A través de esta metodología se evalúa la morfología celular, las alteraciones en la síntesis de proteínas, la respiración mitocondrial, así como distintas actividades metabólicas y enzimáticas, por lo que son pruebas que se pueden estandarizar fácilmente. Además, este tipo de investigaciones evalúan la sensibilidad celular frente a los diferentes biomateriales y reducen por tanto la probabilidad de posteriores fracasos de biocompatibilidad en pruebas in vivo, las cuales resultan ser más caras y demandar un tiempo más prolongado.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

iónica intracelular permite evaluar la viabilidad celular y por tanto la posible citotoxicidad de la célula. De todo lo arriba indicado y teniendo en cuenta los escasos estudios existentes en relación con la citotoxicidad de los ionómeros vítreos utilizados en la práctica odontológica, los objetivos a alcanzar en la presente tesis doctoral son los siguientes:

OBJETIVOS

Objetivo General:

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

Objetivos Específicos:

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

2. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material y Reactivos

2.1.1. Material

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

2.1.2. Reactivos

Los siguientes reactivos fueron suministrados por Sigma-Química (Madrid, España): medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (D5796, Saint-Quentin-Fallavier, Francia), antibióticos (500 U/ml de penicilina G y 500 μ g/ml de estreptomina) (Ref. A5955), antimicóticos (1.25 μ g/ml de anfotericina B) (Ref. A5955) y suero bovino fetal (SBF). El kit para el test de citotoxicidad LDH (Lactato Dehidrogenasa) (Citotoxicity Detection Kit) fue suministrado por la casa Roche y el Tritón X-100 por Probus S.A. (Badalona, Barcelona).

2.2. Cementos de ionómero vítreo

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

Un ionómero vítreo convencional (IVC), Ketac-Molar Easymix (3M- ESPE, St Paul, MN, USA).

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

Tabla 1. Composición de los cementos de ionomero vítreo

Ketac-Molar Easymix	<p>Polvo: vidrio de fluoroaluminosilicato, ZnO, ácido policarboxílico y pigmentos.</p> <p>Líquido: agua, copolímero acrílico calcio, ácido maleico, ácido tartárico, ácido benzoico.</p>
Vitrebond	<p>Polvo: polvo de vidrio (O, SrO, criolito, NH₄F, MgO, P₅O), 2% difeniliodocloro.</p> <p>Líquido: 35-45% ácido poliacrílico, 20-30% de 2-hidroxietilmetacrilato, 30-40% de agua.</p>

2.3. Cultivo Celular. Obtención de la muestra

En esta tesis doctoral como modelo experimental se utilizaron células fibroblásticas de tejido gingival humano. Las mismas fueron obtenidas de pacientes clínicamente sanos tratados en el Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada. Previamente leído y aceptado el consentimiento informado, se obtuvo la muestra de tejido gingival humano que fue introducido inmediatamente en medio de transporte estéril constituido por medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich Ref. D5796, Saint- Quentin-Fallavier, Francia) suplementado con antibióticos (500 U/ml de penicilina G y 500 µg/ml de estreptomina) y antimicóticos (1.25 µg/ml de anfotericina B) (Sigma-Aldrich Ref. A5955) para evitar una eventual contaminación de la muestra.

2.4. Obtención de cultivos primarios de fibroblastos de mucosa oral

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

Para llevar a cabo la separación de epitelio y conectivo, las muestras fueron incubadas a 37°Celsius en una solución estéril de colagenasa tipo I de clostridium hystoliticum (Gibco BRL Life Technologies Ref. 17100-017, Karlsruhe, Alemania) al 2% en medio de cultivo DMEM durante 10-12 horas. Separado el epitelio del corion,

como esta solución es capaz además, de digerir colágeno y liberar los fibroblastos estromales, se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos la solución de digestión que contenía las células estromales disgregadas del corion, recogándose el pellet celular correspondiente a los fibroblastos en frascos de cultivo de 15 cm² de superficie.

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

2.5. Subcultivo de fibroblastos procedentes de cultivos primarios de mucosa oral

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

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

a) Placas de 24 pocillos, para el estudio de LDH, y liberación de ADN.

b) Rejillas de oro, para su estudio mediante técnicas de microscopía electrónica analítica cuantitativa.

2.6. Tratamiento de las muestras

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

Las muestras fueron divididas en cuatro grupos experimentales:

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

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

Grupo 3: Ketac-Molar Easymix (IVC).

Grupo 4: Vitrebond (IVR).

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

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

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

Para determinar el porcentaje de citotoxicidad mediante la liberación de la enzima citosólica lactato deshidrogenasa (LDH), en todos los casos anteriormente

mencionados, se empleó un Kit de la casa Roche (Cat. No. 1 644 793). Para ello se tomó 100µl de sobrenadante de cada grupo experimental y se añadió 100µl de la solución Kit en una placa de 96 pocillos. La cuantificación de la enzima LDH liberada al medio, se realizó en un aparato lector de placas ELX – 800 de Biotek.

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

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

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

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

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

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

- Longitud de onda para la detección de ADN: 260nm
- Factor de conversión: 1 = 50µg/ml
- Factor de dilución: 10×

2.9. Estudio morfológico

Para la observación de las muestras se utilizó en el presente trabajo la metodología de microscopía óptica y la microscopía de barrido láser confocal.

2.9.1. Microscopía óptica

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

2.9.2. Microscopía láser confocal

Para observar nuestras células con microscopía láser confocal se fijaron con formaldeído al 4% durante cuatro horas, luego se lavaron con agua destilada y se colorearon con eosina. Posteriormente fueron analizados con un microscopio LSM 5 Pascal (Zeiss) utilizando un láser verde de 543nm de longitud de onda por transmisión, epifluorescencia, barrido o en mapa de gradientes (stacks) y procesados con analizador de imágenes Zeiss LSM Image Browser.

2.10. Estudio de la citotoxicidad mediante microanálisis por energía dispersiva de Rayos X

Con el objetivo de analizar las alteraciones en la composición elemental de los fibroblastos gingivales humanos expuestos a la acción de los diferentes cementos de ionómero vítreo se utilizó el microanálisis por energía dispersiva de Rayos X. El procesamiento de las muestras a analizar fué el siguiente:

2.10.1. Adhesión de las células al soporte

Los fibroblastos gingivales humanos mantenidos en falcon con medio de cultivo DMEM se tripsinizaron y se cultivaron sobre rejillas de oro (Ref.G100–G3) especiales para microscopía electrónica. Con el objeto de eliminar restos de materia orgánica que pudo haberse depositado sobre las mismas, las rejillas fueron lavadas con cloroformo, aclaradas con etanol absoluto y nuevamente lavadas en solución de ácido acético 2%, dejándose secar a continuación al aire. Para permitir el crecimiento de las células sobre las rejillas de oro, se aplicó una fina capa de pioloformo (Fig. 1).

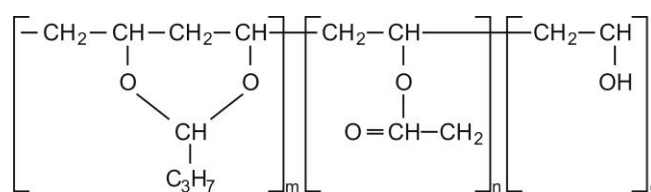


Figura 1. Estructura química del polivinil butiral (pioloformo).

Las células fueron expuestas a la acción de los biomateriales IVC e IVR en las condiciones experimentales desarrolladas en el punto 2.6.

2.10.2. Eliminación del medio extracelular

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

2.10.3. Criofijación y Criodesecación de las muestras

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

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

Tabla 2, y desarrollado de acuerdo con los criterios establecidos por Warley y Skepper (2000).

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

Tabla 2. Programa de intervalos de tiempo y temperaturas utilizadas para la criodesecación de las muestras en un sistema de alto vacío.

2.10.4. Montaje y recubrimiento de las muestras

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

2.10.5. Instrumentación

2.10.5.1. Parámetros analíticos y condiciones de observación

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

2.10.5.2. Observación de las muestras

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

Voltaje del microscopio:.....10 KV
 Angulación de superficie:.....0°
 Distancia de trabajo:.....10mm

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

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

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

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

Donde:

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

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

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

Z^2/A es el valor medio del número atómico al cuadrado por el peso atómico, correspondiente un valor específico para el dextrano y las células (Warley, 1997).

Para la elaboración de los patrones se tomaron en cuenta las pautas establecidas en el laboratorio del Departamento de Histología de la Facultad de Odontología y Medicina de Granada (Crespo et al., 1993; López Escámez y

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

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

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

Donde:

C_{ts} es la concentración del elemento en el patrón, la cual es conocida,

(P_{std}/B_{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.

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. 2).

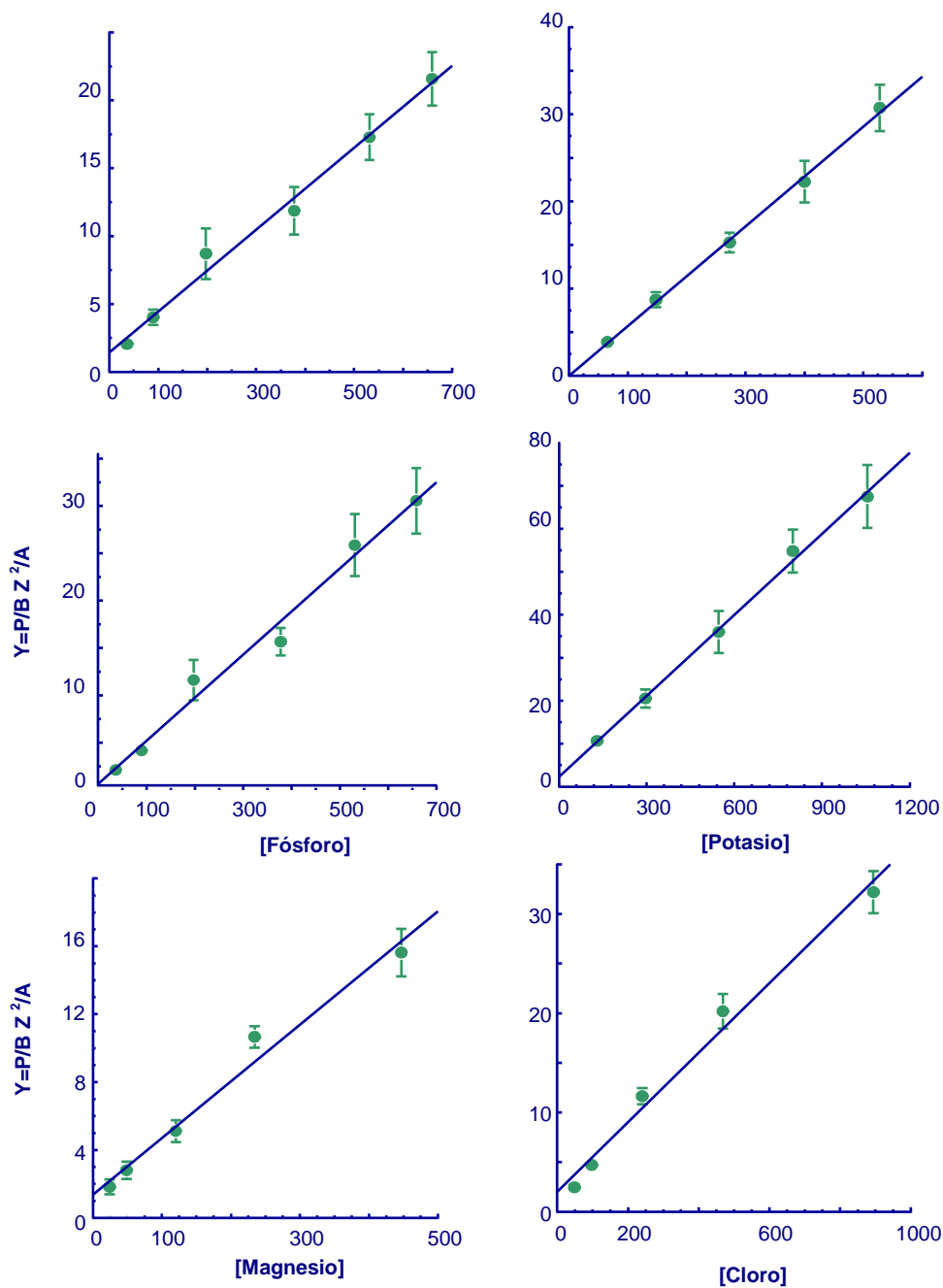


Figura.2. Representación de la razón $Y = Pstd/Bstd. Z^2/A$ como una función de $Cstd$ para los patrones de P, Mg, K y Cl 10 kV. Cada valor representa la media \pm SD de 15-20 análisis. Los patrones de calibración fueron preparados de forma idéntica a los fibroblastos gingivales humanos. Las soluciones en dextrano al 20% con las diferentes concentraciones de las sales inorgánicas empleadas fueron depositadas sobre filtros de policarbonato (tamaño de poro de $0.4 \mu m$) aislados de sus soportes de polistireno, criofijadas en nitrógeno líquido, criodesecadas y analizadas en un microscopio Philips XL30 utilizando idénticas condiciones instrumentales y analíticas a las indicadas en el apartado 2.10.5. del capítulo de Material y Métodos.

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

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

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

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

Donde:

Z_i es el número atómico del elemento i,

A_i es el peso atómico de dicho elemento,

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

En la Tabla 3 se muestran las ecuaciones de regresión obtenidas para todos los elementos cuando $Y = P_{std}/B_{std} \cdot Z2/A$ se calibró frente a C_{std} para los elementos Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca analizados a 10 kV.

