



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Estudio *In Vitro* de la Citotoxicidad
de Seis Adhesivos de Prótesis
sobre Fibroblastos Humanos**

D^a María Andrea García Guirao

2020



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y Medicina

Física

ESTUDIO IN VITRO DE LA CITOTOXICIDAD DE SEIS ADHESIVOS DE PRÓTESIS SOBRE FIBROBLASTOS HUMANOS

DIRECTORES

JULIA GUERRERO GIRONÉS

MIGUEL RAMÓN PECCI LLORET

Dña. María Andrea García Guirao

2020

ESTUDIO IN VITRO DE LA CITOTOXICIDAD DE SEIS ADHESIVOS DE PRÓTESIS SOBRE FIBROBLASTOS HUMANOS

Memoria presentada por

María Andrea García Guirao

para optar al grado de Doctor

por la Universidad de Murcia

Directores:

Julia Guerrero Gironés

Miguel Ramón Pecci Lloret

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

A la Universidad de Murcia por haberme aceptado ser parte de ella y abierto las puertas de su seno científico para poder estudiar mi licenciatura, así como también a los diferentes docentes que brindaron sus conocimientos y su apoyo para seguir adelante día a día.

A mi tutor Francisco Javier Rodríguez Lozano, por adentrarme en este nuevo mundo de la investigación y por brindarme la oportunidad de trabajar en esta estimulante línea de investigación.

A mis directores Julia Guerrero Gironés y Miguel Ramón Pecci Lloret, por hacer que me empape de su conocimiento y su buen hacer, por ser un ejemplo como personas, como investigadores y como cuñados.

A Sergio López y David García, por su inestimable contribución al desarrollo de este trabajo durante la experimentación y por su asesoramiento, actualización en las nuevas técnicas de la biología celular y molecular y por su paciencia al transmitirme sus conocimientos.

A mi padre, que esté donde esté, seguro estará orgulloso de mi, una vez me dijo: “No te preocupes por el dinero, intentaré darte todo lo que necesites, solo quiero que seas constante y la base de tu constancia te llevará tarde o temprano a tu éxito personal y profesional” y aquí estoy dando otro paso más en mi carrera.

A mi madre por estar siempre a mi lado, con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo que me ha ayudado a salir adelante en los momentos más difíciles. A mis hermanos, que siempre me han brindado su apoyo en todo lo que he decidido hacer.

A José Luis, mi marido, por ser un ejemplo de generosidad y responsabilidad y por sentirse orgulloso de lo que soy.

Y por último y no menos importarte, agradezco a mis hijas, Andrea y Julia, su paciencia para aguantar mi ausencia durante el desarrollo de este trabajo.

FINANCIACIÓN

Este trabajo ha sido financiado por la Red Española de Terapia Celular (TerCel) otorgada por el instituto de Salud Carlos III (ISCiii) (TETICS RD07/0010/2012 y RD12/0019/0001) y el Programa Conjunto para la Investigación Biomédica en Terapias Avanzadas y Medicina Regenerativa del ISCiii y el FFIS (Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia).

ÍNDICE

ÍNDICE

Resumen.....	1
Summary.....	3
Abreviaturas.....	5
Listados de figuras y tablas.....	7
1-INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Contexto sociodemográfico.....	11
1.2 El paciente edéntulo.....	12
1.3 Rehabilitaciones protésicas removibles.....	13
1.4 Adhesivos de prótesis: tipos y composición.....	22
1.5 Satisfacción de paciente con el uso de adhesivos de prótesis.....	28
1.6 Indicaciones y contraindicaciones de los adhesivos de prótesis.....	30
1.7 Fibroblastos gingivales humanos.....	34
1.8 Pruebas de citotoxicidad de los materiales dentales.....	35
2- JUSTIFICACIÓN.....	38
3-OBJETIVOS.....	40
4-MATERIAL Y MÉTODOS.....	42
4.1- Materiales.....	43
4.2- Aislamiento y cultivo celular.....	44
4.3- Recuento celular.....	47
4.4- Cultivo de células.....	49
4.5- Ensayos experimentales.....	50
4.5.1- Análisis del pH.....	50
4.5.2- Estudio de viabilidad celular (MTT).....	50
4.5.3- Análisis de la morfología celular.....	51
4.5.4- Evaluación de la apoptosis/necrosis celular.....	52

4.5.5 Evaluación de la producción de especies reactivas del oxígeno.....	52
4.6. Análisis estadístico.....	53
5-RESULTADOS.....	54
5.1- Análisis del pH.....	55
5.2- Estudio de viabilidad celular (MTT).....	56
5.3- Análisis de la morfología celular.....	58
5.4- Evaluación de la apoptosis/necrosis celular.....	58
5.5 Evaluación de la producción de especies reactivas del oxígeno.....	60
6-DISCUSIÓN.....	61
6.1 Sobre la metodología.....	62
6.2 Sobre el linaje celular.....	65
6.3 Sobre el análisis del pH.....	66
6.4 Sobre la viabilidad celular.....	66
6.5 Sobre el análisis morfológico.....	68
6.6 Sobre la apoptosis celular.....	69
6.7 Sobre la formación de ROS.....	69
6.8 Limitaciones del estudio.....	70
7-CONCLUSIONES.....	72
8-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
9-ANEXOS.....	85



RESUMEN



RESUMEN

Objetivo: Comparar la citotoxicidad de seis adhesivos para dentaduras postizas disponibles comercialmente sobre células gingivales humanas: Corega Sin Sabor, Kukident Pro Protección Dual, Novafix Sin Sabor, FiftyDent, Corega, Acción Total y Kukident Protección Dual.

Material y métodos: los eluatos de adhesivos para dentaduras postizas se pusieron en contacto con células gingivales humanas. La toxicidad celular se evaluó para determinar la viabilidad celular (ensayo MTT), la morfología celular (ensayo de inmunofluorescencia), apoptosis / necrosis y especies reactivas de oxígeno (ensayo de citometría de flujo). Además, se determinó el pH de cada muestra. Los datos se realizaron mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y una prueba de Tukey. Se consideró la significación cuando $p \leq 0.05$.

Resultados: Todos los adhesivos para dentaduras probados llevaron a una reducción del pH, especialmente Kukident Pro Protección Dual y Kukident Protección Dual (***) $p < 0,001$). El ensayo de viabilidad celular mostró que Kukident Pro Protección Dual y Kukident Protección Dual disminuyeron significativamente la viabilidad celular en todas las diluciones (***) $p < 0,001$). En comparación con el grupo de control y el resto de los adhesivos, Corega Sin Sabor mostró una puntuación de viabilidad celular significativamente más alta en todas las diluciones (***) $p < 0,001$). Kukident Protección Dual y Kukident Pro Protección Dual fueron responsables de la necrosis, y el número de células se redujo mucho, con una morfología aberrante y un núcleo picnótico. Finalmente, los productos Kukident promovieron la producción de ROS en las células gingivales (***) $p < 0,001$).

Conclusiones: Los resultados sugieren que los adhesivos para dentaduras postizas que contienen zinc pueden inhibir la viabilidad celular, estimular la producción de ROS, provocar una morfología celular aberrante e inducir apoptosis y muerte celular.

Palabras clave: biocompatibilidad, citotoxicidad, células gingivales humanas, adhesivos de prótesis



SUMMARY



SUMMARY

Purpose: To compare the cytotoxicity of six commercially available denture adhesives on human gingival cells: Corega Sin Sabor, Kukident Pro Protección Dual, Novafix Sin Sabor, FiftyDent, Corega Acción Total and Kukident Protección Dual.

Material and methods: Eluates of denture adhesives were brought into contact with human gingival cells. Cell toxicity was assessed for cell viability (MTT assay), cell morphology (immunofluorescence assay), apoptosis/necrosis and reactive oxygen species (Flow cytometry assay). Also, the pH of each sample was determined. Data were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) and a Tukey test. Significance was considered when $p \leq 0.05$.

Results: All denture adhesives tested led to a reduction in pH, especially Kukident Pro Protección Dual and Kukident Protección Dual ($***p < 0.001$). The cell viability assay showed that Kukident Pro Protección Dual and Kukident Protección Dual decreased cell viability significantly at all dilutions ($***p < 0.001$). Compared with the control group and the rest of the adhesives Corega Sin Sabor showed a significantly higher cell viability score at all dilutions ($***p < 0.001$). Kukident Protección Dual and Kukident Pro Protección Dual were responsible for necrosis, and the number of cells was much reduced, with an aberrant morphology and pyknotic nucleus. Finally, Kukident products promoted ROS production in gingival cells ($***p < 0.001$).

Conclusions: The results suggest that denture adhesives containing zinc may inhibit cell viability, stimulate ROS production, provoke aberrant cell morphology, and induce apoptosis and cell death.

Keywords: biocompatibility; cytotoxicity; human gingival cells, denture adhesives.



ABREVIATURAS



ABREVIATURAS

CSS	Corega Sin Sabor
KPPD	Kukident Pro Protección Dual
NSS	Novafix Sin Sabor
FD	FiftyDent
CAT	Corega Acción Total
KPD	Kukident Protección Dual
PPR	Prótesis Parcial Removible
CMC-Na	Carboximetilcelulosa de sodio
PVM-MA	Polimetilviniléter-anhídrido maleico
FGH	Fibroblastos gingivales humanos
CTGF	Factor de crecimiento del tejido conectivo
IL-6	Interleukina 6
D-MEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
HBSS	Solución salina equilibrada
DAPI	Diclorhidrato de 4,6-diamidino-2-fenilindol
PS	Fosfatidil serina
PE	Ficoeritrina
PI	Propidio
7-AAD	7-aminoactinomicina D
ROS	Compuestos reactivos del oxígeno



LISTADOS DE FIGURAS Y TABLAS



LISTADO DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de la esperanza de vida en el mundo.