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

Tabla 3. Ecuaciones de regresión obtenidas cuando $Y = P_{std}/B_{std} \cdot Z2/A$ se calibró frente a C_{std} analizados a 10 kV.

2.11. Estudio estadístico

Para determinar diferencias globales entre todos los grupos experimentales se empleó la prueba de Kruskal-Wallis. Para identificar las diferencias entre dos grupos concretos se realizó la prueba de Mann-Whitney.

3. RESULTADOS

RESULTADOS

Los resultados de los distintos ensayos realizados en esta tesis doctoral son los siguientes:

3.1. Resultados del estudio de la citotoxicidad mediante la cuantificación del LDH libre

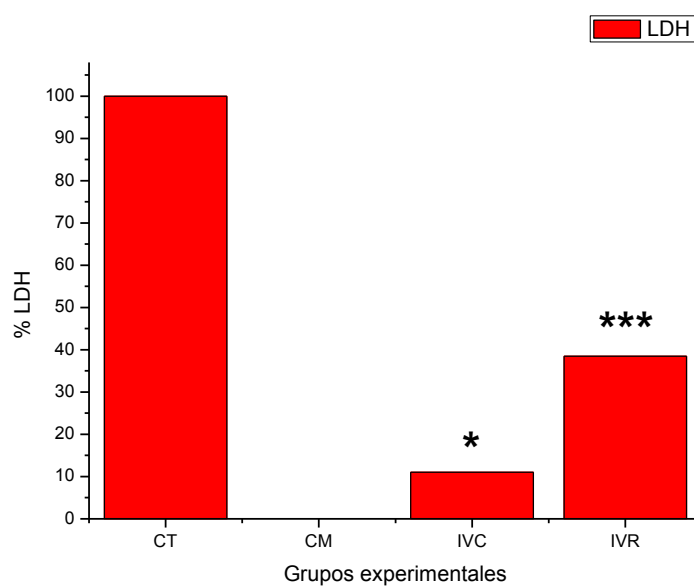
En la tabla 4 se exponen las concentraciones de la liberación de LDH y la expresión de estos valores en porcentajes de citotoxicidad a las 72 horas. Cada uno de los ensayos se presenta por triplicado. En la gráfica 1 se representan en forma comparativa los distintos materiales evaluados con respecto a los controles y su significación estadística con respecto al control negativo (CM).

Para la comparación de los valores medios de la liberación de LDH entre los diferentes grupos de muestras (CT, CM, IVC, IVR), se utilizó la de prueba de Kruskal Wallis. Para comparar dos grupos concretos se utilizó la prueba de Mann-Whitney. En la tabla 5 se especifican esos valores. Los valores estadísticamente significativos se señalan en color azul.

Tabla 4. Concentraciones de liberación de LDH, y porcentaje de citotoxicidad.

	LDH 72 HS	IVC	IVR	CM	CT
ENSAYO 1	LDH 1	0,24	1,391	0,584	1,092
	LDH 2	0,243	0,314	0,599	1,065
	LDH 3	0,253	0,331	0,604	1,365
ENSAYO 2	LDH 1	0,24	0,309	0,262	1,818
	LDH 2	0,247	0,542	0,215	1,257
	LDH 3	0,535	0,714	0,232	1,208
ENSAYO 3	LDH 1	0,647	0,609	0,267	1,728
	LDH 2	0,669	0,706	0,224	1,171
	LDH 3	0,749	0,561	0,578	1,772
ENSAYO 4	LDH 1	0,273	1,391	0,308	1,138
	LDH 2	0,269	1,397	0,302	1,136
	LDH 3	0,276	1,314	0,288	1,181
ENSAYO 5	LDH 1	0,511	1,124	0,87	1,093
	LDH 2	0,508	0,971	0,308	0,902
	LDH 3	0,216	1,01	0,3	1,1
ENSAYO 6	LDH 1	0,273	1,029	0,277	1,014
	LDH 2	0,269	1,042	0,253	1,014
	LDH 3	0,276	0,963	0,246	1,039
ENSAYO 7	LDH 1	0,3	0,566	0,536	1,15
	LDH 2	0,299	0,555	0,532	1,193
	LDH 3	0,406	0,563	0,512	1,19
ENSAYO 8	LDH 1	0,403	0,404	0,23	1,374
	LDH 2	0,404	0,41	0,391	1,386
	LDH 3	0,37	0,395	0,392	1,371
ENSAYO 9	LDH 1	0,249	0,657	0,332	1,182
	LDH 2	0,359	0,65	0,334	1,178
	LDH 3	0,302	0,658	0,334	1,176
ENSAYO 10	LDH 1	0,287	0,56	0,284	1,312
	LDH 2	0,224	0,56	0,299	1,193
	LDH 3	0,275	0,554	0,293	0,749
ENSAYO 11	LDH 1	0,367	0,626	0,258	0,678
	LDH 2	0,351	0,639	0,609	1,083
	LDH 3	0,326	0,633	0,769	1,078
ENSAYO 12	LDH 1	0,454	0,77	0,267	1,221
	LDH 2	0,438	0,767	0,264	1,146
	LDH 3	0,429	0,751	0,267	0,908

ENSAYO 13	LDH 2	0,373	0,688	0,28	1,278
	LDH 3	0,352	0,687	0,28	1,233
ENSAYO 14	LDH 1	0,461	0,626	0,26	1,164
	LDH 2	0,42	0,602	0,255	0,802
	LDH 3	0,42	0,581	0,263	0,962
ENSAYO 15	LDH 1	0,62	0,711	0,583	1,311
	LDH 2	0,686	0,73	0,569	1,298
	LDH 3	0,701	0,675	0,573	1,316
ENSAYO 16	LDH 1	0,665	0,666		
	LDH 2	0,612	0,648		
	LDH 3	0,596	0,62		
ENSAYO 17	LDH 1	0,576	0,623		
	LDH 2	0,572	0,608		
	LDH 3	0,562	0,625		
ENSAYO 18	LDH 1	0,485	0,546		
	LDH 2	0,515	0,563		
	LDH 3	0,506	0,554		
MEDIA		0,3965	0,636	0,3	1,1735
PORCENTAJE		11,04	38,46	0	100



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

Tabla 5. Comparación de valores medios de liberación de LDH entre los diferentes grupos de muestras (CT, CM, IVC, IVR).

Prueba de Kruskal-Wallis

IVC vs IVR vs CM vs CT	LDH
Chi-cuadrado	120,135
Gl	3
Sig. asintót.	7,21773E-26

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: IVC1IVR2CM3CT4-LDH

Prueba de Mann-Whitney

IVC vs IVR	LDH
U de Mann-Whitney	172,000
W de Wilcoxon	992,000
Z	-6,043
Sig. asintót. (bilateral)	1,51271E-09

a. Variable de agrupación: IVC1IVR2CM3CT4-LDH

IVC vs CM	LDH
U de Mann-Whitney	562,000
W de Wilcoxon	1.382,000
Z	-2,290
Sig. asintót. (bilateral)	0,022002939

a. Variable de agrupación: IVC1IVR2CM3CT4-LDH

IVC vs CT	LDH
U de Mann-Whitney	0,000
W de Wilcoxon	820,000
Z	-7,698
Sig. asintót. (bilateral)	1,38062E-14

a. Variable de agrupación: IVC1IVR2CM3CT4-LDH

IVR vs CM	LDH
U de Mann-Whitney	63,000
W de Wilcoxon	883,000
Z	-7,092
Sig. asintót. (bilateral)	1,32075E-12

a. Variable de agrupación: IVC1IVR2CM3CT4-LDH

IVR vs CT	LDH
U de Mann-Whitney	95,000
W de Wilcoxon	915,000
Z	-6,784
Sig. asintót. (bilateral)	1,16906E-11

a. Variable de agrupación: IVC1IVR2CM3CT4-LDH

CM vs CT	LDH
U de Mann-Whitney	0,000
W de Wilcoxon	820,000
Z	-7,698
Sig. asintót. (bilateral)	1,3777E-14

a. Variable de agrupación: IVC1IVR2CM3CT4-LDH

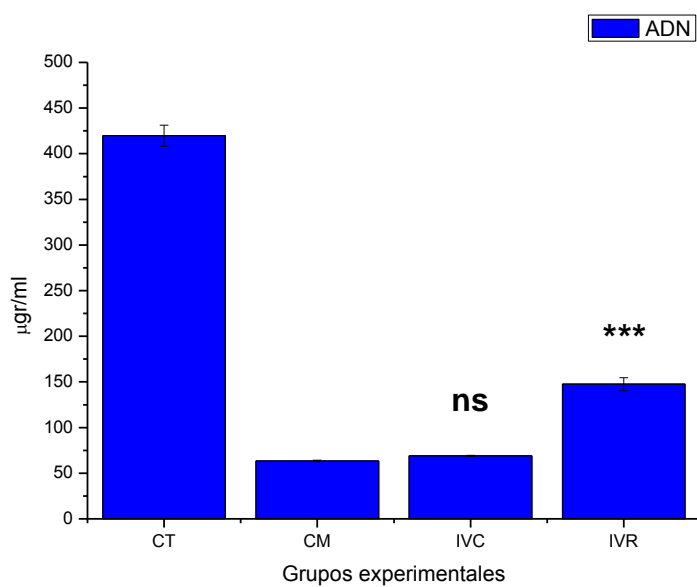
3.2. Resultados del estudio de la citotoxicidad mediante la cuantificación de ADN libre

Los resultados correspondientes a la liberación de ADN a las 72 horas se muestran en la tabla 6, y son expresados en $\mu\text{gr/ml}$. En la gráfica 2 se representan en forma comparativa los distintos materiales evaluados con respecto a los controles y su significación estadística con respecto al control negativo (CM).

Para la comparación de valores medios de la liberación de ADN entre los diferentes grupos de muestras (CT, CM, IVC, IVR) se utilizó la prueba de Kruskal Wallis. Para comparar dos grupos concretos se utilizó la prueba de Mann-Whitney. En la tabla 7 se especifican esos valores. Los valores estadísticamente significativos se señalan en color azul.

Tabla 6. Valores de la liberación de ADN que son expresados en $\mu\text{g/ml}$

	CONTROL TRITÓN	CONTROL MEDIO	KETAC MOLAR IVC	VITREBOND IVR
	514,3972	79,7918	69,6988	101,3899
	459,6375	73,9863	75,8137	95,209
	510,9326	78,2743	71,9404	106,4959
	434,9055	81,1807	78,4806	103,4642
	498,7543	64,6088	82,3682	125,9887
	639,6559	79,3278	74,6275	116,5901
	508,7609	69,6424	78,2056	115,7716
	834,8229	59,6758	83,1401	142,9005
	801,2534	63,9161	77,9995	109,4117
	719,4709	54,1247	80,8326	114,445
	363,2496	58,1156	78,3653	98,5964
	215,2309	64,2792	68,3677	83,464
	243,0035	38,8996	63,3362	82,3885
	176,8496	92,7462	42,2016	81,3636
	311,2141	44,1365	40,9793	63,2639
	237,1951	69,7266	45,6881	83,6565
	165,8987	51,5728	50,4785	69,5031
	197,9066	42,2892	36,7543	59,3202
	143,9536	37,2673	60,0319	64,643
			73,562	55,6563
			65,9026	91,0197
			63,9647	888,6279
			72,8619	667,8837
			102,2218	98,4465
			89,645	109,502
			69,6424	106,4518
MEDIA	419,84	63,34	69,11	147,61
DESVEST	218,5	15,77	15,61	186,03
ERROR ST	11,5000253	0,88034605	0,58925185	7,15536192



Gráfica 2. Representación de la liberación de ADN expresados en $\mu\text{gr/ml}$. ns= $p>0.05$; ***= $p<0.001$

Tabla 7. Comparación de valores medios de liberación de ADN entre los diferentes grupos de muestras (CT, CM, IVC, IVR).

Prueba de Kruskal-Wallis

IVC vs IVR vs CM vs CT	ADN
Chi-cuadrado	50,991
Gl	3
Sig. asintót.	4,9147E-11

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: IVC1IVR2CM3CT4-ADH

Prueba de Mann-Whitney

IVC vs IVR	ADN
U de Mann-Whitney	9,000
W de Wilcoxon	129,000
Z	-4,293
Sig. asintót. (bilateral)	0,000
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	3,53E-05

a. No corregidos para los empates.

b. Variable de agrupación: IVC1IVR2CM3CT4-ADH

IVC vs CM	ADN
U de Mann-Whitney	25,500
W de Wilcoxon	145,500
Z	-3,609
Sig. asintót. (bilateral)	0,000
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,245836

a. No corregidos para los empates.

b. Variable de agrupación: IVC1IVC2CM3CT4-ADH

IVC vs CT	ADN
U de Mann-Whitney	0,000
W de Wilcoxon	120,000
Z	-4,666
Sig. asintót. (bilateral)	0,000
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	1,38E-08

a. No corregidos para los empates.

b. Variable de agrupación: IVC1IVR2CM3CT4-ADH

IVR vs CM	ADN
U de Mann-Whitney	0,000
W de Wilcoxon	120,000
Z	-4,666
Sig. asintót. (bilateral)	0,000
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	1,26E-05

a. No corregidos para los empates.

b. Variable de agrupación: IVC1IVR2CM3CT4-ADH

IVR vs CT	ADN
U de Mann-Whitney	12,000
W de Wilcoxon	132,000
Z	-4,169
Sig. asintót. (bilateral)	0,000
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	1,11E-06

a. No corregidos para los empates.

b. Variable de agrupación: IVC1IVR2CM3CT4-ADH

CM vs CT	ADN
U de Mann-Whitney	0,000
W de Wilcoxon	120,000
Z	-4,666
Sig. asintót. (bilateral)	0,000
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	5,66E-11

a. No corregidos para los empates.

b. Variable de agrupación: IVC1IVR2CM3CT4-ADH

3.3. Resultados del estudio de la citotoxicidad mediante el análisis morfológico

Con el objetivo de evaluar el efecto de los cementos de ionómero vítreo IVC e IVR, sobre la morfología de los fibroblastos gingivales humanos, las muestras fueron examinadas mediante la utilización de microscopía óptica y láser confocal a las 72 horas de exponer las células a los distintos biomateriales.

3.3.1. Microscopía Óptica.

La Figura 3 muestra en un análisis de campo la población de fibroblastos gingivales humanos control. Las células controles, no tratadas, se caracterizan por mostrar una morfología de fusiforme ortotípica. Cuando las células son sometidas a la acción de IVC se evidencian dos poblaciones celulares, una que mantiene las características de las células control, es decir, morfología fusiforme, y un segundo grupo celular, que se caracteriza por mostrar una morfología totalmente esférica (Figura 4). Por otra parte, cuando evaluamos la acción de IVR sobre los fibroblastos gingivales humanos, en el análisis de campo se observa que la única población celular presente se caracteriza por mostrar formas esféricas (Figura 5).

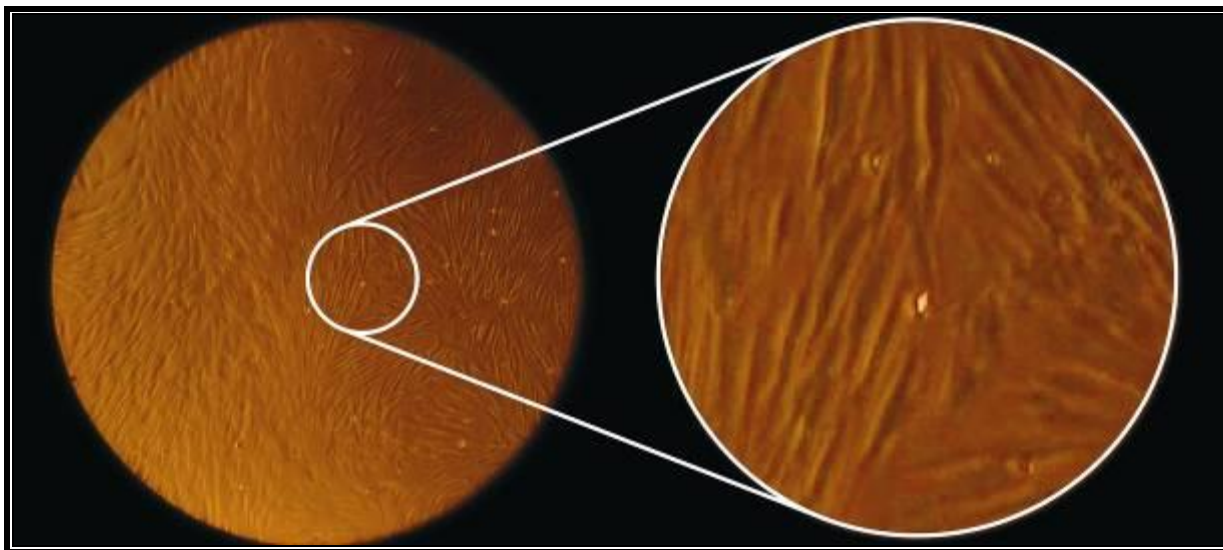


Figura 3. Control de fibroblastos gingivales humanos. Las células controles con morfología fusiforme ortotípica.

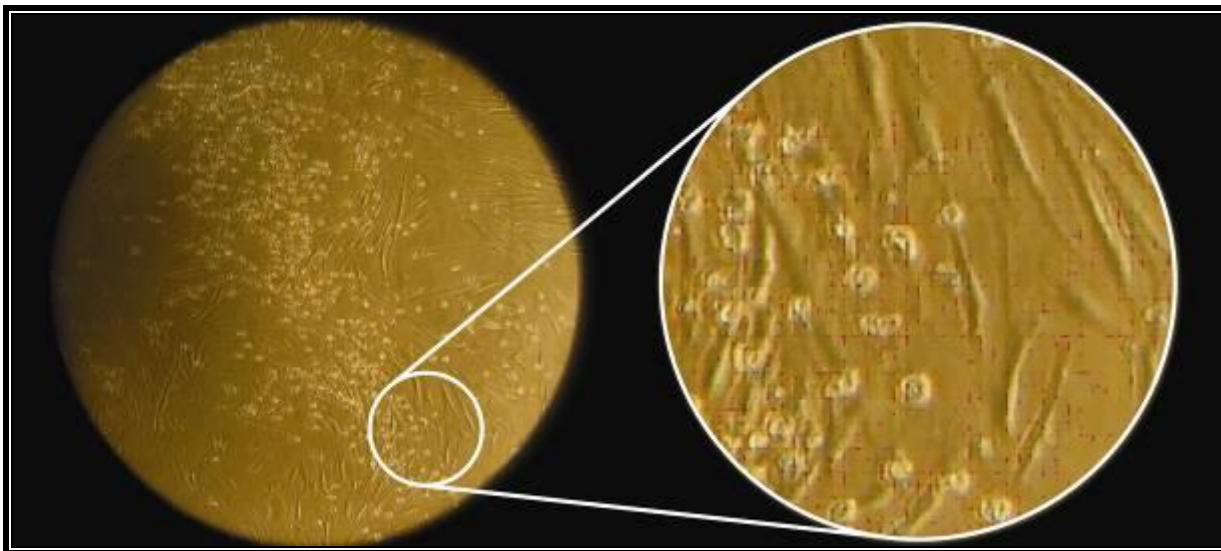


Figura 4. Fibroblastos gingivales humanos expuestos a IVC. Se observan 2 poblaciones celulares, una con morfología fusiforme ortotípica y otra con morfología esférica.

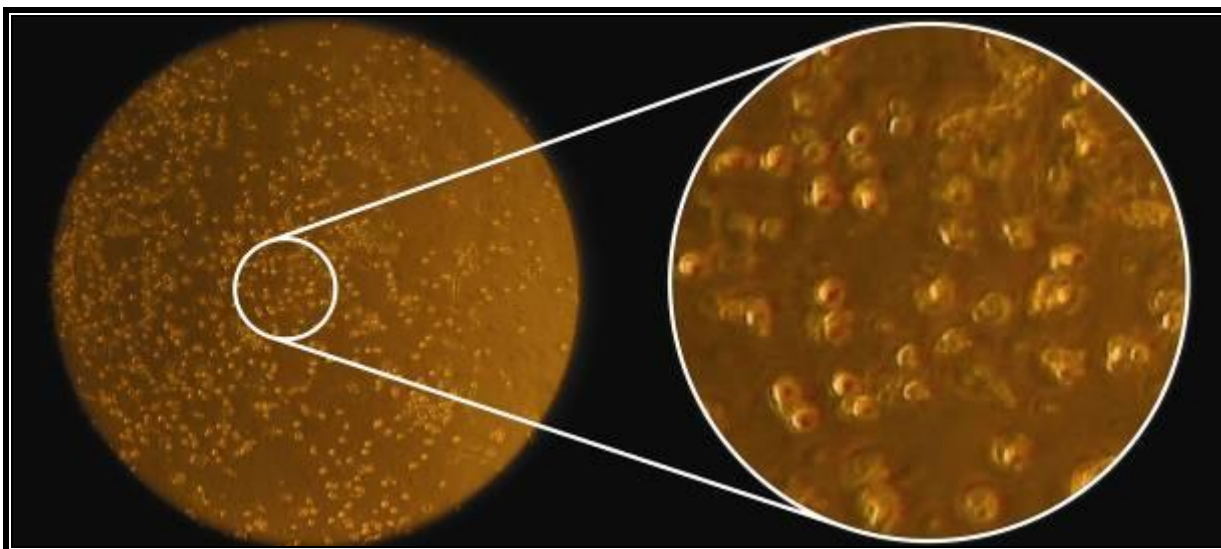


Figura 5. Fibroblastos gingivales humanos expuestos a IVR. Se observa una única población celular que se caracteriza por formas esféricas.

3.3.2. Microscopía Láser Confocal

Al evaluar las células controles con la microscopía láser confocal, se observa en la Figura 6 que las células presentan un núcleo que aparece como una estructura discoide o alargada que a veces contiene un nucléolo evidente. El citoplasma permite describir células con formas alargadas y en ocasiones ligeramente estrelladas (Figura 7, 8, 9). Por otra parte las células expuestas a IVC (Figura 10, 11, 12 y 13) muestran la presencia de dos tipos celulares, en ambos se observa la presencia de núcleos con forma discoide o alargados, mientras que a nivel citoplasmático un grupo se caracteriza por células con formas alargadas y en ocasiones ligeramente estrelladas, y otro grupo celular se caracteriza por presentar citoplasmas con formas esféricas. También se evidencian en algunas células, a nivel citoplasmático, la presencia de vacuolas y blebs de membrana. Cuando se valoran las células expuestas a IVR se observa que los cambios más representativos con respecto a las células control son a nivel citoplasmático donde se observan cambios en la forma que evidencian un marcado detrimento en el volumen del citoplasma celular, adquiriendo formas esféricas y a su vez una importante cantidad de vacuolas citoplasmáticas (Figura 14, 15, 16, 17).

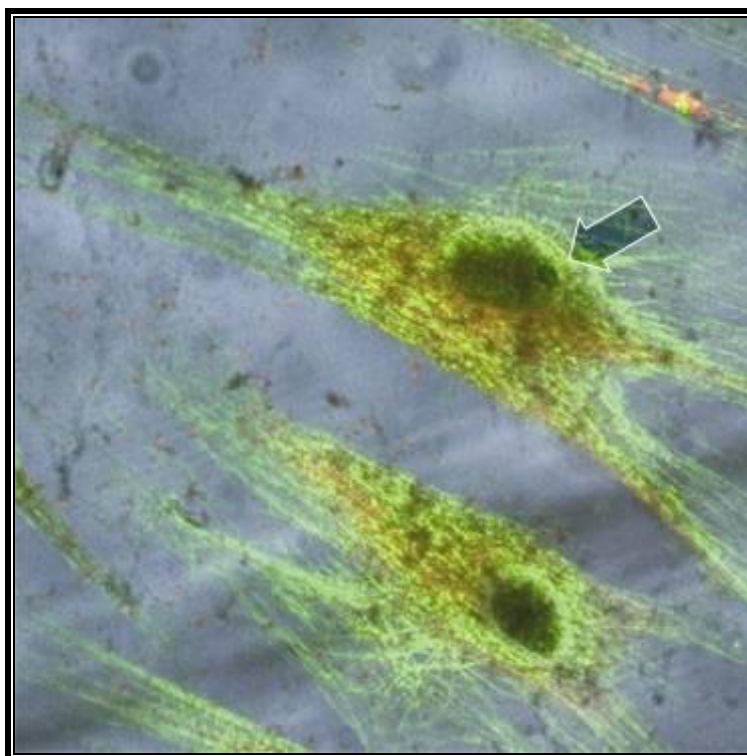
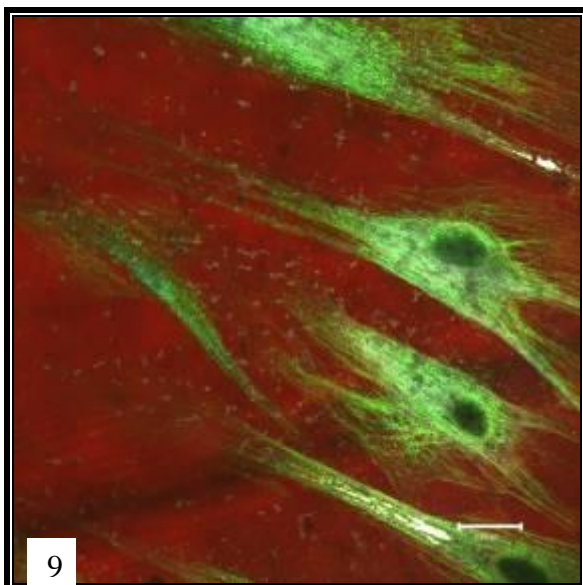
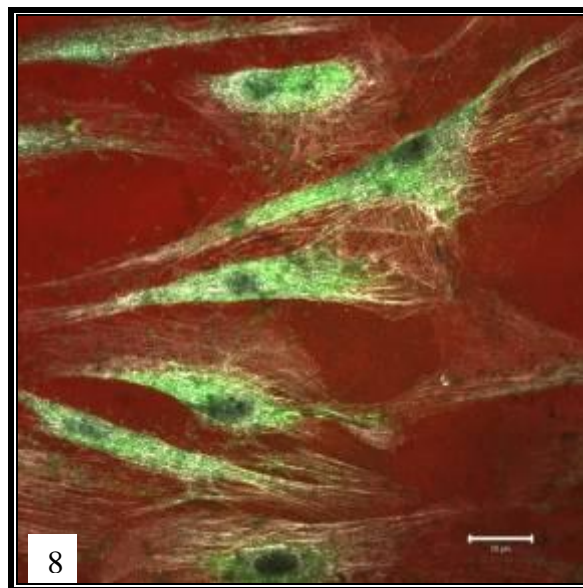
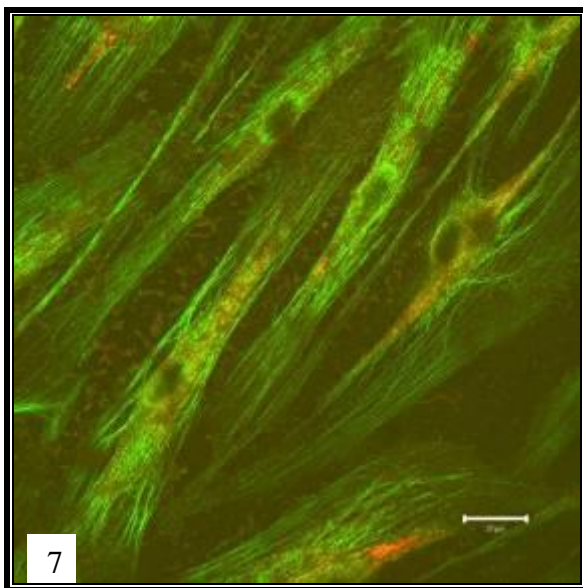


Figura 6. Célula fibroblástica de forma estrellada con el nucleolo evidente.