Figura 2: Prótesis parcial removible metálica.

Figura 3: Prótesis parcial removible acrílica.

Figura 4: Prótesis completa superior e inferior.

Figura 5: Diseño digital de completas superior e inferior. (A) Vista frontal. (B) Vista lateral.

Figura 6: Preparación dental de los pilares de una sobredentadura retenida por dientes naturales.

Figura 7: Esquema de una sobredentadura sobre implantes.

Figura 8: Imagen de cómo se recorta una tira sintética para adaptarla a una prótesis completa inferior.

Figura 9: Colocación de adhesivo tipo crema en una prótesis completa superior.

Figura 10: Cabina de seguridad biológica vertical tipo II con filtro HEPA (Telstar)

Figura 11: Centrifugadora.

Figura 12: Hemocitómetro.

Figura 13: Formación de cristales de formazán, tras 4 horas de incubación.

Figura 14. Análisis de pH.

Figura 15. Proliferación celular de los diferentes materiales aplicados sin diluir.

Figura 16. Proliferación celular de los diferentes materiales aplicados a dilución 1:2.

Figura 17. Proliferación celular de los diferentes materiales aplicados a dilución 1:4.

Figura 18. Morfología del citoesqueleto y núcleo de los fibroblastos gingivales a las 72 horas de cultivo en los seis tipos de adhesivos comerciales.

Figura 19: Proporción de células vivas, apoptosis temprana apoptosis tardía y células necróticas medidas mediante citometría de flujo.

Figura 20: Análisis del test CM-H₂DCFDA para la producción intracelular de compuestos ROS inducidos por los adhesivos de estudio.



LISTADO DE TABLAS

Tabla 1: Composición básica de los adhesivos para prótesis en crema

Tabla 2: Material testado.



1-INTRODUCCIÓN

1- INTRODUCCIÓN

1.1 CONTEXTO SOCIODEMOGRÁFICO

En los últimos años, existe un envejecimiento de la población, ya que continúa aumentando la esperanza de vida, sobre todo en los países más desarrollados. Se prevé que la esperanza de vida aumente en los 35 países más industrializados con una probabilidad de al menos el 65% para las mujeres y el 85% para los hombres. Hay más de un 50% de probabilidad de que para 2030, la esperanza de vida femenina nacional rompa la barrera de los 90 años, un nivel que algunos consideraron inalcanzable a principios del siglo XXI(1).

Existe un mapa interactivo con los datos de la esperanza de vida mundial. La media de edad en España es de 83,1 años de edad, solo superado por Japón con 84,5 y Suiza con 83,3. <https://www.worldlifeexpectancy.com/> (Figura 1).

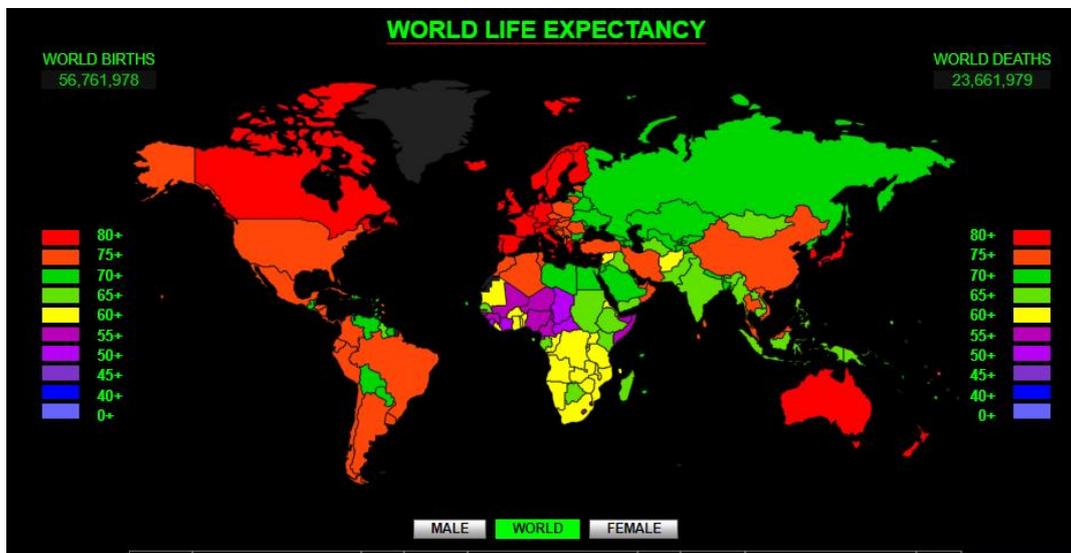


Figura 1: Mapa de la esperanza de vida en el mundo

La esperanza de vida aumenta y esto es debido a una mejor calidad de la misma, representada por la caída de las tasas de mortalidad, disminución de la fertilidad, la reducción de la mortalidad infantil, aumento del acceso y de las coberturas sanitarias. Además, la evidencia actual sugiere que las personas no solo viven más tiempo que antes, sino que también viven mejor, con menos discapacidad y menos limitaciones funcionales(2).



1.2 EL PACIENTE EDÉNTULO

Hablamos de edentulismo para referirnos a la pérdida completa de los dientes naturales, siendo éste uno de problemas más graves que afectan a la salud bucal de los pacientes ancianos (3). Según la Organización Mundial de la Salud, los pacientes desdentados se consideran discapacitados físicos debido a su incapacidad para masticar y hablar correctamente(4).

A pesar del envejecimiento que encontramos en la población, varios estudios han demostrado que la cantidad de pacientes edéntulos ha ido disminuyendo, sobre todo en hogares donde se tiene una alta cantidad de ingresos, mientras que en hogares con un nivel socioeconómico bajo esta disminución ha sido menor(3,5,6). Se calcula que en el año 2050 sólo en Estados Unidos 12.2 millones de personas lo serán (5). En Europa, la prevalencia del edentulismo actualmente varía del 15% al 72% para personas mayores de 65 a 74 años en varios países(4).

Los pacientes a los que solemos tratar se podrían dividir en tres grupos. Aquellos pacientes jóvenes con suficientes recursos económicos que buscan restauraciones fijas o implatosoportadas y que, al preguntarles, dicen “no me imagino llevando una prótesis removible como mis abuelos”. El segundo grupo está formado por aquellos pacientes que han perdido un número mayor de dientes pero no pueden permitirse implantes dentales por lo que con frecuencia usan prótesis parcial removible, siendo este grupo el más mayoritario. El tercer grupo son los pacientes edéntulos, son ya raros en nuestro entorno, siendo pacientes muy mayores que estarían dispuestos a pagar por implantes dentales pero tienen graves problemas médicos, siendo a veces el tratamiento de implantes un riesgo para su salud(7).

El número de dientes en la cavidad oral afecta la calidad de vida. La pérdida de piezas dentales da lugar a una pobre capacidad funcional, así como nutricional, estética y desafíos psicológicos, como una baja autoestima y una pobre integración social(3, 8).

Las principales causas del edentulismo son las exodoncias provocadas por caries, enfermedad periodontal, traumatismos y cáncer oral. Disminuyendo la prevalencia de estos factores, se podrá disminuir el edentulismo, siendo en los últimos años menos habitual(9). Además de estos factores, el edentulismo completo es el resultado final de un proceso de enfermedad oral multifactorial y otras enfermedades comórbidas.



Existe relación entre el edentulismo y una multitud de enfermedades sistémicas como la desnutrición, la obesidad, las enfermedades cardiovasculares, la artritis reumatoide, las enfermedades pulmonares, cáncer e incluso la mortalidad(10).

1.3 REHABILITACIONES PROTÉSICAS REMOVIBLES

Como ya hemos dicho, la pérdida de dientes es el resultado de varios factores como caries, enfermedad periodontal, patología pulpar, trauma y cáncer oral y puede resultar en dificultades para masticar que afectan la salud general y la calidad de vida (1). Existe numerosas opciones de tratamiento, como rehabilitaciones fijas sobre dientes, y rehabilitaciones fijas sobre implantes. Aunque el interés por los implantes en odontología está en continuo crecimiento, muchos pacientes edéntulos siguen siendo tratados rehabilitaciones removibles, es decir, son aquellas prótesis que el paciente puede insertar y retirar él mismo de la cavidad oral. Este tipo de prótesis es elegida por muchos pacientes porque es de naturaleza conservadora, se puede acceder a ella relativamente rápido y es más económica(11). Como sabemos, el reemplazo de los dientes perdidos por pacientes ancianos desdentados, está influenciado por el estado general de salud, los tejidos dentales, situación financiera, y acceso al dentista (4).

TIPOS DE REHABILITACIONES PROTÉSICAS REMOVIBLES

PRÓTESIS PARCIAL REMOVIBLE

Una prótesis parcial removible (PPR) es un tratamiento odontológico restaurador, el cual restituye en la medida de lo posible la funcionalidad dental, así como la estética. El soporte de este tipo de prótesis removible reside en las piezas dentales y en los tejidos blandos. Existen dos tipos según el material del que esté fabricada su base, metálicas o acrílicas(12)(Figuras 2 y 3).