Figuras 7, 8, 9. Células fibroblásticas controles con su citoplasma en forma alargada, triangular y ligeramente estrelladas.

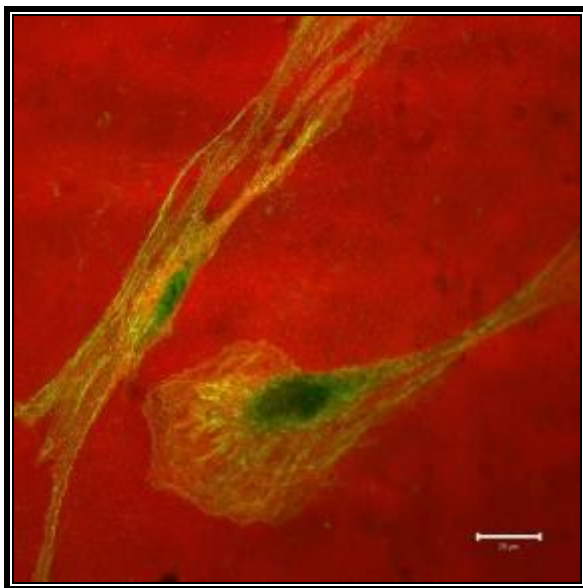


Figura 10. Fibroblastos gingivales humanos expuestos al IVC. Se observan 2 tipos celulares, una de forma estrellada y otra de forma esferoidal.

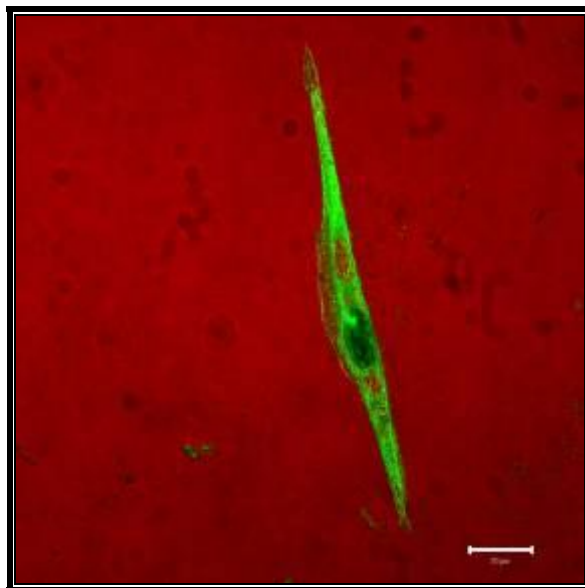


Figura 11. Fibroblasto gingival humano expuesto al IVC. Se observa una célula con vacuolas citoplasmáticas.

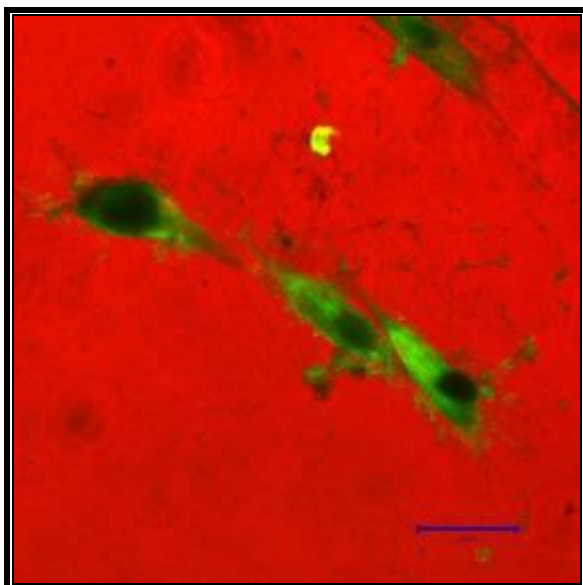


Figura 12. Fibroblastos gingivales humanos expuestos al IVC. Se observan células con forma ovoidal.

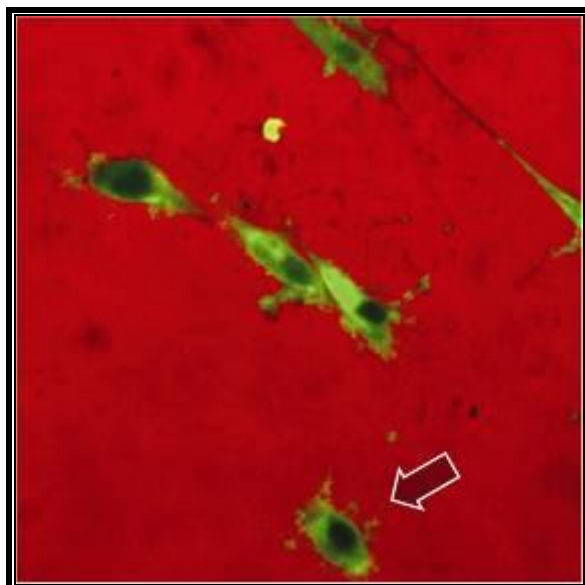


Figura 13. Fibroblastos gingivales humanos expuestos al IVC. Se observan células de forma esferoidal y con blebs en membranas plasmáticas.

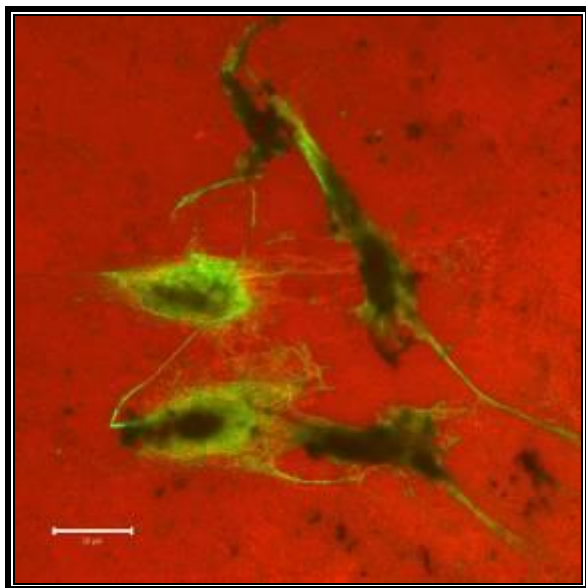


Figura 14. Fibroblastos gingivales humanos sometidos a IVR. Se observan células con formas esféricas.

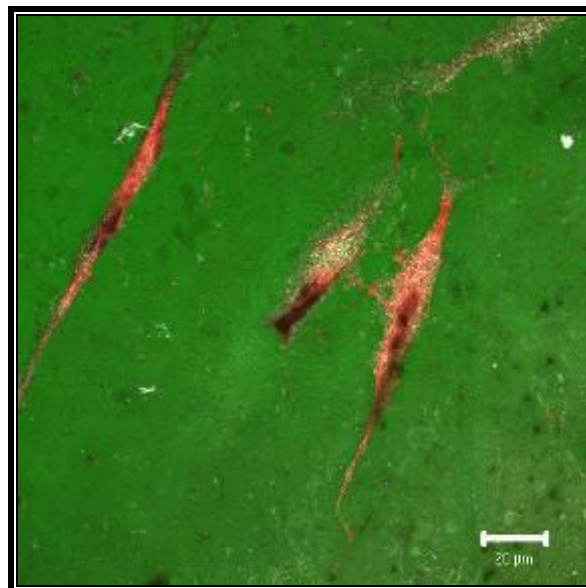


Figura 15. Fibroblastos gingivales humanos sometidos a IVR. Se observan células con desintegración del núcleo y ruptura del citoplasma celular.

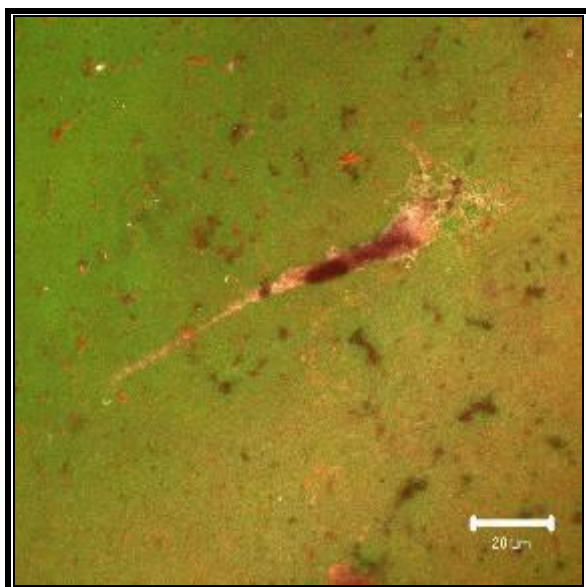


Figura 16. Fibroblastos gingivales humanos sometidos a IVR. Se observa célula con ruptura de la membrana plasmática.

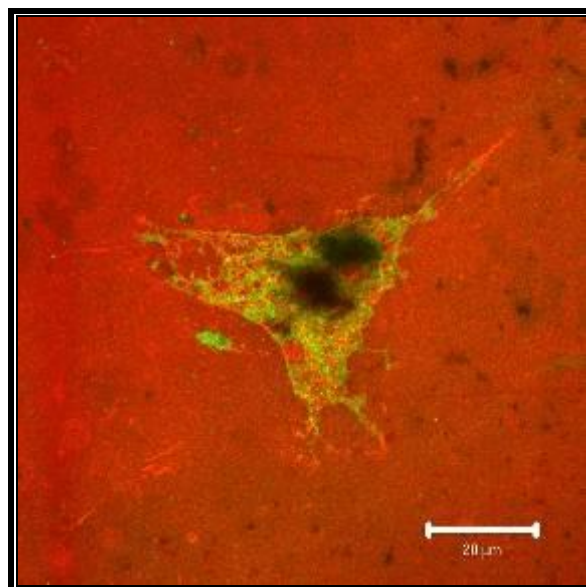


Figura 17. Fibroblastos gingivales humanos sometidos a IVR. Se observa célula con presencia de vacuolas citoplasmáticas y ruptura de la membrana.

3.4 Resultados del estudio de la citotoxicidad mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X

3.4.1 Análisis cualitativo

En las tablas 8 a 13 se expresan los análisis cualitativos de las 30 células expuestas a IVR.

En las tablas 14 a 19 aparecen los análisis cualitativos de las células expuestas a IVC (29 células), mientras que en las tablas 20 a 25 se muestra el análisis cualitativo de las células control (30 células).

3.4.2 Análisis cuantitativo

En las tablas 26 a 28 se expresan los valores del análisis cuantitativo de 30 células de cada grupo experimental. En la tabla 29 se muestran los valores medios de los elementos químicos analizados en los diferentes grupos de muestras.

En la gráfica 3 y 4 se expresa el perfil iónico de las muestras y su significación estadística con respecto al control.

Para la comparación de valores medios entre los diferentes grupos de muestras (IVR, IVC y Control) se utilizó la prueba de Kruskal Wallis. Para comparar dos grupos concretos se utilizó la prueba de Mann-Whitney. En las tablas 30 y 31 se especifican esos valores. Los valores estadísticamente significativos se señalan en color azul.

Tabla 8

VITREBOND (IVR)				
Nº DE CÉLULA	ELEMENTO	CPS	BACKGROUND	P/B
CÉLULA 1	Na	15,04	4,81	3,13
	Mg	10,77	4,91	2,19
	P	8,36	4,55	1,84
	S	4,96	4,22	1,17
	Cl	6,14	3,38	1,82
	K	1,72	1,7	1,01
	Ca	7,3	1,32	5,55
CÉLULA 2	Na	2,77	3,13	0,88
	Mg	4,42	3,41	1,3
	P	7,61	3,37	2,26
	S	2,63	2,64	0,99
	Cl	3,26	2,12	1,53
	K	7,71	1,25	6,17
	Ca	2,85	1,19	2,39
CÉLULA 3	Na	9,36	8,14	1,15
	Mg	11,47	8,89	1,29
	P	30,27	7,36	4,11
	S	4,18	5,83	0,72
	Cl	8,07	4,74	1,7
	K	22,57	3,34	6,77
	Ca	3,46	3,19	1,08
CÉLULA 4	Na	4,24	4,44	0,95
	Mg	7,03	5,27	1,33
	P	9,61	4,82	1,99
	S	4,16	3,97	1,05
	Cl	1,5	3,41	0,44
	K	0,19	2,32	0,08
	Ca	7,14	2,02	3,54
CÉLULA 5	Na	9,92	9,57	1,04
	Mg	10,12	10,05	1,01
	P	33,6	10,88	3,09
	S	1,77	8,27	0,21
	Cl	7,64	6,3	1,21
	K	25,69	3,85	6,68
	Ca	2,54	3,65	0,69

Tabla 9

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

Tabla 10

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

Tabla 11

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

Tabla 12

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

Tabla 13

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

Tabla 14

KETAC MOLAR (IVC)				
Nº DE CÉLULA	ELEMENTO	CPS	BACKGROUND	P/B
CÉLULA 1	Na	5,01	5,39	0,93
	Mg	16,7	5,76	2,9
	P	10,48	4,89	2,14
	S	9,24	4,02	2,3
	Cl	6,73	3,45	1,95
	K	12,85	2,58	4,98
	Ca	11,85	2,45	4,83
CÉLULA 2	Na	7,01	6,48	1,08
	Mg	24,74	6,84	3,61
	P	9,61	5,53	1,74
	S	11,06	4,42	2,5
	Cl	7,24	3,65	1,98
	K	12,42	2,53	4,91
	Ca	16,88	2,4	7,02
CÉLULA 3	Na	3,2	3,63	0,88
	Mg	5,76	4,3	1,34
	P	9,79	3,51	2,79
	S	5,52	2,79	1,98
	Cl	4,28	2,27	1,89
	K	10,1	1,68	5,99
	Ca	4,26	1,58	2,7
CÉLULA 4	Na	5,34	7,01	0,76
	Mg	13	7,36	1,77
	P	12,15	6,46	1,88
	S	9,73	5,13	1,9
	Cl	6,95	4,2	1,66
	K	14,76	2,84	5,2
	Ca	8,19	2,7	3,04
CÉLULA 5	Na	3,64	4,57	0,8
	Mg	6,45	5,26	1,22
	P	13,34	4,3	3,1
	S	6,01	3,59	1,68
	Cl	3,65	3,13	1,17
	K	12,56	2,46	5,1
	Ca	3,16	2,35	1,35

Tabla 15

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

Tabla 16

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

Tabla 17

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

Tabla 18

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

Tabla 19

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

Tabla 20

CONTROL MEDIO				
CM				
Nº DE CÉLULA	ELEMENTO	CPS	BACKGROUND	P/B
CÉLULA 1	Na	2,98	3,25	0,92
	Mg	6,07	3,25	1,87
	P	8,58	3,94	2,17
	S	3,36	3,18	1,06
	Cl	2,89	2,41	1,2
	K	9,76	1,49	6,57
	Ca	2,4	1,39	1,73
CÉLULA 2	Na	3,4	5,16	0,66
	Mg	5,57	5,76	0,97
	P	17,69	6,07	2,91
	S	4,15	4,96	0,84
	Cl	5,84	4,03	1,45
	K	18,1	2,92	6,2
	Ca	0,93	2,77	0,34
CÉLULA 3	Na	2,23	4,43	0,5
	Mg	2,3	4,64	0,5
	P	13,74	3,56	3,87
	S	2,99	2,78	1,08
	Cl	3,97	2,2	1,8
	K	13,35	1,42	9,36
	Ca	0,88	1,36	0,64
CÉLULA 4	Na	4,83	6,64	0,73
	Mg	16,93	6,94	2,44
	P	16,04	6,93	2,31
	S	7,7	5,44	1,42
	Cl	5,77	4,34	1,33
	K	14,96	2,81	5,33
	Ca	9,96	2,67	3,73
CÉLULA 5	Na	2,02	3,2	0,63
	Mg	1,75	3,47	0,5
	P	10,34	2,77	3,74
	S	3,4	2,21	1,54
	Cl	3,35	1,83	1,83
	K	10,51	1,27	8,24
	Ca	0,5	1,21	0,41

Tabla 21

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

Tabla 22

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

Tabla 23

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

Tabla 24

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

Tabla 25

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

Tabla 26

IVR	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]
CÉLULA 1	265,33323	115,80939	127,3188	63,7065	145,22326	51,78371
CÉLULA 2	74,59848	68,7453	156,3807	53,9055	122,08329	316,34207
CÉLULA 3	97,48665	68,21649	284,39145	39,204	135,6481	347,10467
CÉLULA 4	80,53245	70,33173	137,69805	57,1725	35,10892	4,10168
CÉLULA 5	88,16184	53,40981	213,81255	11,4345	96,54953	342,49028
CÉLULA 6	190,73475	26,96931	278,1639	18,513	118,89157	178,42308
CÉLULA 7	469,63134	38,07432	171,6036	5,445	188,31148	0
CÉLULA 8	125,46108	20,62359	243,5664	33,759	150,01084	224,56698
CÉLULA 9	296,6985	31,19979	255,32955	38,115	187,51355	75,36837
CÉLULA 10	105,96375	30,14217	257,4054	33,759	167,5653	299,42264
CÉLULA 11	46,62405	53,93862	100,33275	30,492	23,13997	19,48298
CÉLULA 12	340,77942	46,00647	195,82185	15,7905	171,55495	110,74536
CÉLULA 13	268,72407	26,96931	186,13455	21,78	118,09364	0
CÉLULA 14	351,79965	40,18956	240,7986	22,869	140,43568	0
CÉLULA 15	179,71452	25,38288	215,8884	17,424	110,91227	189,18999
CÉLULA 16	88,16184	17,97954	164,6841	21,2355	90,96402	266,6092
CÉLULA 17	107,65917	29,08455	237,33885	54,9945	132,45638	257,89313
CÉLULA 18	100,02978	22,73883	265,01685	36,4815	177,14046	327,10898
CÉLULA 19	334,84545	28,55574	233,8791	53,9055	292,84031	170,21972
CÉLULA 20	141,56757	34,90146	275,3961	44,1045	172,35288	327,62169
CÉLULA 21	277,20117	23,79645	162,60825	17,9685	134,85017	2,56355
CÉLULA 22	105,96375	30,14217	257,4054	33,759	167,5653	299,42264
CÉLULA 23	346,71339	35,95908	285,77535	74,052	248,15623	150,22403
CÉLULA 24	295,85079	33,31503	284,39145	62,6175	272,89206	170,73243
CÉLULA 25	66,12138	19,03716	182,6748	23,958	136,44603	307,626
CÉLULA 26	79,68474	24,85407	215,8884	25,5915	172,35288	332,74879
CÉLULA 27	92,40039	44,94885	330,06015	54,9945	205,86594	412,21884
CÉLULA 28	153,43551	18,50835	179,21505	20,691	172,35288	222,51614
CÉLULA 29	272,96262	86,72484	66,4272	77,8635	156,39428	0
CÉLULA 30	166,15116	30,14217	350,81865	53,361	150,01084	195,85522

Tabla 27

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

Tabla 28

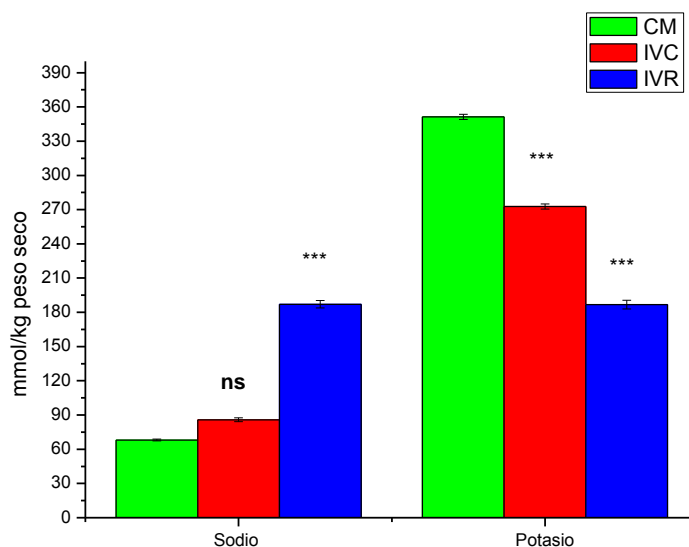
CM	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]
CÉLULA 1	77,98932	98,88747	150,15315	57,717	95,7516	336,85047
CÉLULA 2	55,94886	51,29457	201,35745	45,738	115,69985	317,8802
CÉLULA 3	42,3855	26,4405	267,78465	58,806	143,6274	479,89656
CÉLULA 4	61,88283	129,02964	159,84045	77,319	106,12469	273,27443
CÉLULA 5	53,40573	26,4405	258,7893	83,853	146,02119	422,47304
CÉLULA 6	58,49199	85,66722	264,3249	106,722	121,28536	328,64711
CÉLULA 7	53,40573	75,09102	220,73205	78,408	136,44603	338,3886
CÉLULA 8	52,55802	89,36889	287,8512	90,9315	153,20256	338,3886
CÉLULA 9	65,27367	62,92839	260,86515	90,387	161,18186	407,09174
CÉLULA 10	72,90306	104,17557	153,6129	64,251	111,7102	295,83367
CÉLULA 11	67,8168	46,00647	327,9843	94,743	197,88664	543,4726
CÉLULA 12	51,71031	87,25365	262,941	73,5075	144,42533	428,11285
CÉLULA 13	61,03512	53,93862	166,068	48,4605	112,50813	374,2783
CÉLULA 14	55,94886	31,7286	249,79395	86,031	122,88122	283,52863
CÉLULA 15	57,64428	44,94885	191,67015	26,6805	120,48743	430,6764
CÉLULA 16	48,31947	24,85407	249,102	11,4345	67,02612	313,26581
CÉLULA 17	52,55802	28,02693	204,12525	25,047	72,61163	488,61263
CÉLULA 18	53,40573	30,67098	303,76605	3,8115	47,8758	297,88451
CÉLULA 19	70,35993	24,32526	223,49985	0	72,61163	317,8802
CÉLULA 20	183,10536	77,73507	231,1113	82,764	136,44603	178,42308
CÉLULA 21	112,74543	36,48789	330,7521	45,1935	103,7309	270,19817
CÉLULA 22	88,16184	39,66075	300,3063	55,539	116,49978	270,71088
CÉLULA 23	61,88283	34,90146	383,3403	13,068	64,63233	305,57516
CÉLULA 24	85,61871	59,75553	337,6716	53,361	127,6688	356,33345
CÉLULA 25	57,64428	26,96931	226,9596	27,7695	110,91227	385,55792
CÉLULA 26	45,77634	26,4405	330,7521	16,8795	93,35781	412,21884
CÉLULA 27	75,44619	60,81315	250,4859	57,717	139,63775	418,37136
CÉLULA 28	101,7252	48,65052	366,04155	33,2145	126,07294	285,06676
CÉLULA 29	55,10115	31,19979	211,7367	13,068	89,36816	361,46055
CÉLULA 30	61,88283	26,96931	235,263	88,209	104,52883	275,32527

Tabla 29

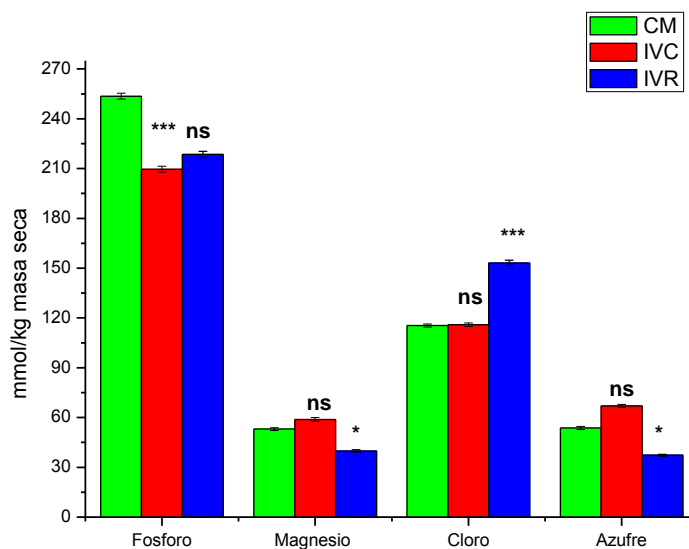
IVR	MEDIA	DESV ESTÁNDAR	ERROR ESTÁNDAR
[Na]	187,033083	113,1145003	3,23184287
[Mg]	39,889901	22,53101401	0,64374326
[P]	218,540875	66,08758537	1,88821672
[S]	37,29825	19,35729915	0,55306569
[Cl]	153,122767	57,28691704	1,63676906
[K]	186,746072	132,0652534	3,77329295

IVC	MEDIA	DESV ESTÁNDAR	ERROR ESTÁNDAR
[Na]	85,7940983	58,0305015	1,65801433
[Mg]	58,8620234	40,116211	1,14617746
[P]	209,63699	60,8304853	1,73801387
[S]	67,0110517	29,81068452	0,85173384
[Cl]	115,892454	39,93788835	1,14108252
[K]	272,726361	75,69253011	2,16264372

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



Gráfica 3. Efectos de IVC e IVR sobre el contenido iónico de Sodio y Potasio en fibroblastos gingivales humanos con respecto al control (CM). Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Los datos son expresados en mmol/kg de masa seca y son representados con +/- error estándar de la media ($ns=p>0,05$; $***p<0,001$).



Gráfica 4. Efectos de IVC e IVR sobre el contenido iónico de Fósforo, Magnesio, Cloro y Azufre en fibroblastos gingivales humanos con respecto al control (CM). Las muestras fueron analizadas mediante EPXMA bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Los datos son expresados en mmol/kg de masa seca y son representados con +/- error estándar de la media ($ns=p>0,05$; $***p<0,001$; $*=p<0,05$).