A diferencia de la terapia con implantes, el tratamiento con PPR es mínimamente invasivo y permite una atención rentable y oportuna para pacientes parcialmente edéntulos. Reemplaza tanto tejidos perdidos duros como blandos para proporcionar soporte estético. También son ampliamente utilizadas como prótesis de transición o

provisionales de otros tipos de rehabilitaciones a largo plazo y para restaurar tramos largos desdentados, siendo por ello, una buena terapia para numerosos escenarios clínicos. Por lo tanto, las prótesis parciales removibles seguirán siendo un importante alternativa de tratamiento y opción viable para una gran proporción de población desdentada(12).

Hasta la fecha, los tratamientos de prótesis parciales removibles todavía siguen siendo demandados por los pacientes parcialmente edéntulos. Además, este tipo de tratamiento tiene efectos positivos respecto la satisfacción de los pacientes que lo usan, mejorando su calidad de vida, siendo conocidos estos datos gracias al Perfil de impacto de la salud oral, un cuestionario de satisfacción de los pacientes (OHIP) (13).



Figura 2: Prótesis parcial removible metálica (Imagen cedida por Víctor Cerdá)



Figura 3: Prótesis parcial removible acrílica (Imagen cedida por Víctor Cerdá)

PRÓTESIS COMPLETA

La rehabilitación mediante prótesis completa sigue siendo una de las opciones de tratamiento prostodóntico más popular y tradicional para pacientes edéntulos totales que tienen enfermedades sistémicas y limitaciones anatómicas o financieras (14). El éxito de este tratamiento depende de factores pronósticos como la edad del paciente, factores psicológicos y rasgos personales, experiencia previa en este tratamiento, su actitud y expectativas, la anatomía de su cresta ósea residual, el método de elaboración de la prótesis y su calidad y sus cambios a lo largo del tiempo junto con la estética y las secuelas, que el uso prolongado de este tratamiento, provocan con el paso del tiempo(15)(Figura 4).



Figura 4: Prótesis completa superior e inferior

La resorción de la cresta residual es un fenómeno que describe la remodelación de por vida de la cresta alveolar después de las extracciones dentales. El tamaño de la cresta residual se reduce más rápidamente en los primeros 6 meses y continúa lentamente a lo largo de la vida. La resorción residual de la cresta se ha descrito como crónica, progresiva, irreversible y catabólica. Hay varios estudios que han examinado este fenómeno en el pasado; describiendo el proceso utilizando medidas estandarizadas en radiografías panorámicas, radiografías laterales de cráneo y modelos de diagnóstico(16, 17). La cantidad de reabsorción puede ser diferente en función de cada



individuo, de la localización en la mandíbula, de los diversos factores anatómicos, protésicos, metabólicos, sistémicos y funcionales(18).

Además, se ha investigado la asociación de la resorción de cresta residual y afecciones sistémicas, como osteoporosis, menopausia, y también con la edad y el género. Hubo una mayor tendencia a crestas más estrechas en las mujeres de edad avanzada. Las deficiencias de estrógenos y los suplementos vitamínicos ayudaron a minimizar la reabsorción de la cresta(18, 19).

Se han evaluado diferentes factores protésicos y funcionales que pueden influir y/o aumentar la reabsorción de la cresta, como las dentaduras completas inmediatas, dientes monoplanos o no anatómicos de las prótesis completas (cero grados) y duración del uso prolongado de la este tipo de dentadura postiza(16).

Como consecuencia de la resorción de la cresta residual, la adaptación de la base de la dentadura puede cambiar significativamente. Las dentaduras mal ajustadas pueden causar los siguientes cambios en la mucosa: úlceras traumáticas, estomatitis protésica, infección por *Candida*, queilitis angular e hiperplasia de los tejidos blandos (20). Se podría compensar el tejido reabsorbido mediante un rebase, siendo definido éste como el procedimiento utilizado para readaptar de forma precisa la superficie de la prótesis dental removible que se une al tejido oral con nuevo material base para que la prótesis acomode mejor. Los materiales usados para realizar este rebase son una silicona elastomérica o resina acrílica plastificada. Con el tiempo, los plastificantes del material de revestimiento se vuelven mucho más duros, mientras que la silicona elastomérica es más estable dimensionalmente. Sin embargo, la unión de la silicona a la base de la dentadura no es fiable a largo plazo(21).

Los limpiadores para dentaduras postizas disponibles en el mercado pueden dañar la superficie de los materiales de revestimiento, lo que lleva a la formación de biopelículas y la colonización de *Candida albicans*. Por lo tanto, un uso prolongado de estos adaptadores de tejidos, en comparación con rebases de laboratorio, más estables, deben ser evitados(22).

Los materiales para el revestimiento de dentaduras postizas a menudo se utilizan para acomodar tejidos duros y blandos durante los períodos de curación. El tiempo de curación es variable en cada paciente. Los marcadores de recambio óseo conocidos



como osteocalcina sérica y telopéptidos C-terminales, que se evalúan fácilmente en sangre, han sido relacionados con un mayor número de rebases blandos entre los pacientes con dentaduras postizas. Por lo tanto, en el futuro, ciertos marcadores biológicos pueden potencialmente informar al clínico del momento adecuado para realizar el rebase de laboratorio, es decir, un rebase con resina dura, que ya sería permanente(23).

El ajuste, la retención y la estabilidad de la prótesis son la clave del éxito de una prótesis completa. Por lo tanto, las revisiones periódicas del estado de la prótesis y de los tejidos blandos y duros son esenciales. Se recomienda educar adecuadamente a los pacientes sobre la importancia del cuidado y mantenimiento de la dentaduras(24). Siendo claves un buen almacenamiento, la limpieza de biopelículas, la desinfección y el uso de adhesivos para dentaduras. Se recomienda que la biopelícula en las dentaduras postizas se elimine todos los días con un limpiador eficaz y no abrasivo; las prótesis no deben sumergirse en agua hirviendo o solución de lejía por más de 10 minutos; y aunque el uso de adhesivos para dentaduras es útil, el período de uso no debe exceder los 6 meses. Enseñar a los pacientes a reconocer los cambios que ocurren en su propia boca y hacer visitas al dentista puede prevenir los problemas y prolongar el uso de la prótesis(23).

AVANCES EL PRÓTESIS REMOVIBLE MEDIANTE TECNOLOGÍA CAD-CAM

Los métodos de fabricación convencional de prótesis removibles parciales y completas no han cambiado mucho durante los últimos 70 años, desde la introducción del polimetilmetacrilato en 1936 (25). La resina acrílica ha mostrado mejoras en sus propiedades físicas y procesos de polimerización con la introducción de la autopolimerización, las técnicas por compresión, el procesado mediante microondas y las técnicas de inyección (26). El protocolo convencional para la fabricación de prótesis completas implica una compleja secuencia de pasos clínicos y de laboratorio. En promedio, este proceso requiere varias citas clínicas(27); que consisten en registrar las relaciones horizontales y verticales de los maxilares y transferirlas con precisión al articulador semiajustable, la aprobación del paciente de la estética y las inevitables visitas posteriores para su correcto ajuste. Este número elevado de citas puede

desanimar a los odontólogos a ofrecer rehabilitación del edentulismo con dentaduras completas como parte de sus servicios(28).

Con la llegada en 1980 de la tecnología CAD-CAM, que consiste en el diseño y fabricación de estructuras realizadas mediante ordenador, se han hecho grandes avances en la odontología, debido a su exitosa aplicación en el ámbito maxilofacial, de la prótesis fija y de la prostodoncia implantológica (29). Actualmente el CAD-CAM también se usa para la fabricación de prótesis parciales y completas para simplificar los procedimientos clínicos y de laboratorio, y para establecer protocolos eficientes en costo y tiempo que proporcionen resultados favorables para los pacientes edéntulos(12, 30) (Figura 5).

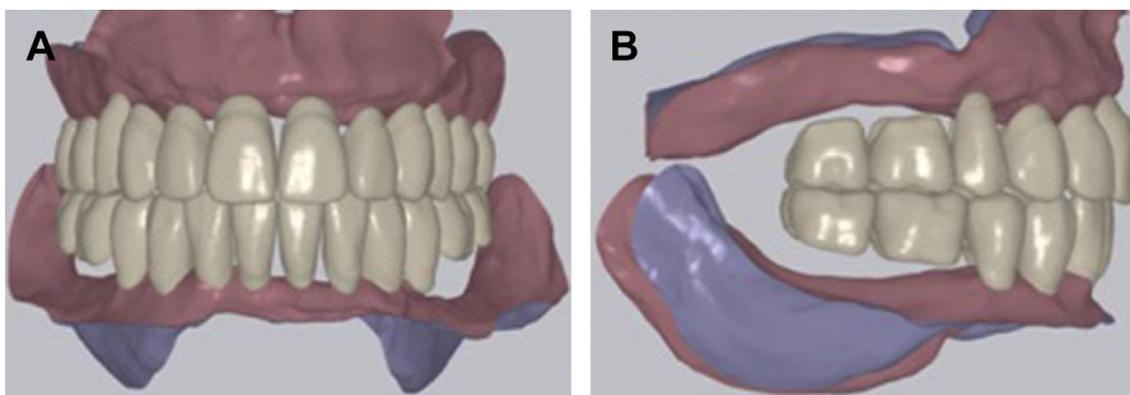


Figura 5: Diseño digital de completas superior e inferior. (A) Vista frontal.(B) Vista lateral (4).

Estos avances en la fabricación digital han tenido un impacto significativo en los procesos convencionales de fabricación de las prótesis. Los métodos para la construcción de las dentaduras con tecnología CAD-CAM simplifican y acortan el número de visitas del paciente al odontólogo (14, 30, 31). Existen diferentes sistemas para la realización de prótesis mediante CAD-CAM disponibles comercialmente. La mayoría de los métodos usan tecnología sustractiva para fresar las dentaduras, mientras que otros usan fabricación aditiva con impresión tridimensional(32). En ambas técnicas, se escanean los registros obtenidos en la clínica a través de modelos maestros o impresiones definitivas, se digitalizan y se diseñan y fresan las prótesis monolíticas o las bases de las dentaduras(12, 33).



El proceso de fabricación sustractivo utiliza discos de resina prepolimerizados fabricados bajo alto calor y presión, lo que supuestamente da como resultado menos liberación de monómero, mayor densidad y menos microporosidad y contracción volumétrica de polimerización. La disminución en el monómero residual y la porosidad se han relacionado con una menor colonización microbiana en las superficies de las dentaduras y una mayor biocompatibilidad con el medio oral, en comparación con su homólogo convencional. Este método de fabricación elimina los errores del procesamiento convencional de las dentaduras, que son: el alabeo de la dentadura, la contracción lineal y volumétrica, la porosidad y el agrietamiento(26).

Las prótesis completas monolíticas realizadas con CAD-CAM producen una mayor precisión, reproducibilidad y el menor movimiento de la dentadura durante la fabricación en comparación con otros métodos de fabricación de prótesis completas(31). Las prótesis fresadas con CAD/CAM tienen mejor retención y conllevan un menor tiempo clínico en la silla del odontólogo que las prótesis convencionales (14,32). Además, una de las ventajas más importantes de esta tecnología es la disminución de citas clínicas, ya que las impresiones definitivas, los registros maxilomandibulares y la selección de dientes se completan en una única cita reduciendo así el número de visitas(34). Se ha medido la satisfacción del paciente a través de encuestas y se ha determinado que los pacientes están generalmente satisfechos con el resultado del tratamiento y con el uso de la tecnologías digitales. Estos resultados sugieren que, independientemente de la capacitación y experiencia del operador, este método para la fabricación de prótesis puede ser predecible siempre que se apliquen bien los fundamentos de la prostodoncia(27). Otra de las ventajas de esta metodología es poder guardar el archivo electrónico de los datos del paciente y de su dentadura para una futura fabricación(14). Sin embargo, existen crecientes preocupaciones debido al alto costo de implementación en comparación con las técnicas de fabricación tradicionales(34).

Este método, que utiliza la última tecnología, ha mostrado resultados prometedores a corto plazo ofreciendo un buen ajuste, retención y propiedades mecánicas. Pero, aún se necesita más investigación, con tamaños de muestra sustanciales y períodos de seguimiento más largos para validar el rendimiento de esta alternativa de tratamiento.

SOBREDENTADURA RETENIDA POR LOS DIENTES

Por al elevado coste de los tratamientos con implantes dentales, salvar algunos dientes para fabricar una sobredentadura con soporte dental (Figura 6) es una opción viable para el manejo de pacientes desdentados (35) Debido a la pérdida continua e impredecible de hueso residual después de una extracción y durante el uso de prótesis completa algunos autores sugieren no extraer toda la dentición remanente sana, sino preservar varios dientes para fabricar sobredentaduras sobre ellos, para proporcionar estabilidad y retención a las dentaduras(35). Esta modalidad clásica usa los caninos inferiores previamente tallados y sellados con restauraciones de amalgama, estando comprobado que con ello, el proceso de reabsorción de la cresta se retrasa ocho veces más que con el uso de una dentadura postiza completa convencional en la mandíbula(36). Además es conocido que, con esta técnica, los receptores periodontales conservan una retroalimentación sensorial, lo que da lugar a una mejora del sistema masticatorio en el paciente edéntulo en comparación con las dentaduras postizas completas convencionales. Sin embargo, la fabricación de este tipo de prótesis dentales generalmente requiere más tiempo y costo para el paciente(37).



Figura 6: Preparación dental de los pilares de una sobredentadura retenida por dientes naturales(4).



Se incorporan varios sistemas de fijación en los caninos para mejorar la retención de la sobredentadura, como accesorios de bola, localizadores, cofias telescópicas, etc. El uso de estos mecanismos retentivos proporciona un tratamiento satisfactorio a pacientes edéntulos(38). Las causas comunes del fracaso de este tratamiento han sido la caries, la enfermedad periodontal, el fallo endodóntico y el trauma en los dientes remanentes(37). Con una estricta higiene, revisiones periódicas en el dentista, el uso de flúor, el tratamiento de las bolsas periodontales si fuese necesario, y en resumen un buen uso de estas sobredentaduras retenidas por los dientes, este tratamiento es aún eficaz para pacientes edéntulos(39).

SOBREDENTADURA SOBRE IMPLANTES

Los implantes dentales han sido efectivos para minimizar la tasa de resorción ósea. Las prótesis soportadas por implantes(Figura 7) tienen un efecto de preservación ósea mientras que una prótesis completa mucosoportada da lugar a una resorción ósea continua(40). Los implantes dentales pueden incluso promover el crecimiento óseo. Un estudio comparativo de la reabsorción de la cresta residual mandibular posterior en pacientes que usan dentaduras postizas convencionales y las sobredentaduras sobre implantes, mostró que hubo una reducción media en la altura alveolar de 1,63 mm en el grupo de prótesis convencional en comparación con 0,69 mm en el grupo de sobredentadura durante un período de 5 años(41).

Aunque las opciones de tratamiento con implantes dentales para pacientes edéntulos son muchas, el uso de implantes dentales para este grupo de pacientes a nivel mundial puede ser diferente. Kronstrom y Carlsson(42)realizaron una encuesta a prostodoncistas en 33 países. Menos del 20% de sus pacientes recibió tratamiento con implantes de mandíbulas edéntulas. Se estimó que los costos relacionados con las prótesis soportadas por implantes eran de 5 a 12 veces más caro que las dentaduras postizas convencionales(43). Independientemente, el costo inicial del tratamiento con implantes sigue siendo alto para los pacientes desdentados(44).



Figura 7: Esquema de una sobredentadura sobre implantes(45).

1.4-ADHESIVOS DE PRÓTESIS: TIPOS Y COMPOSICIÓN

Los adhesivos de prótesis son productos que aportan mayor retención a las dentaduras removibles. Su uso se remonta al siglo XVIII, pero no se menciona hasta el XIX en la literatura. Actualmente, los fabrican las casas farmacéuticas y proporcionan viscosidad y pegajosidad cuando absorben agua(46).

Los adhesivos para dentaduras postizas se utilizan para mejorar la función de éstas, mejorar la adaptación a las nuevas dentaduras postizas y proporcionar comodidad psicológica a los pacientes. Algunos estudios afirman que la prevalencia del uso de estos adhesivos varía significativamente del 8% al 32.9% en diferentes países. Sin embargo, se ha especulado que su uso puede aumentar en el futuro cercano debido a que cada vez son más admitidos por los dentistas, incluso en la formación de pregrado(47).

Se ha demostrado que los adhesivos para prótesis mejoran la retención, la estabilidad, la fuerza de mordida y la capacidad masticatoria de la dentadura postiza(48). Además, mejoran la satisfacción de los pacientes al mejorar el ajuste, la comodidad, la capacidad de masticación, la confianza y la calidad de vida relacionada con la salud oral(49). Sin embargo, algunos estudios informaron de que los pacientes dejaban de usarlos por una mejora decreciente en la comodidad, sabor desagradable o porque ya se había acostumbrado a la nueva dentadura(50).



Se ha registrado un aumento constante en el uso de adhesivos en estudios de los últimos 30 años. Una de las razones del aumento en su uso pueden ser los cambios positivos en las actitudes de los dentistas; el 60,3% de ellos recomendó su uso a pacientes que usan dentaduras postizas viejas o fabricadas recientemente. Además, las mujeres usaban más a menudo los adhesivos debido a que éstas están menos satisfechas con las dentaduras convencionales que los hombres (47).

Se podría pensar que el uso de adhesivos esté íntimamente relacionado con un enmascaramiento de problemas subyacentes de fabricación de las dentaduras, pero se ha demostrado que los adhesivos son usados incluso cuando las dentaduras postizas tienen un buen diseño y funcionamiento, ya que estudios previos revelaron que el uso de los adhesivos conduce a una mejora significativa en la calidad de vida relacionada con la salud bucal en las dentaduras postizas colocadas recientemente y un mejor rendimiento incluso en las que se ajustan bien. Otra posible explicación es que los pacientes que comenzaron a usar adhesivos de prótesis, debido a una dentadura de reducida calidad, puede haber seguido usándolos incluso cuando las dentaduras postizas se mejoraron o reemplazaron más tarde (47).

TIPOS DE ADHESIVOS

Los primeros adhesivos para prótesis fueron formulados a base de gomas vegetales como la acacia, el tragacanto o la goma karaya, que absorbían agua y formaban una capa gelatinosa entre la mucosa y la prótesis. Los resultados de estos primeros adhesivos no fueron muy satisfactorios porque eran altamente solubles, sobre todo en líquidos calientes, haciendo que el adhesivo fuera útil durante solo un período corto de tiempo(51).