Tabla 30

IVC vs IVR vs CM vs CT	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]
Chi-cuadrado	37,536	8,023	4,670	16,393	14,260	25,475
Gl	2	2	2	2	2	2
Sig. asintót.	7,067E-09	0,018107311	0,096822917	0,000275574	0,00080071	2,93E-06

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: IVC1IVR2CM3

Tabla 31

IVC vs IVR	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]
U de Mann-Whitney	128,000	256,500	401,000	166,000	221,500	285,500
W de Wilcoxon	563,000	721,500	836,000	631,000	656,500	750,500
Z	-4,655	-2,708	-0,516	-4,079	-3,238	-2,267
Sig. asintót. (bilateral)	3,23669E-06	0,00677881	0,606167434	4,52328E-05	0,0012052	0,02338144
IVC vs CM	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]
U de Mann-Whitney	326,500	399,500	294,000	377,000	399,500	195,000
W de Wilcoxon	791,500	864,500	729,000	842,000	834,500	630,000
Z	-1,646	-0,538	-2,138	-0,879	-0,538	-3,639
Sig. asintót. (bilateral)	0,09976644	0,59033953	0,032524945	0,379166936	0,59033414	0,00027367
IVR vs CM	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]
U de Mann-Whitney	70,000	309,000	351,000	269,000	230,500	146,000
W de Wilcoxon	535,000	774,000	816,000	734,000	695,500	611,000
Z	-5,620	-2,085	-1,464	-2,676	-3,246	-4,495
Sig. asintót. (bilateral)	1,91093E-08	0,03703683	0,143265149	0,007444476	0,00117097	6,9439E-06

a. Variable de agrupación: KM1VT2CM3

4. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los cementos de ionómero de vidrio, tanto convencionales (IVC) como los modificados por resinas (IVR), son materiales muy utilizados en la clínica odontológica ya que tienen la propiedad de adherirse a las estructuras dentarias (Edelberg, 2001, 2003). Sin embargo, la lenta reacción de endurecimiento ácido-base y la sensibilidad a la humedad de los ionómeros convencionales, estimuló a los investigadores a mejorarlos, y así surgen los ionómeros vítreos modificados con resinas, que mejoran sus propiedades y logran un más rápido endurecimiento por reacción ácido-base y por polimerización. Los ionómeros vítreos modificados con resina tienen en su composición distintos monómeros hidrófilos e hidrófugos entre los que destaca el 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA), que parecería ser uno de los responsables de las distintas reacciones adversas a nivel de la biocompatibilidad pulpar.

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

Distintos autores en ensayos “in vivo” valoraron el comportamiento de los IVC y IVR, y observaron que en los primeros días de expuestos los distintos tejidos a los diferentes materiales evaluados se producía una reacción inflamatoria leve que se corrigió superado los 30 días de la experiencia (Tobias et al., 1978; Costa et al., 1996; Six et al., 2000). En este sentido Souza et al. (2006) fundamenta muy bien el comportamiento de estos materiales cuando valoró diferentes IVR (Rely X Luting cement, Vitremer y Vitrebond) sobre el tejido celular subcutáneo de ratas. Los autores justifican que el proceso inflamatorio inicial se debe a diferentes factores irritantes. En primer lugar destacan como responsable de dicha inflamación al trauma quirúrgico que supone la implantación de los ionómeros en el tejido celular subcutáneo. En segundo lugar que esta situación de inflamación se mantiene por la lenta reacción de endurecimiento ácido-base de los ionómeros utilizados, lo cuales generan un bajo pH en la zona. Y por último consideran al monómero resinoso HEMA como responsable de la respuesta inflamatoria a distancia del sitio de

implantación del material. En dicha investigación los autores destacan que la intensidad y el área de inflamación inicial disminuyen a los 90 días, y esto lo justifican en que el edema adyacente a los materiales neutraliza la toxicidad del bajo pH. Por otro lado, en el caso del monómero HEMA, al ser este de bajo peso molecular, puede ser removido fácilmente por el drenaje linfático existente en el tejido. Todo ello entonces permitiría obtener a los 90 días un tejido conectivo saludable. En consecuencia, Costa et al. (1996) afirman que estos materiales cuando son valorados en ensayos “in vivo” tienen una aceptable compatibilidad biológica, siendo irritantes discretos para el complejo dentinopulpar.

Costa et al. (2003) realizaron un ensayo “in vitro” para evaluar la citotoxicidad de 3 IVR (Vitrebond, Vitremer y Fuji II LC) y 2 IVC (Fuji IX GP y Ketac Molar) sobre células odontoblastoides (MDPC-23). Los autores demostraron que a las 72 horas de realizada la evaluación de la actividad mitocondrial con el método de MTT, todos los materiales fueron citotóxicos, aunque los IVC mostraron menos toxicidad. En este sentido, los autores acuerdan con Oliva et al (1996) que demostraron que los IVC son menos citotóxicos para las células osteoblásticas que los IVR.

Estos datos científicos son explicados por Soheili et al. (2003) al demostrar que la citotoxicidad de algunos ionómeros vítreos convencionales es atribuible a las pequeñas cantidades de aluminio y a otros iones metálicos presentes en su composición. Esto, explican los autores, causaría los efectos citotóxicos, en las células cultivadas, por stress oxidativo. Stanislawski et al. (1999) identificaron la liberación de iones flúor, aluminio y estroncio en baja concentración en los IVC. Además destacan que el zinc fue encontrado en alta concentración y por tanto lo consideran el responsable máximo de la citotoxicidad. Por otro lado, Chan y Chou (2001) mostraron que en un ambiente húmedo aumenta la presencia del flúor, el cual alteraría el metabolismo celular interfiriendo con la síntesis de ADN.

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

Vitrebond es extremadamente citotóxico y esto lo atribuye a los productos de descomposición del iniciador (DPICI).

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

Se ha descrito que los monómeros metacrílicos presentes en materiales basados en resinas como Vitrebond, Vitremer, y Z100 son incorporados, y solubilizados en la bicapa lipídica de la membrana celular (Fujisawa et al., 2003). Este fenómeno es causa de alteración celular y consecuentemente muerte celular y el responsable del alto efecto citotóxico demostrado por los materiales basados en resina cuando se compararon con Ionómeros Vítreos Convencionales. (Lan et al., 2003; Lonroth y Dahl, 2001).

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

resina, no se evidencia con claridad cual es el mecanismo de muerte celular inducida por estos materiales, es por ello que surge la necesidad de seguir con las investigaciones en este campo.

En este trabajo y con el objeto de evaluar la citotoxicidad de los ionómeros de vidrio hemos utilizado como modelo experimental los fibroblastos gingivales humanos extraídos mediante biopsia. Las líneas celulares que se han utilizado en estudios experimentales de citotoxicidad de sistemas adhesivos dentales han sido de distinta naturaleza y origen, destacando entre ellas a los fibroblastos de ratón 3T3 (Ratanasathien et al., 1995), las células odontoblastoides MDPC-23 (Costa et al., 1999), L929 (Kaga et al., 2001), células pulmonares A549 y L2 (Kehe et al., 2001), células de pulpa humana (Spagnuolo et al., 2004a, 2004b) y la línea celular monoblástica humana U937 (Cimpan et al., 2000; Rodríguez et al., 2008). En este trabajo se seleccionaron a los fibroblastos gingivales humanos porque constituyen un modelo experimental idóneo para evaluar citotoxicidad de distintos sistemas adhesivos dentales ya que permite, tal como lo ha demostrado Issa (2004) y López González (2006), realizar determinaciones morfológicas y bioquímicas con un importante grado de fiabilidad. Por otra parte, otras dos razones justifican el uso de los fibroblastos gingivales humanos. Por un lado la singularidad de dichas células, caracterizadas por su alta sensibilidad en la respuesta a fármacos y otras sustancias (Ferraris y Campos, 2009; Geurtsen et al., 1998; Lekic et al., 1997; Ratanasathien et al., 1995) y, por otro lado, por la posibilidad de comparar los ensayos bioquímicos de citotoxicidad efectuados en dicho modelo (Issa et al., 2004) con los datos microanalíticos que resultan de aplicar la metodología microscópica microanalítica cuantitativa desarrollada en el grupo de investigación en ingeniería tisular del departamento de Histología de Granada (Arrebola et al., 2005; 2006; Fernández Segura et al., 1997b;1999a; 1999b).

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

El primer indicador utilizado para evaluar la citotoxicidad de los ionómeros de vidrio en los fibroblastos gingivales humanos ha sido la liberación de LDH en el medio de cultivo. La lactato deshidrogenasa es una enzima citoplasmática estable que se almacena en células viables. Un aumento en los niveles de LDH en el medio

de cultivo indica que la estabilidad de las membranas se ha visto dañada posiblemente por alteraciones oxidativas (Thomas et al., 1993; Yildiz et al., 1999). Es importante señalar que, como ha demostrado Marc (1991), para un determinado tipo celular en unas determinadas condiciones de cultivo, los niveles de LDH son constantes. En el presente trabajo se observa que la liberación de LDH, cuando se evaluó IVR, fue significativamente mayor con respecto al control y a IVC. Cuando se valoró IVC, se observó que también se produce liberación de LDH que fue mayor y estadísticamente significativa con respecto al control. Estos resultados estarían indicando que IVR a las 72 horas sería el producto más tóxico para los fibroblastos gingivales humanos. Este comportamiento de mayor toxicidad se fundamentaría en la presencia del monómero HEMA en la composición de IVR. En este sentido, López González (2006) valoró la liberación de LDH al medio de cultivo cuando fibroblastos gingivales humanos eran sometidos a la acción de HEMA y demostró que existe una liberación progresiva de esta enzima que estaría vinculada significativamente al incremento en las concentraciones de HEMA. En relación a la liberación de LDH vinculada a la acción de IVC, los resultados del presente trabajo acordarían con Soheili et al. (2003) quien indica que pequeñas cantidades de partículas de aluminio y otros iones metálicos presentes en estos materiales serían los responsables de la citotoxicidad. Los resultados reflejan que los ensayos de LDH son, en general, un buen indicador de toxicidad celular.

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

El tercer indicador utilizado para evaluar la citotoxicidad de ionómeros de vidrio en los fibroblastos gingivales humanos ha sido el análisis morfológico mediante la utilización de la microscopía óptica y láser confocal. En nuestro estudio observamos que la población control se caracterizó por mostrar células que presentan un núcleo que aparece como una estructura discoide o alargada y que a veces contiene un nucléolo evidente. El citoplasma por su parte permite describir células con formas fusiformes y en ocasiones ligeramente estrelladas. Cuando las células fueron sometidas a la acción de IVC se observó dos poblaciones celulares, una que mantiene las características de las células control, es decir, formas fusiformes, y un segundo grupo celular, que se caracterizó por mostrar una morfología totalmente esférica y la presencia de vacuolas citoplasmáticas. Por otra parte, cuando se evaluó la acción de IVR se evidenció una única población celular que se caracterizó por células con formas esféricas y a su vez una importante cantidad de vacuolas citoplasmáticas.

Nuestras observaciones coinciden con Costa et al. (2003) quienes observaron con microscopía electrónica de barrido alteraciones que se caracterizaban por la presencia de células odontoblastoides con formas redondeadas y con ruptura de las membranas plasmáticas, cuando eran sometidas a la acción de IVR (Vitremmer, Vitrebond y Fuji II LC). Sin embargo, cuando analizaron IVC (Fuji IX y Ketac Molar) observaron un grupo de células de formas similares a las controles aunque con un menor número de células adheridas al soporte. Rodríguez (2005) mostró con microscopía electrónica de transmisión en células tratadas con el sistema adhesivo Single Bond (3M) que en el transcurso de 2 horas las células U937 mostraban un incremento rápido y notable de volumen, configurando una imagen esferoidal que finalmente desaparecía tras la desintegración de la membrana plasmática. Las mitocondrias comenzaban a mostrar desde las primeras fases, signos de tumefacción y progresivas dilataciones y ruptura de sus crestas. Asimismo se observaban dilataciones a nivel del retículo endoplásmico. La presencia de “blebs” era ocasional y poseían muy escaso volumen. Todo lo descrito, según el autor, permitía indicar la existencia de un mecanismo de muerte celular por necrosis oncocítica. El autor también valoró las alteraciones ultraestructurales de las células tratadas con HEMA mostrando un significativo desarrollo de los “blebs”, sin que se modifique el tamaño celular en relación con los controles. No existían alteraciones

significativas de las organelas celulares hasta la última fase del proceso de muerte celular. La fase final era semejante a la de Single Bond (3M). Todas las alteraciones evidenciadas permitieron mostrar la existencia de un mecanismo de muerte celular híbrido que el autor lo definió como un proceso de muerte celular de necrosis por oncoapoptosis. Las observaciones de Rodríguez (2005) se relacionarían con nuestra tesis al confirmar que la presencia de HEMA en los IVR sería el responsable de las mayores alteraciones morfológicas provocadas sobre los fibroblastos gingivales humanos utilizados en nuestros ensayos.