La composición de los adhesivos para dentaduras postizas continúa cambiando a medida que los fabricantes intentan mejorar la eficacia de sus productos. Los adhesivos se pueden dividir en 2 tipos: adhesivos tipo pegamento y tipo revestimiento. El tipo pegamento puede estar en forma de polvo, crema, pastas, tiras o almohadillas y utilizan un polímero soluble en agua como componente adhesivo, que se aplica para mejorar la retención y la estabilidad de las dentaduras mediante fuerzas de adhesión. El segundo tipo de adhesivos, los de revestimiento, son pastas no acuosas que se

aplican para mejorar la retención y estabilidad de las dentaduras postizas por adsorción. Se usan para rellenar el espacio que se encuentra entre la dentadura mal ajustada y la mucosa oral dando lugar a una mayor adhesión. Sin embargo, aunque este tipo puede mejorar temporalmente la estabilidad y la retención de dentaduras postizas mal ajustadas, tienen efectos adversos, como la pérdida ósea inusual de la cresta residual, debido a una distribución desigual de las fuerzas de la masticación sobre la mucosa y a la maloclusión causada por el deterioro del revestimiento. Además, se producen grandes cambios en sus propiedades viscoelásticas con el tiempo. Por lo que, este tipo está en desuso y no está actualmente recomendado (52).

A su vez los adhesivos de prótesis tipo pegamento se suelen dividir en 2 grupos, solubles e insolubles. Los insolubles incluyen almohadillas y tiras sintéticas (Figura 8); el grupo soluble incluye cremas, pastas y polvos (Figura 9). Sin embargo, el único ingrediente constante en la composición de adhesivos para dentaduras en crema y en polvo es la inclusión de uno o más componentes que se hinchan y se vuelven viscosos y pegajosos a medida que absorben agua, o dicho más apropiadamente, se hidratan. Los dos ingredientes constantes en el grupo insoluble son una base de tela y un componente que se vuelve pegajoso cuando está hidratado(51).



Figura 8: Imagen de cómo se recorta una tira sintética para adaptarla a una prótesis completa inferior(51).



Figura 9: Colocación de adhesivo tipo crema en una prótesis completa superior(51).

Los adhesivos tipo pegamento han ido evolucionando mucho en los últimos 20 años. Se ha demostrado que la aplicación de estos productos acorta el tiempo de masticación y aumenta la fuerza oclusal. Además, puede conducir a mejoras en los hábitos dietéticos en usuarios de prótesis completa(53).

Los adhesivos tipo polvo y crema son los más recomendados porque ocupan una fina película sobre la dentadura que hace que no se varía la dimensión vertical oclusal. Aunque es más fácil eliminar los adhesivos tipo polvo de la mucosa oral en comparación con los adhesivos tipo crema después del uso, es difícil obtener una viscosidad consistente con ellos porque depende de la cantidad de agua que le agregue el paciente. Aunque existen varios estudios sobre las propiedades de los adhesivos que están en el mercado, no hay suficiente información disponible sobre la relación entre sus propiedades mecánicas y su composición(52).



COMPOSICIÓN DE LOS ADHESIVOS

Para que su uso sea efectivo, los adhesivos requieren de ciertas características, tales como alta resistencia de adhesión a la prótesis, viscosidad adecuada, alta biocompatibilidad, nivel de pH adecuado, alta estabilidad y fácil higiene (52).

-Adhesivos solubles

Los adhesivos a base de goma usados en los años 60 fueron posteriormente sustituidos por agentes sintéticos, que dependen principalmente de las propiedades químicas de uno o más ingredientes activos que se hinchan y se vuelven viscosos y pegajosos en presencia de agua o saliva. El aumento de volumen resultante de esta acción química llena los vacíos entre la base de la dentadura y los tejidos de soporte. Se ha visto que los adhesivos para dentaduras postizas en presencia de agua se hinchan en un 50% a un 150%(51).

Los ingredientes activos de los adhesivos actuales son una mezcla de sales poliméricas con diferentes grados de solubilidad en agua. Estos polímeros solubles son la Carboximetilcelulosa de sodio (CMC-Na) y el polimetilviniléter-anhídrido maleico (PVM-MA). Estos productos son los componentes principales de los adhesivos, su función es absorber la saliva, dando como resultado una capa viscosa entre la superficie de la dentadura y la mucosa, mejorando la fuerza de adhesión de las dentaduras. Estos dos compuestos tienen diferentes niveles de solubilidad que afectan a su proceso de activación inicial. El compuesto CMC-Na proporciona una fuerte retención inicial y una alta viscosidad, pero debido a su alto nivel de solubilidad se disuelve rápidamente y pierde su efectividad en un período relativamente corto, perdiendo así adhesión. Las sales de PVM-MA que tienen un nivel de solubilidad más bajo, toman más tiempo para activarse, pero duran más. Aunque se necesitarían más estudios adicionales para corroborar la relación entre composición y durabilidad(52).

En la década de 1970, la efectividad de los adhesivos para dentaduras postizas mejoró agregando sales de calcio a la mezcla, y en la década de 1980 la efectividad de los adhesivos para dentaduras postizas mejoraron nuevamente al agregar zinc a su formulación(54).



Además de los ingredientes activos de CMC-Na y PVM-MA, los adhesivos solubles contienen varios componentes no activos que agregan atributos particulares a las formulaciones como vaselina, parafina líquida, aceite mineral y óxido de polietileno u óxido de magnesio, siendo estos materiales de unión o relleno para facilitar la colocación; aceites de menta, gaulteria o mentol para aromatizar; colorante para el color; y borato de sodio, tetraborato de sodio, hexaclorofeno o hidroxibenzoato de propilo como conservantes y agentes antimicrobianos. Los ingredientes activos y no activos, esencialmente, son los mismos para cremas y polvos, pero difieren en el volumen de estos. Sin embargo, la principal diferencia entre cremas y polvos recae en el agente transportador y en los ingredientes antiaglomerantes. El petrolato y el aceite mineral se usan en cremas pero no están presentes en los polvos y el acetato de calcio y dióxido de silicón se usan para minimizar la aglomeración de los adhesivos en polvo(51,55) (Tabla 1).

-Adhesivos insolubles

Las almohadillas y las tiras sintéticas forman el grupo insoluble. A pesar de que la composición de las almohadillas y las tiras difiere de un fabricante a otro, todas ellas esencialmente incluyen una tela laminada impregnada en un componente que se activa con el agua, que se vuelve pegajoso al absorber saliva. Las bandas de laminado pueden ser desde un tejido de fibras, fibras sintéticas no tejidas, tela ligera de polipropileno o papel de celulosa. Otros ingredientes de estos adhesivos son, entre otros, alginato de sodio o polímero de óxido de etileno, que se vuelven pegajosos cuando son activados por la saliva. Quizás la principal diferencia entre las tiras sintéticas y las almohadillas es el grosor de la tela de soporte: las tiras sintéticas son mucho más delgadas(51)

COMPOSICIÓN BÁSICA DE LOS ADHESIVOS PARA PRÓTESIS EN CREMA
Grupo 1: materiales responsables de la adhesión: gomas, pectina, metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, carboximetilcelulosa, celulosa sódica y polímeros sintéticos (acrílicos, polivinil acético, óxido polietileno, etc.)
Grupo 2: agentes antimicrobianos: tetraborato sódico, etanol, etc.
Grupo 3: aditivos, conservantes y colorantes.

Tabla 1: Composición básica de los adhesivos para prótesis en crema(46).



1.5- SATISFACCION DEL PACIENTE CON EL USO DE ADHESIVOS DE PRÓTESIS

Un conocimiento básico de los adhesivos para dentaduras postizas ayudará a proporcionar al paciente las expectativas del producto seleccionado. Las propiedades ideales de los adhesivos de prótesis removibles son: biocompatibilidad con la mucosa, no ser citotóxico, buenas propiedades organolépticas (sabor, color, olor, etc.), no afectar al sentido del gusto, ser sensible a la hidratación, de Inicio rápido y con una duración suficiente de la acción, tener resistencia al lavado, facilidad de limpieza, ser capaz de inhibir del crecimiento de microorganismos, preservación de la integridad de la prótesis, bajo coste y, por último, pero muy importante para el paciente, proporcionar retención y estabilidad (46).

La retención de la prótesis se define como la resistencia al movimiento en dirección vertical. Y la estabilidad de la dentadura postiza se define como la resistencia al movimiento en dirección lateral. Un estudio previo demostró que una mayor viscosidad de la saliva condujo a una mayor resistencia de adhesión a la resina acrílica y, por lo tanto, a una dentadura con una más alta retención y estabilidad. Por lo tanto, la fuerza de adhesión a la resina acrílica es un indicador de retención de la dentadura y de estabilidad. La fuerza de adhesión es uno de los más requisitos importantes de los adhesivos, ya que afecta directamente a la satisfacción del paciente. Además, la viscosidad inicial de los adhesivos puede afectar la manipulación por parte de los usuarios y al grado de deslizamiento del material entre la mucosa y la prótesis (52).

El odontólogo o el farmacéutico puede dar consejos al paciente sobre el uso de los adhesivos de prótesis, pero la decisión final recae en el paciente. A menudo los pacientes probarán diferentes productos antes de decidirse por uno. En profesional debe informar al paciente de: las diferencias entre polvos, cremas y almohadillas; debe aconsejar sobre las razones por las que usar o no adhesivos; debe avisar al paciente de que use la cantidad mínima necesaria para lograr el resultado deseado y que distribuya el adhesivo uniformemente sobre las superficies de soporte del tejido; debe poner en conocimiento del paciente que el producto se puede volver a aplicar cuando sea necesario; debe enseñarle que siempre aplique el adhesivo sobre la prótesis y la mucosa limpias; avisar de las posibles complicaciones y de la necesidad de una evaluación profesional periódica(51).



Los resultados de una encuesta realizada en España son que, la crema es la forma de adhesivo más usada por los pacientes, la que menos desventajas tiene y con la que los pacientes quedan más satisfechos, además de ser, en relación cantidad/precio, la forma de presentación más económica (46).

El uso de un adhesivo para dentaduras postizas no es una modalidad de tratamiento, per se, sino más bien un complemento al tratamiento de prótesis que da lugar a mejoras en la retención de las dentaduras y a la satisfacción de los pacientes que los usan(48).

Algunos autores evalúan la comodidad, confianza, movimiento de la prótesis y la satisfacción general del paciente al usar adhesivos en sus prótesis. Para ello los pacientes con dentadura completa comían una manzana y al evaluar estos 4 parámetros, mediante una escala visual de 0 a 6, se observaban mejores resultados, con diferencias estadísticamente significativas, en los pacientes que usaban adhesivos de prótesis respecto a los que no los usaban (56).

Otros autores evalúan la opinión del paciente mediante cuestionarios de satisfacción con el que se valora en 6 preguntas la satisfacción del paciente en cuanto a la retención de las prótesis al usar dos adhesivos en crema diferentes, si estos mejoran el funcionamiento de las prótesis a la hora de masticar, cuánto tiempo les dura el efecto al adhesivo y si le gusta su sabor. Los resultados fueron que la mayoría de los pacientes estaban muy satisfechos con la retención de dentaduras postizas, sobre todo de las prótesis superiores; la capacidad de masticación de los pacientes mejoró con el uso de los adhesivos; los pacientes afirmaban que los adhesivos perdían eficacia a partir de las 6-12 horas pero eran bastante efectivos en las primeras 5 horas y el sabor de los adhesivos era bueno para la mayor parte de los pacientes(57).

Otro estudio comparó la satisfacción de los pacientes con respecto a la retención, la estabilidad y la acumulación de partículas de comida con un método cruzado aleatorio, doble ciego en usuarios con prótesis completas con y sin adhesivo. En este estudio diecisiete individuos edéntulos fueron aleatorizados y recibieron nuevas dentaduras postizas completas superiores e inferiores. Después de un período de adaptación, participaron en algunas pruebas masticatorias y revisiones clínicas y su satisfacción se



midió usando una escala VAS (0-10). Los autores concluyeron que los adhesivos de dentaduras postizas mejoraron significativamente la satisfacción de los pacientes debido a una mejor retención, estabilidad y menor acumulación de partículas alimenticias entre la dentadura y la mucosa, que cuando estos no se usan(58).

1.6. INDICACIONES Y CONTRAINDICACIONES DE LOS ADHESIVOS DE PRÓTESIS

INDICACIONES DE LOS ADHESIVOS DE PRÓTESIS

-Durante las pruebas para realizar una prótesis: aunque se debe usar una cantidad mínima de adhesivo, ya que si se usa demasiado, los registros de relación mandibular pueden ser erróneos(51, 59).

-Dentaduras inmediatas: al menos en los 6 primeros meses, que es el tiempo que pueden tardar los tejidos blandos y duros en recuperarse en los lugares postextracción. Durante esta fase de recuperación, la prótesis inmediata puede estar mal ajustada y requieren uno o más rebases blandos temporales. El recontorneado de los lugares postextracción es un proceso continuo y el uso de adhesivos de prótesis puede ser útil para aumentar la retención y la estabilidad durante esta etapa. Sin embargo, el uso de un adhesivo para dentaduras postizas está contraindicado inmediatamente después de la extracción de los dientes y la inserción de la prótesis, porque el adhesivo puede introducirse en los alveolos postextracción e interferir con la formación de coágulos(51, 59).

-Reconstrucción o cirugía preprotésica: Los pacientes sometidos a procedimientos quirúrgicos intraorales pueden requerir el uso de un adhesivo para prótesis durante un periodo corto para asegurar retención a una prótesis antigua o provisional. El uso indefinido de un adhesivo para dentaduras postizas puede ser necesario en algunos pacientes que se han sometido a cirugía maxilofacial oral extensa cuando no exista otra alternativa(51).

-Apoyo psicológico: pacientes como atletas, actores, músicos, abogados y aquellos que trabajan de cara al público, en ocasiones, pueden necesitar el apoyo psicológico de un adhesivo para evitar una situación potencialmente embarazosa, incluso aunque sus



dentaduras se ajusten bien. Se debe evitar este uso de los adhesivos ya que puede dar lugar a que se convierta en una rutina diaria(59).

-Estructuras anatómicas comprometidas: en pacientes con resorción excesiva de la cresta, anomalías del desarrollo, intervenciones quirúrgicas, traumas y accidentes cerebrovasculares. En algunos de estos pacientes el uso de adhesivos puede ser un valioso complemento, a veces de una corta duración , mientras que en otros casos puede ser por un período indefinido(51).

-Pacientes de edad avanzada: En pacientes muy mayores que ya llevan una prótesis completa durante muchos años y que probablemente esté desajustada, el tratamiento de elección debería ser hacer una prótesis nueva. Ya que a muchos de estos pacientes les costará adaptarse, tanto física como mentalmente, a una prótesis nueva, a veces, puede ser aconsejable recomendar el uso de adhesivos de prótesis para ayudar al paciente a adaptarse a la nueva oclusión, contornos y ajuste general de la prótesis. Y aunque el odontólogo proponga su uso mientras dure la fase de adaptación, el paciente lo puede convertir en una rutina, sobre todo en pacientes con problemas de memoria. Además, los pacientes ancianos con dentaduras muy viejas y mal ajustadas, que usen un adhesivo y que rehúsan a que se les reajusten las dentaduras postizas o se les hagan otras nuevas, es un dilema para el odontólogo, porque el uso de un adhesivo puede, muy probablemente, estar enmascarando problemas asociados a prótesis mal ajustadas. La solución para este problema es a menudo compleja, ya que sin el consentimiento del paciente, no hay mucho que se pueda hacer(51, 59).

-Pacientes con impedimentos físicos / mentales: los pacientes con trastornos como el síndrome de Down o trastornos neuromusculares que afectan el movimiento muscular pueden beneficiarse del uso de un adhesivo para prótesis completas. Ya que el proceso de aprendizaje está más comprometido, la aceptación y función de una prótesis en este tipo de pacientes puede ser mejorada con el uso de un adhesivo(51).

-Xerostomía: Las causas de la xerostomía son muchas y generalmente están relacionadas con: efectos secundarios de medicamentos, radioterapia, cambios hormonales y trastornos sistémicos como el síndrome de Sjogren. Como el flujo y la cantidad de saliva disminuyen y ésta es necesaria para una adecuada retención de la



dentadura postiza, los adhesivos pueden ser de valor limitado según el grado de xerostomía(60).

-Nuevas dentaduras: la aplicación de una cantidad mínima de adhesivo se puede usar al colocar nuevas dentaduras para ayudar a superar la ansiedad inicial. Aunque para algunos autores, no es aconsejable para no convertirlo en rutina si la prótesis está bien ajustada(61).

-Implantes osteointegrados: en pacientes que han tenido prótesis completas superior e inferior y que posteriormente han reemplazado la prótesis completa mandibular por una sobredentadura sobre implantes, pueden notar que la dentadura superior no es tan estable y retentiva como la inferior. Las opciones de tratamiento pueden incluir: aprender a vivir con este dilema inducido por el tratamiento; recurrir al uso de un adhesivo, a pesar de que la dentadura maxilar ajuste bien o reemplazar la dentadura completa maxilar con otra sobredentadura sobre implantes(61).

-Prótesis parciales removibles: aunque los adhesivos generalmente se asocian con el uso de dentaduras completas, también son útiles en prótesis parciales. Dependiendo del diseño de la prótesis y posición de los dientes pilares, puede ser aconsejable un adhesivo para dentadura postiza, por ejemplo en el caso en que sólo existan dientes pilares en un lado de la arcada superior, siendo el paciente edéntulo en la otra media arcada(51, 61).

CONTRAINDICACIONES/ RIESGOS DE LOS ADHESIVOS

-Prótesis mal ajustadas: por la preocupación de enmascarar una patología subyacente, ya que pueden pasar desapercibidos cambios en la adaptación de los tejidos edéntulos. Por ello, se recomiendan visitas regulares al dentista para su seguimiento (59). Una de las consecuencias del enmascaramiento por el adhesivo de una dentadura desajustada pueden ser las neoplasias. Aunque la aparición de tumores debajo de una dentadura postiza es relativamente poco común, los pacientes y los odontólogos deben estar atentos a ello, porque las consecuencias adversas pueden ser graves. Los cambios en los tejidos de debajo de la dentadura se producen lentamente y con frecuencia son asintomáticos, la reacción inicial del paciente es comenzar a usar un



adhesivo y luego, generalmente sin saberlo, aumenta la cantidad de adhesivo utilizado para compensar con él una dentadura postiza mal ajustada. Como el crecimiento de estos tumores es relativamente lento, el uso de un adhesivo para dentaduras postizas puede enmascarar su presencia, y un paciente puede no notar un tumor hasta que haya alcanzado un tamaño significativo(51).