El cuarto indicador utilizado para evaluar la toxicidad de los cementos de ionómero de vidrio en fibroblastos gingivales humanos ha sido la microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X. Esta técnica permite el análisis cualitativo y cuantitativo del perfil iónico de una muestra biológica de forma simultánea a su observación. A este respecto, existe un amplio número de técnicas analíticas para estimar el contenido de los elementos inorgánicos en los especímenes biológicos como la espectrografía por absorción atómica y la fotometría de llama. Estas técnicas, además de requerir un número elevado de células, tan sólo consideran uno o dos cationes simultáneamente. Asimismo, el empleo de métodos electrofisiológicos o fluorimétricos mediante el uso de indicadores fluorescentes específicos para iones (Fura – 2, Fluo – 3, SBFI) a fin de evaluar las actividades de los diferentes iones, no proporciona información sobre la localización subcelular debido a su baja resolución microscópica. El microanálisis por energía dispersiva de rayos X permite sin embargo el análisis simultáneo de todos los cationes y aniones ($Z \leq 11$) presentes en el espécimen irradiado por el haz de electrones y requiere tan solo un número de células pequeño. En los últimos años el grupo de investigación de ingeniería tisular de Granada, desarrolló un procedimiento técnico para analizar células completas en cultivo, de crecimiento en monocapa y en suspensión, para microanálisis por energía dispersiva de rayos X mediante microscopía electrónica de barrido, con el objetivo de examinar el papel de los diferentes elementos (Na, Mg, P, S, Cl y K) en distintas condiciones experimentales (Fernández-Segura et al., 1997a; 1997b; 1999a; Salido et al., 2001). Este procedimiento consta básicamente de tres fases: 1) adaptación de las células sobre un soporte sólido, 2) eliminación del medio extracelular que puede interferir con el espectro de rayos X procedente de la célula y 3) criopreparación de los

especímenes. La principal ventaja de adaptar y/o cultivar las células directamente sobre un soporte sólido radica en la posibilidad de analizar las células tras diferentes condiciones experimentales, sin la intervención de procedimientos intermedios (tratamientos enzimáticos), que pueden ocasionar daños en la membrana celular causando alteraciones en su permeabilidad y originando cambios en la composición elemental de las mismas (Warley et al., 1994a). Los soportes utilizados, hasta el momento presente, han sido muy diversos – cubreobjetos de vidrio y plástico, discos de grafito y rejillas (Au, Ti) de microscopía electrónica recubiertas con películas plásticas (fomvar, pioloform)-, para favorecer la adhesión celular (von Euler et al., 1993; Warley et al., 1994b). Por otro lado, la eliminación del medio extracelular es fundamental para evitar que interfiera en el microanálisis de las células. Esta eliminación debe realizarse previamente al proceso de criopreparación mediante el lavado de las células con soluciones lavadoras, las cuales deben eliminar de una forma efectiva el medio de cultivo, no deben interferir con el análisis y no deben alterar la permeabilidad de la membrana plasmática o causar alteración y redistribución de la composición iónica intracelular (Warley et al., 1997; Zierold et al., 1988). Diferentes grupos de investigación han demostrado, que el agua destilada a 4°C constituye, desde el punto de vista morfológico y microanalítico, la solución lavadora más efectiva (Fernandez-Segura et al., 1997a; Roomans, 1991; Warley et al., 1994b) solución ésta que fue utilizada en esta Tesis Doctoral. La aplicación del microanálisis por energía dispersiva de rayos X requiere que el material biológico sea tratado de manera que se reduzca o se evite la pérdida y/o redistribución de los diferentes elementos iónicos. A este respecto, los métodos convencionales de preparación de muestras biológicas para microscopía electrónica y que tiene por base la utilización de fijadores químicos, la deshidratación, la inclusión en material plástico, la polimerización a temperaturas altas y el ultracorte, no constituyen un procedimiento adecuado para preservar la integridad del contenido de los elementos a analizar. Por el contrario, las técnicas de criopreparación constituyen, en la actualidad, los métodos ideales para el estudio de la composición elemental, y muy especialmente de los elementos difusibles, de células y tejidos, mediante técnicas microanalíticas (Fernandez Segura y Warley, 2008; Sanchez Quevedo et al., 2007; Alaminos et al., 2007; Fernandez Segura, 1999a; Warley, 1997; Warley y Skepper, 2000; Zierold et al., 1988). En nuestra opinión, las células aisladas y en cultivo, constituyen los especímenes biológicos mas adecuados para llevar a cabo los

procedimientos de criopreparación. Esta característica radica en el pequeño tamaño de las muestras, que permite un procesamiento con escaso número de artefactos analíticos debido sobre todo a la escasa aparición y grado de extensión de los cristales de hielo.

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

Para evaluar alteraciones en el transporte iónico tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, el microanálisis por energía dispersiva de rayos X ha pasado a ser una de las técnicas más utilizada hasta el momento (Hongpaisan y Roomans 1999; Roomans, 1999; 2002a; 2002b; Roomans y Von Euler 1996; Zhang y Roomans, 1998). Esta metodología ha comenzado también a utilizarse para evaluar más correctamente los procesos de muerte celular denominados por necrosis y por apoptosis a través de las alteraciones iónicas que acontecen en estos fenómenos. Fernandez Segura et al. (1999b) estudiaron el comportamiento iónico en la células apoptóticas y su alteración tras ser inducidas por la irradiación con luz ultravioleta. Estas células se caracterizan por mostrar un incremento en el contenido de Na y un descenso en el contenido de Cl y K. Asimismo Skepper et al., (1999) describe resultados microanalíticos similares en un modelo de apoptosis en macrófagos.

En este estudio cuando aplicamos la microscopía electrónica analítica se comprobó que a las 72 horas de expuestos los fibroblastos gingivales humanos a los

distintos ionómeros de vidrio utilizados se producen distintas alteraciones del perfil iónico.

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

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

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

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

A continuación pasaremos a discutir los resultados obtenidos cuando expusimos a los fibroblastos gingivales humanos a IVC.

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

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

5. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

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

2. La evaluación comparativa de ambos tipos de cementos de ionómero vítreo en relación con la evaluación de la citotoxicidad en fibroblastos gingivales humanos mediante la cuantificación enzimática de LDH libre, pone de relieve que la liberación de LDH al medio fue significativamente mayor cuando se utiliza el Ionómero Vítreo modificado con Resinas que cuando se utiliza el Ionómero Vítreo Convencional o se realiza el estudio control, lo que implica, que las células sufren una alteración significativa en la permeabilidad de la membrana plasmática cuando son tratadas con el primer tipo de ionómero.

3. La evaluación comparativa de ambos tipos de cementos de ionómero vítreo en relación con la evaluación de la citotoxicidad en fibroblastos gingivales humanos mediante la cuantificación de ADN libre, pone de relieve que la liberación de ADN al medio fue significativamente mayor cuando se utiliza el Ionómero Vítreo modificado con Resinas que cuando se utiliza el Ionómero Vítreo Convencional o se realiza el estudio control, lo que implica, que las células sufren una alteración significativa de la membrana nuclear cuando son tratadas con el primer tipo de ionómero.

4. La evaluación comparativa de ambos tipos de cementos de ionómero vítreo en relación con la evaluación de la citotoxicidad en fibroblastos gingivales humanos mediante la microscopía óptica y láser confocal, pone de relieve la existencia de tipos celulares esféricas, vacuolas citoplasmáticas y blebs de membrana, en las células tratadas con el Ionómero Vítreo modificado con Resinas en relación con la muestra control y el Ionómero Vítreo Convencional, lo que indica, la existencia de mayores alteraciones morfológicas y estructurales cuando las células son tratadas con el primer tipo de ionómero.

5. La evaluación comparativa de ambos tipos de cementos de ionómero vítreo en relación con la evaluación de la citotoxicidad en fibroblastos gingivales humanos mediante el estudio de microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de

rayos X pone de relieve, cuando se utiliza el Ionómero Vítreo modificado con Resinas, un patrón microanalítico de Na, Cl, K, Mg, P, y S, compatible con un mecanismo necrótico de muerte celular que difiere del patrón microanalítico existente cuando se utiliza el Ionómero Vítreo Convencional. Dicho patrón, con independencia de la disminución de los niveles de K y P no evidencia ningún mecanismo específico, ni necrótico ni apoptótico, de muerte celular.

6. La evaluación comparativa de ambos tipos de cementos de ionómero vítreo en relación con los patrones de citotoxicidad establecidos en el modelo experimental desarrollado en la presente tesis doctoral permite determinar que el Ionómero Vítreo modificado con Resinas se comporta con mayores índices de citotoxicidad que el Ionómero Vítreo Convencional, lo que podría relacionarse con el contenido de HEMA presente en su composición al ser compatibles los índices citotóxicos del Ionómero Vítreo modificado con Resinas con los postulados para la citotoxicidad del HEMA.

6. RESUMEN

RESUMEN

Son escasos los estudios que han evaluado la citotoxicidad de los cementos de ionómero vítreo. Es por eso que el objetivo a alcanzar en esta tesis doctoral fue analizar la citotoxicidad de dos tipos de cementos de ionómero vítreo–convencional (IVC) y modificado con resina (IVR)- utilizando criterios morfológicos, bioquímicos y microanalíticos. Se analizaron los efectos del ionómero vítreo convencional (IVC), Ketac –Molar Easymix (3M- ESPE, St Paul, MN, USA) y del ionómero vítreo modificado con resina (IVR), Vitrebond (3M- ESPE, St Paul, MN, USA), sobre un modelo in vitro de fibroblastos gingivales humanos a las 72 horas.

Los resultados obtenidos indican que al evaluar la permeabilidad de la membrana plasmática mediante la cuantificación de LDH libre, se pone en evidencia que la liberación de esta enzima al medio fue significativamente mayor en el IVR con respecto al control y al IVC. Al evaluar las alteraciones de la membrana nuclear mediante la cuantificación de ADN libre, se observó que la liberación de ADN al medio fue mayor en el IVR con respecto al control y al IVC. El análisis morfológico mediante la microscopía óptica y laser confocal mostró mayores alteraciones estructurales de las células en contacto con IVR que con IVC. El microanálisis cuantitativo pone de manifiesto que con IVR, hay alteraciones iónicas de Na, Cl, K, Mg, P y S que se correlacionan con un patrón microscópico de necrosis. Para IVC los datos microanalíticos en los niveles del K y P se correlacionan con un patrón microscópico que muestran algunas alteraciones estructurales en un grupo celular. La mayor toxicidad mostrada por IVR con respecto a IVC, en el modelo experimental desarrollado, se fundamentaría en la presencia del monómero HEMA en la composición de dicho biomaterial. Estos resultados nos advierten sobre algunas limitaciones biológicas en la utilización clínica de los cementos de ionómero vítreo.

Palabras claves:

Ionómeros vítreos, necrosis, microanálisis, fibroblastos gingivales humanos.

7. SUMMARY

SUMMARY

There are few studies that have evaluated the cytotoxicity of the glass cement ionomer. That is why the aim of this current project was to analyze the cytotoxicity of two types of cements of conventional glass ionomer (IVC) and resin modified (IVR) using morphological biochemical and microanalytical criteria. The effects of the conventional glass ionomer (IVC), Ketac-Molar Easymix (3M- ESPE, St. Paul, MN, USA) and the resin modified glass ionomer (IVR), Vitrebond (3M- ESPE, St. Paul, MN, USA), over a glass model of human gingival fibroblasts in 72 hours were analyzed.

The results demonstrate that when evaluating the permeability of the plasmatic membrane through the quantification of the free LDH, it was shown that the release of this enzyme to the environment was significantly higher in the IVR in respect to control and to IVC. When evaluating the modifications of the nuclear membrane through the quantification of the free ADN, it was shown that the release of the ADN to the environment was higher in the IVR in respect to control and to IVC. The morphological analysis through the microscopy optic and confocal laser showed higher structural changes of the cells in contact with IVR than with IVC. The quantitative microanalysis demonstrate that with IVR, there are ionic modifications of Na, Cl, K, Mg, P and S which are related to a necrosis microscopic pattern. To IVC the microanalytical information in the levels of K and P are related to a microscopic pattern that show some structural changes in a cell group. The higher toxicity shown by IVR in respect to IVC, in the current experimental model, would be based by the presence of the HEMA monomer in the composition of this biomaterial. These results warn us about some biological limitations in the clinical use of the glass ionomer cements.

Key words:

Glass ionomers, necrosis, microanalysis, human gingival fibroblasts.

8. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Alaminos M, Garzon I, Sanchez-Quevedo MC, Moreu G, Gonzalez-Andrades M, Fernandez-Montoya A, Campos A (2007) Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Med* 1(5):350-359.
- Arrebola F, Cañizares J, Cubero MA, Crespo PV, Warley A, Fernández Segura E (2005) Biphasic behavior of changes in elemental composition during staurosporine – induced apoptosis. *Apoptosis* 10:1317–1331.
- Arrebola F, Fernández Segura E, Campos A, Crespo PV, Skepper JN, Warley A (2006) Changes in intracellular electrolyte concentrations during apoptosis induced by UV irradiation of human myeloblastic (U937) cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:638– 649.
- Avery J (1994) *Oral Development and Histology*. 2nd Edition. Thieme Medical publishers Inc. New York.
- Becher R, Kopperud HM, Al RH, Samuelsen JT, Morisbak E, Dahlmen HJ, Lilleaas EM, Dahl JE (2006) Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts. *Dental Materials* 22:630-640.
- Blottiere HM, Daculsi G, Anegón 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 phosphates. *Biomaterials* 16:497–503.
- Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Cincchi B, Holz J (1996) In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. *J Endod* 22(5):244–288.
- Boekestein A, Stols ALH, Stadhouders (1980) Quantitative in X-ray microanalysis of biological bulk specimens. *Scanning Electron Microscopy 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.
- Campos A, López–Escámez JA, Cañizares FJ, Crespo PV (1992) Electron probe X–ray microanalysis of Ca and K distributions in the otolith membrane. *Micron and Microscopia Acta* 23:349–350.
- Campos A, López–Escámez JA, Cañizares FJ, Crespo PV, Baeyens JM (1994) Gentamicin ototoxicity in otoconia: quantitative electron probe x – ray microanalysis. *Acta Otolaryngol (stockh)* 114:18–23.
- Carda C, Peydro A (2006) Ultrastructural Patterns of Human Dentinal Tubules, Odontoblast Processes and Nerves Fibres. *Tissues and Cell* 435:1-10.
- 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.