-Acúmulo de placa bacteriana: sobre todo en pacientes poco hábiles o con mala higiene oral. Esta placa puede dar lugar a inflamación y estomatitis en los tejidos adyacentes a las prótesis(51).

-Alteraciones gástricas: por la ingesta de los adhesivos, sobre todo con los polvos. Se han realizado estudios sobre los efectos secundarios que puede causar, pero estas son reacciones raras, como náuseas, dolor epigástrico y vómitos(62).

-Irritación, enrojecimiento o reacciones alérgicas de las mucosas: debido a la sensibilidad del paciente a alguno de los componentes del adhesivo(51).

-Candidiasis: para ello sería necesaria la adherencia de la Candida albicans a la superficie de la prótesis y, a partir de ahí, su colonización. Algunos autores afirman que los adhesivos podrían servir como reservorio para el crecimiento de este hongo. Pero se ha demostrado que los adhesivos liberan componentes como el borato de sodio, tetraborato sódico, el hexoclorafenol o el propilhidroxibenzoato que inhiben el crecimiento de los hongos(63).

-Prótesis deterioradas: donde se incluyen prótesis fracturadas y prótesis parciales removibles donde se han extraído dientes pilares que la soportaban o estos estén cariados sin posibilidad ya restaurarse (51).

-Pacientes con dientes naturales: Está en controversia, porque aunque algunos adhesivos producen un pH por debajo del pH crítico de la hidroxiapatita y podría ser que no fueran adecuados para pacientes con dientes naturales, no está demostrado que los adhesivos afecten al crecimiento de los Streptococcus mutans(64).



-Toxicidad: Unos pocos estudios in vitro afirman que los adhesivos inducen perfiles citotóxicos dependientes de la dosis y el tiempo sobre los fibroblastos, que afectan a su supervivencia y morfología y dan lugar a inflamación de las mucosas (65).

1.7-FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS (FGH)

Los fibroblastos gingivales humanos (FGH) representan la población celular más abundante de los tejidos gingivales y juegan un papel crítico en la patogenia del sobrecrecimiento gingival inducido por fármacos. Además son uno de los tipos de células más abundantes en el tejido conectivo periodontal. Funcionan como células de soporte para los tejidos gingivales y producen mediadores inflamatorios en respuesta a estímulos proinflamatorios y patógenos (66). Estas células producen fibras de colágeno durante el proceso de curación. La capacidad de este tipo celular de crecer rápido en los tejidos y poder vivir en solitario es la razón por la cual los fibroblastos son fácilmente cultivados(67).

Los FGH también se encuentran entre las células más abundantes de la mucosa oral. Cuentan con una mayor capacidad para la curación de heridas sin dejar cicatrices, en comparación con los fibroblastos de la piel, principalmente debido a una liberación diferencial de factores de crecimiento, como TGF-Beta, factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) y al factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). Además de producir matriz extracelular en los tejidos conectivos orales, los fibroblastos gingivales humanos expresan en la superficie celular proteínas CD14, TLR4 y MD-2, y producen citocinas proinflamatorias como la interleucina 6 (IL-6), llevando a cabo un importante papel inmunomodulador en respuesta al estrés y a las enfermedades como la periodontitis. De este modo, estas células pueden ser interesantes modelos para la evaluación de materiales dentales in vitro y también permiten investigar sobre la liberación de factores de crecimiento y citoquinas que afecten a la biocompatibilidad de los materiales con los tejidos orales(65).



1.8-PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD DE LOS MATERIALES DENTALES

La biocompatibilidad se describe tradicionalmente como la capacidad que tiene un material o sustancia para dar lugar a una respuesta apropiada del huésped al aplicarse sobre él. El término "apropiado" significa que un material biocompatible no es necesariamente inerte, pero debe dar lugar a un riesgo bajo comparado con un material que esté ya clínicamente aceptado. El término "respuesta del huésped" comprende una gran variedad de reacciones biológicas que incluyen, entre otras, las toxicidades sistémicas agudas, subcrónicas y crónicas, la sensibilización/alergenicidad, la irritación/toxicidad local y la mutagenicidad/carcinogenicidad. Además, la bioactividad, es decir, la estimulación de una respuesta tisular deseada mediante enfoques biomiméticos, está frecuentemente conectada al término biocompatibilidad. En otras palabras, la biocompatibilidad correspondería a la suma de que el producto no sea dañino, y además sea eficiente(68).

La citotoxicidad se define como la capacidad de los materiales para dar lugar a daño celular y depende de las propiedades físicas y químicas de estos. Como resultado, los materiales inciden sobre el sistema enzimático, inhibiéndolo reversible o irreversiblemente. Esta acción se puede localizar de forma selectiva sobre sitios de la célula específicos, como la membrana y su estructura lipoproteica, lo que altera la permeabilidad de ésta. También los tóxicos pueden actuar a nivel endocelular, influyendo en en la síntesis de ácidos grasos o en el ciclo de Krebs. Otro de los lugares de actuación de estas sustancias pueden ser los orgánulos celulares como las mitocondrias (varía los mecanismos de oxidación), los ribosomas (afectando a la síntesis de proteínas), el retículo endoplasmático (cambiando la inducción enzimática y la biodegradación) o lesión del núcleo celular (afectando a la replicación del ADN)(69).

La forma de testar los materiales dentales suele llevarse a cabo en varios niveles, siendo el primero de ellos las pruebas de citotoxicidad general, donde se miden el efecto citotóxico, carcinogénico, mutagénico y sensibilizante; correspondiendo el segundo nivel a pruebas de citotoxicidad local donde se expone el material al tejido, tanto durante un corto periodo de tiempo (unos 15 minutos), como a una duración



mayor (un año en tejidos subcutáneos); y denominándose el tercer nivel “estudios de uso o ensayos clínicos”(70).

La relevancia clínica de los datos de las pruebas de citotoxicidad realizadas, depende del objetivo del estudio y de los métodos usados. Con una prueba de detección simple, no se consigue una relevancia clínica significativa; más bien, se logra únicamente una información biológica básica comparada con otros materiales. La relevancia clínica de pruebas más específicas depende del grado de simulación (p. ej., del contacto entre el material y las células o de la elección de las células apropiadas para el experimento). Siempre teniendo en cuenta que las pruebas in vitro simulan situaciones in vivo y son solo modelos y la interpretación de sus resultados debe tener esto en cuenta. Finalmente, cuando se usan pruebas de citotoxicidad para dilucidar el mecanismo de una reacción biológica, la relevancia clínica es de interés reducido: aquí, las pruebas deben ser diseñadas de acuerdo con una pregunta específica (por ejemplo, la generación de especies reactivas del oxígeno). Esto significa que la relevancia clínica debe discutirse por separado para cada uno de los niveles de los experimentos utilizados. Generalmente, los datos de las pruebas de citotoxicidad no son extrapolables directamente a la situación del paciente real(68).

Cuando se realiza una prueba para valorar la citotoxicidad, se tienen en cuenta las reacciones de las células en cuanto a su cantidad o en cuanto a su morfología, basándose en indicadores como la proliferación, viabilidad y funcionalidad celular, como pueden ser los test de apoptosis, adhesión, migración o secreción de sustancias celulares. Con estas pruebas podemos determinar cuánto se han dañado los tejidos en contacto con los materiales, al conocer la cantidad de células que siguen siendo viables y sus rangos metabólicos y de proliferación(71).

El test colorimétrico MTT es un experimento in vitro para conocer la proliferación de las células que se exponen a un material. Esta prueba revela a través de las alteraciones en la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial, la viabilidad de las células. Es un método rápido y económico usado para cultivos celulares monocapa. Se basa en la conversión del metiltiazol tetrazolio, soluble, en formazán púrpura



insoluble. Este formazán es solubilizado posteriormente y su concentración puede determinarse mediante espectrometría(72).

Los adhesivos de prótesis, al colocarlos en éstas, están en contacto directo con la mucosa durante muchas horas diarias, por lo que sus componentes pueden dar lugar a una respuesta local en las células orales, pudiendo ser su composición potencialmente tóxica para éstas. Por este motivo, consideramos importante investigarlos antes de ser empleados diariamente por los pacientes con prótesis removible.



2-JUSTIFICACIÓN



2-JUSTIFICACIÓN

Debido a la creciente población en todo el mundo, la necesidad de manejar pacientes desdentados continuará siendo global. La profesión dental se sigue enfrentando al desafío de cómo tratar mejor a estos pacientes en el futuro. El estándar mínimo para el tratamiento de esta población es restaurar su salud, función, comodidad y estética. Para ello, las prótesis completas y las prótesis parciales removibles siguen siendo un tratamiento muy común, usando en muchos casos adhesivos de prótesis para aumentar la retención y estabilidad de este tipo de rehabilitaciones protésicas. Sin embargo, los efectos de estos productos sobre las células orales no están extensamente testados, aunque estén en contacto con las mucosas durante bastantes horas diarias.

Existen varios tipos de adhesivos para prótesis dentales. En el caso de nuestro estudio, han sido estudiados aquellos en el formato crema, porque es el más usado en la población y además, tiene más fuerza de retención y está más tiempo en contacto con la mucosa oral.

En resumen, con este estudio se pretende analizar la biocompatibilidad de los adhesivos para prótesis, utilizando células humanas próximas a la zona de actuación de estos materiales. Los estudios de biocompatibilidad, son necesarios para conseguir despejar cualquier duda que pueda cuestionar la utilización de estos productos.