-
- 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.
 - 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.
 - Costa CAS, Benatti Neto C, Vargas PA, Villalba H, Hebling J (1996) Compatibilidade biológica do ionómero de vidro fotopolimerizável (Vitremer). Avaliação histológica dos seus efeitos sobre dentina e tecido pulpa rem dentes de rato. *Rev. Odontol. Univ Sao Paulo* 10(4):257-63.
 - Costa CA (1997) Compatibilidad Dentino-Pulpar de los Sistemas Adhesivos. *Odontología Clínica a Fines del Milenio. Jornadas Aniversario de la Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba. Editorial Kent-von Düring. Capítulo 28:221-228.*
 - 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 CA, Hebling J, Souza PP (1999) Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on inmortalized odontoblast cell line MDPC – 23. *Dent Mat* 15:434–441.
 - Costa CA (2000) Pulp response to direct capping with an adhesive system. *Am J Dent* 13:81-87.
 - Costa CA, Hebling J, García-Godoy F, Hanks CT (2003) In Vitro citotoxicity of five glass-ionomer cements. *Biomaterials* (21):3853-3858.
 - Costa CAS, Hebling J (2003) Biología del Complejo Dentino-Pulpar en relación a su protección mediante Adhesivos. *Adhesión En Odontología Restauradora. Editora MAIO Curitiba, Paraná Brasil. Primera Edición. Editor Gilberto Henostroza H. 162-193.*
 - Craig RG (1997) *Restorative dental materials. St. Louis: Mosby, Year Book Inc., 146–152.*
 - Crespo PV, López Escámez JA, Cañizares FJ, Campos A (1993) X-ray microanalytical determination of P, S and K concentration in the gelatinous membrane of the utricle. *Acta otolaryngol* 113:176–180.
 - Chang YC, Chou MY (2001) Cytotoxicity of fluoride on human pulp cell cultures in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 91:230-234.

-
- Edelberg M (2001) Adhesión de Ionómeros Vítreos y Compómeros. *Odontología Clínica a Fines del Milenio*. Córdoba. Argentina. Ed. Kent-von Düring 1997:217-224
 - Edelberg M (2003) Adhesión con Ionómeros Vítreos. *Adhesión en Odontología Restauradora*. Editora MAIO Curitiba, Paraná Brasil Primera Edición. Editor Gilberto Henostroza H 139-162.
 - Erickson RL (1992) Surface interactions of dentin adhesive materials. *Oper Dent* 5:81–94.
 - Fernández-Segura E, Warley A (2008) Electron probe X-ray microanalysis for the study of cell physiology. *Methods Cell Biol* 88:19-43
 - Fernandez-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Revelles F, Campos A (1997a) Electron probe x-ray microanalysis of cultured epithelial tumour cells with scanning electron microscopy. *Cell Biol Int* 21:665–669.
 - 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 (1999a) A procedure to prepare cultured cells in suspension for electron probe X-ray microanalysis: application to scanning and transmission electron microscope. *Exp Cell Res* 253:454–462.
 - Fernandez-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Warley A, Campos A (1999b) Changes in elemental content during apoptotic cell death studied by electron Probe X-ray microanalysis. *Exp Cell Res* 253:454–462.
 - Ferraris ME, Campos A (2009) *Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental*. 3era ed, Editorial Medica Panamericana, México.
 - Fitzgerald M (1979) Cellular mechanisms of dentinal bridge repair using 3H-Thymidine. *J Dent Res* 58:2198-2206.
 - Fujisawa S, Kadoma Y , Kadoma Y.(2003) H and C NMR studies of the interation of eugenol phenol and triethyleneglycol dimethacrylate with phospholipid liposome as a model system for odontoblast membrane. *J Dent Res* 67:1438-1441.
 - Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G (1998) Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res* 41:474–480.
 - Gisbert Calabuig JA (1998) *Medicina legal y toxicología*. Masson S.A, Barcelona.
 - 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.
 - Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG (1991) Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res* 70:1450-1455.
 - Hebling J, Giro EM, Costa CA (1999) Biocompatibility of an adhesive system applied on exposed human pulp. *J Endod* 25:676–682.
 - Hongpaisan J, Roomans GM (1999) Retaining ionic concentrations during in vitro storage of tissue for microanalytical studies. *J Microsc* 193:257–267.

-
- Issa Y, Watts DC, Brunton PA, Waters CM, Duxbury AJ (2004) Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblast in vitro. *Dental Materials* 20:12–20.
 - 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.
 - 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.
 - Lan WH, Lan WC, Wang TM, Lee YL, Tseng WY, Lin CP, Jeng JH, Chang MC (2003) Cytotoxicity of conventional and modified glass ionomer cements. *Oper Dent* 28(3):251-259.
 - Lekic PC, Pender N, Mc Culloch CAG (1997) Is Fibroblast heterogeneity relevant to health, diseases and treatments of periodontal tissues. *Crit Rev Oral Biol Med* 8(3): 253–268.
 - Leyhausen G; Abtahi M, Karbakhsch M, Sapotnick A, Geurtsen W (1998) The biocompatibility of various resins-modified and one conventional glass-ionomer cement. *Biomaterials* 19:559-64.
 - Lonroth EC, Dahl JE (2001) Cytotoxicity of dental glass ionomers evaluated using dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral reds tests. *Acta Odontol Scand* 59(1):34-39.
 - López Escámez JA, Cañizares FJ, Crespo PV, Campos A (1992) Electron probe microanalysis of the otolithic membrane. A methodological and quantitative study. *Scanning Microsc* 6:765–772.
 - López Escámez JA, Cañizares FJ, Crespo PV, Campos A (1993) Standards for quantification of element in the otolithic membrane by electron probe X-ray microanalysis: calibration curves and electron beam sensitivity. *J Microsc* 171:215–222.
 - López Escámez JA, Campos A (1994) Standards for X-ray microanalysis of calcified structures. *Scanning Microsc* 8:171–185.
 - López González G (2006) Evaluación biológica de la toxicidad por 2-Hidroxietilmetacrilato (HEMA) en fibroblastos gingivales humanos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
 - 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.
 - Marc A, Wanger A, Martial A, Goergen JL, Engasser JM, Geaugey Y, Pinton H (1991) Potential pitfalls of using LDH release for the evaluation of animal cell death kinetics. In: Spier RE, Griffiths JB, Meigner B, editors. *Productions of biologicals from animal cells in culture*. London: Butterworth – Heinemann; 569–574.

-
- Melo de Mendonça, Chaves Souza P, Hebling J, Souza Costa CA (2007) Cytotoxic effects of hard-setting cements applied on the odontoblast cell line MDPC-23. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 104:102-108.
 - Mondelli J et al. (1979). *Dentística Operatoria*. São Paulo, Servier, 67-88.
 - Mount GJ, Bryant RW (1999) Materiales de Ionómeros de Vidrio. En: Mount GJ y Hume WR *Conservación y Restauración de la Estructura Dental*. Editora Harcourt Brace de España. Madrid, España 1ª Edición 8:69-90.
 - Oilo G (1991) Luting cements: a review and comparison. *In Dent J* 41(2):81-88.
 - Oliva A, Ragione D, Salerno A, Riccio V, Tartaro G, Gozzolino A (1996) Biocompatibility studies on glass ionomer cements by primary cultures of human osteoblasts. *Biomaterials* 17:1351-1356.
 - Palmer G, Anstice HM, Pearson GJ (1999) The effect of curing regime on the release of hydroxyethyl methacrylate (HEMA) from resin-modified glass-ionomer cements. *J Dent* 27:303–311.
 - Pashley DH (1992) The effects of acid etching on the pulp-dentin complex. *Oper Dent* 20-18.
 - Pashley DH (1984) Smear Layer physiological considerations. *Operative Dentistry Supplement* 3:13-29.
 - Pashley DH (1996) Dynamics of the pulp-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med* 7 104-33.
 - Pashley DH (1997) The influence of dentin permeability and pulp blood flow on pulpar solute concentrations. *J Endod* 5:355-361.
 - Priotto EG, Uribe Echevarría J, Uribe Echevarría D (1995) Morphological and numerical characteristics of dentine tubule destined to adhesion. *J Dent Res* 74(3):734-738.
 - Reeves WB, Shah S (1994) Activation of potassium channels contributes to hypoxic injury in proximal tubules. *J Clin Invest* 94:2289-2294.
 - Roomans GM (1988) Quantitative X-ray microanálisis of biological specimens. *J Electron Microscop Tech* 9:19-43.
 - Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB (1995) Citotoxic interactive effects of dentin bonding components in mouse fibroblast. *J Dent Res* 74:1602–1606.
 - 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 cells in culture. *Methods Mol Biol* 188:273–289.
 - Rodriguez IA (2005) Efecto Citotóxico de los Sistemas Adhesivos Dentales. Estudio Microscópico y Microanalítico. Tesis Doctoral.
 - Rodriguez IA, Fernandez-Segura E, Ceballos G, Arrebola F, Sanchez-Quevedo MC, Campos A (2008) Hybrid cell death induced by exposure to 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA) an ultrastructural and X-ray microanalytical study. *J Adhes Dent* 10(2):105-111.
 - 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.
 - Sanchez-Quevedo MC, Alaminos M, Capitan LM, Moreu G, Garzon I, Crespo PV, Campos A (2007) Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. *Histol Histopathol* 22(6):631-640.
 - Sanchez-Quevedo MC, Crespo PV, García JM, Campos A (1989) X-ray microanalytical histochemistry of human circumpulpar and mantle dentine. *Bone Miner* 6(3):323-329.
 - 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.
 - Six N, Lasfargues JJ, Goldberg M (2000) In vivo study of the pulp reaction to Fuji IX, a glass ionomer cement. *J Dent* 28(6):413-422.
 - 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.
 - Souza PC, Aranha AMF, Hebling J, Giro EMA, Souza Costa CA (2006) In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements. *Dental Materials* 22:838-844.
 - Soheili ME, Golberg M, Stanislawski L (2003) In vitro effects of ascorbate and Trolox on the biocompatibility of dental restorative materials. *Biomater* 24:3-9.
 - 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.
-

-
- Stanislawski L, Daniau X, Lauti A, Goldberg M.(1999) Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements. *J Biomed Mater Res* 48(3):277-288.
 - Statham PJ, Pawley JB (1978) A new method of particle X-ray microanalysis on peak to background measurements. *Scanning Electron Microsc I*:469-478.
 - Studervant C (1996) *Operatoria Dental. Arte y Ciencia. Tercera Edición. España. Editorial Mosby. Capítulo 2.18-28.*
 - Szab 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* 95:6169-6174.
 - Ten Cate AR (1986) *El Complejo Pulpodentinario. Editorial Medica Panamericana, Buenos Aires, Argentina.191-235.*
 - Thomas JP, Geiger PG, Girotti AW (1993) Lethal damage to endothelial cells by oxidized low density lipoprotein: role of selenoperoxidases in cytoprotection against lipid peroxide – and iron – mediated reactions. *J lipid Res* 34:434-439.
 - Tobías J (1978) Pulpal response to a glass ionomer cement. *Br Dent J* 144:345-50.
 - Uribe Echevarría J (1990) *Operatoria Dental Ciencia y Práctica. Ediciones Avances Médico-Dentales. Madrid, España.*
 - Uribe Echevarría J, Uribe Echevarría D, Priotto EG (1995) Microanálisis por dispersión de energía Edax del balance fósforo-calcio de la dentina con smear layer. *Actas de la XVIII Reunión Anual de la División Argentina. I.A.D.R. 8.*
 - Uribe Echevarría J (1999) The influence of cavity configuration resin layer thickness and dentin treatment on resin adaptation. *J. Dent Res* 78:477.
 - Uribe Echevarria J (2002) Adhesión Dentinaria: Posibilidades y Limitaciones Clínicas. *Estética y Operatoria Dental 2002. Resúmenes de cursos y conferencias del 9 Congreso de la Asociación Latinoamericana de Operatoria Dental y Biomateriales. Lima Perú:35-38.*
 - Uribe Echevarría J, Priotto EG, Spadiliero de Lutri M (2003) Adhesión a Esmalte y Dentina con Adhesivos Poliméricos en Adhesión En Odontología Restauradora. Editora MAIO Curitiba, Paraná Brasil Primera Edición. Editor Gilberto Henostroza H. 71-111.
 - Uribe Echevarría J, Uribe Echevarría L, Uribe Echevarría DI, Priotto EG (1997) Dentin action and penetration of dentin conditioners. *Divisional Abstracts: Journal of Dental Research* 76(5):918.
 - 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.

-
- Warley A (1994) The preparation of cultured cells for X-ray microanalysis. *Scanning Microsc* VIII:129–138.
 - Warley A, Cracknell KPB, Cammish HB, Twort CHC, Ward JPT, Hirst SJ (1994a) Preparation of cultured airway smooth muscle for study of intracellular element concentration by X-ray microanalysis: comparison of whole cells with cryosections. *J Microsc* 175:143–153.
 - Warley A, Fernández–Segura E, López–Escámez J, Campos A (1994b) Changes in elemental concentrations in k562 target cells after conjugation with human lymphocytes studied by X – ray microanalysis. *Cell Biol Int* 18:915–916.
 - 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* 198:116–123.
 - Wataha JC, Hanks CT, Sunz Z (1996) “In vitro” models of biocompatibility. A review *Dent Mater* 12:186-93.
 - 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.
 - Yildiz D, Llu YS, Ercal N, Armstrong DW (1999) Comparison of pure nicotine – and smokeless tobacco extract–induced toxicities and oxidative stress. *Arch Environ Contam Toxicol* 37:434–439.
 - Zierold K, Schafer D (1988) Preparation of cultured and isolated cells for X-ray microanalysis. *Scanning Microsc* 2:1775–1790.
 - Zhang W, Roomans GM (1998) Volume-induced chloride transport in HT29 cells studied by X-ray microanalysis. *Microsc Res Tech* 40:72–78.