3- OBJETIVOS



3-OBJETIVOS

Objetivo principal:

Analizar y evaluar la biocompatibilidad de seis tipos diferentes de adhesivos formato crema para prótesis, utilizando como células de estudio los fibroblastos gingivales humanos.

Objetivos secundarios:

1. Valorar el pH del entorno celular en presencia de los adhesivos de prótesis
2. Evaluar la viabilidad celular frente a los distintos tipos de adhesivos en formato crema.
3. Analizar la morfología celular, mediante imágenes de fluorescencia, en presencia de los distintos tipos de adhesivos.
4. Valorar la apoptosis celular en presencia de los seis adhesivos de estudio.
5. Valorar el número de especies reactivas de oxígeno producidas por los materiales de estudio.



4-MATERIAL Y MÉTODOS



4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1- MATERIALES

Los materiales utilizados para este estudio fueron seis tipos de adhesivos comerciales para dentaduras postizas, cuya composición se muestra en la Tabla 2. Los eluatos de estos materiales son preparados siguiendo las recomendaciones de ISO 10993-5(73).

MATERIAL	FABRICANTE	COMPOSICIÓN	NÚMERO DE LOTE
Corega® Sin Sabor (CSS)	GlaxoSmithKline, Consumer Healthcare SA. Stafford Miller (Ireland) Limited, Clochreane, Youghal Road, Dungarvan, Co Waterford, Ireland.	Calcio/sodio, PVM/MA copolímero, vaselina, goma de celulosa, parafina líquida.	AJ4M
Kukident® Pro Protección Dual (KPPD)	Procter & Gamble Portugal S.A., Qta da fonte, Ed. Álvares Cabral, 2774-527, Paço de Arcos, Portugal.	Calcio/Zinc PVM/MA copolímero, parafina líquida, goma de celulosa, vaselina, sílice, CI 15986, lactato de mentilo, aroma CI45410, sodio, sacarina, limoneno, cinamal, eugenol.	61373
Novafix® Sin sabor (NSS)	Laboratorios Urgo S.L.U. Florida 29, 20120 Hermani, Guizpuzcoa, España.	Parafina líquida, calcio/sodio, pvm/macropolímero, goma de celulosa, vaselina, sílice.	ES0004357/171
Fifty®Dent (FD)	Fiftydent International GMBH, A-7423 PinkafeldAustria	Sodio, carboximetilcelulosa, acetato de polivinilo, alcohol, desnaturizante, triacetina, parafina líquida, sílice, gel de aloe vera, extracto de Commiphoramyrtha.	1082019



Corega® Acción Total (CAT)	GlaxoSmithKline, Consumer Healthcare SA. Stafford Miller (Ireland) Limited, Clochreane, Youghal Road, Dungarvan, Co Waterford, Ireland.	Calcio/Sodio, PVM/MA, copolímero, vaselina, goma de celulosa, parafina líquida, acetato de tocoferilo, metilparabeno, etilparabeno.	S36A
Kukident Protección Dual (KPD)	Procter & Gamble Portugal S.A., Qta da fonte, Ed. Álvares Cabral, 2774-527, Paço de Arcos, Portugal.	Calcio/Zinc, PVM/MA, copolímero, parafina líquida, vaselina, goma de celulosa, sílice, CI 15985, lactato de metilo, aroma, CI 45410, sodio, sacarina, Limoneno, cinamal, eugenol.	71636

Tabla 2. Material testado.

Se prepararon eluatos de estos materiales, siguiendo las recomendaciones ISO 10993-5(73). Para ello, se sumergieron 0,2 g de cada adhesivo para dentaduras postizas en 1ml de Medio Mínimo esencial alfa (α -MEM; GibcoCarlsbad, CA, Estados Unidos) y se incubaron durante 24 horas a 37° C. Debido a la alta viscosidad de los materiales, se realizaron tres pasos de centrifugación (10 minutos a 4000 rpm) hasta que se obtuvo un extracto claro y no sólido. Posteriormente, los extractos se recogieron y diluyeron en medio de cultivo sin suero (1:1, 1:2 y 1:4).

4.2- AISLAMIENTO Y CULTIVO CELULAR

Los fibroblastos gingivales humanos se obtuvieron de los tejidos gingivales adyacentes a cordales impactados en el momento de su extracción (n = 10) a individuos debidamente informados sobre el proyecto de investigación que firmaron un consentimiento informado (Anexo I), de acuerdo con el comité de ética de la Universidad de Murcia (Anexo II). Los tejidos gingivales extirpados se digirieron inmediatamente durante 2 horas a 37°C con 3 mg/ml de colagenasa I (Sigma Aldrich,



San Luis, EE.UU.) y 4 mg/ml de dispasa II (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.). Posteriormente, las células se cultivaron en medio de crecimiento basal [medio de Eagle modificado por Dulbecco (Invitrogen), suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina/ estreptomycin].

Las muestras se conservaron entre 4-8°C durante un máximo de 12 horas antes de ser procesadas.

Extracción del tejido gingival

Para la obtención de la muestra se trabajó en condiciones de esterilidad, usando para ello una cabina de seguridad biológica vertical tipo II con filtro HEPA (Telstar, Bristol, EE.UU.) (Figura 10).

El tejido gingival se obtuvo mediante la realización de una cuña distal en la mucosa de los terceros molares inferiores, obteniéndose así un fragmento de tejido, el cual fue lavado con solución fisiológica estéril para eliminar restos de sangre y posteriormente se procedió a retirar mecánicamente el epitelio.

El tejido fue disgregado sobre una cápsula de Petri que contenía tampón fosfato salino (PBS, 0,1M, PH 7,4) y con ayuda de un bisturí se cortó en pequeñas porciones. La muestra fue posteriormente resuspendida en medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) completo, suplementado con 10% de suero fetal bovino y un 1% de mezcla de antibióticos (penicilina/estreptomycin). El tejido gingival (junto con el tampón fosfato, PBS) se traspasó a un tubo (Falcon), el cual se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm, desechándose el sobrenadante y obteniendo un precipitado que posteriormente se sometería a una disgregación enzimática.



Figura 10: Cabina de seguridad biológica vertical tipo II con filtro HEPA (Telstar)

Disgregación enzimática

Los pasos seguidos fueron los siguientes:

- 1- Tras la obtención del precipitado celular, éste fue sometido a una solución de proteasas: colagenasa I (3 mg/l (Sigma Aldrich) y 4 mg/ml de dispasa II (Invitrogen) durante 1 hora a una temperatura de 37 °C
- 2- Las proteasas se inactivaron añadiendo un volumen igual o mayor de medio de cultivo celular MEM muy frío.
- 3- Se centrifugó durante 10 minutos a 1100 rpm (Figura 11).
- 4- Tras desechar el sobrenadante, se añadió medio de cultivo celular MEM con antibiótico (anfotericina b a una concentración de 250 unidades/ml).



Figura 11: Centrifugadora

Disgregación mecánica

- 1- Con el fin de eliminar los trozos más grandes de tejido remanente, se recogieron las células del tubo con una pipeta Pasteur y se depositaron sobre una malla estéril de 70 μm (Falcon BD, Tewksbury, EE:UU), donde se tamizaron a través de la malla añadiéndose medio de cultivo MEM.
- 2- La solución resultante se centrifugó durante 10 minutos a 3G.
- 3- Posteriormente, se desechó el sobrenadante y se añadió medio de cultivo celular MEM.

Finalmente, las células se sembraron en un frasco de cultivo con medio de cultivo DMEM y se incubaron a 37°C con una saturación de CO₂ del 5% y una humedad relativa del 95%. A los 7 días se cambió el medio de cultivo por DMEM completo y se conservaron en la incubadora en condiciones normales, cambiándose el medio de cultivo cada tres días.

4.3- RECuento CELULAR

Para separar las células del frasco, eliminamos el medio de cultivo y lavamos con tampón fosfato, PBS. A continuación, adicionamos 2 ml de tripsina 0,25% con EDTA al 0,25 mM y lo incubamos a una temperatura de 37°C, 5% CO₂ y 95% HR durante un

tiempo de 5 minutos. Una vez separadas las células del frasco que contenía el medio de cultivo, suministramos 10 ml de Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con el fin de neutralizar la tripsina. Posteriormente, transferimos las células suspendidas a un nuevo tubo tipo Falcon, para poder centrifugarlo a 300g durante 5 minutos, quedando de esta manera las células en el precipitado. Eliminado el sobrenadante, se volvió a resuspender el precipitado en DMEM completo. Todos los procedimientos llevados a cabo se realizaron dentro de la cámara de flujo vertical tipo II, con el fin de poder asegurar las condiciones estériles del medio.

Finalmente se procedió al recuento de células por mililitro. Para lo cual, se agitó la suspensión celular y se transfirieron 50 microlitros de la misma a un tubo Eppendorf, al cual también se le adicionaron 50 microlitros de azul tripán, se mezcló y se transportó a una cámara Neubauer o hemocitómetro (Figura 12), donde tras dejar que las células se asentaran durante 1-2 minutos, se procedió al conteo haciendo uso del microscopio de contraste de fases. Contando por separado, las células teñidas azules (muertas) y las células birrefringentes o blancas (vivas) que se observaron en cada uno de los cuadros por considerar, obteniéndose muestras de entre 3000 y 5000 células, cantidades previamente preestablecidas mediante la realización de una curva de viabilidad.

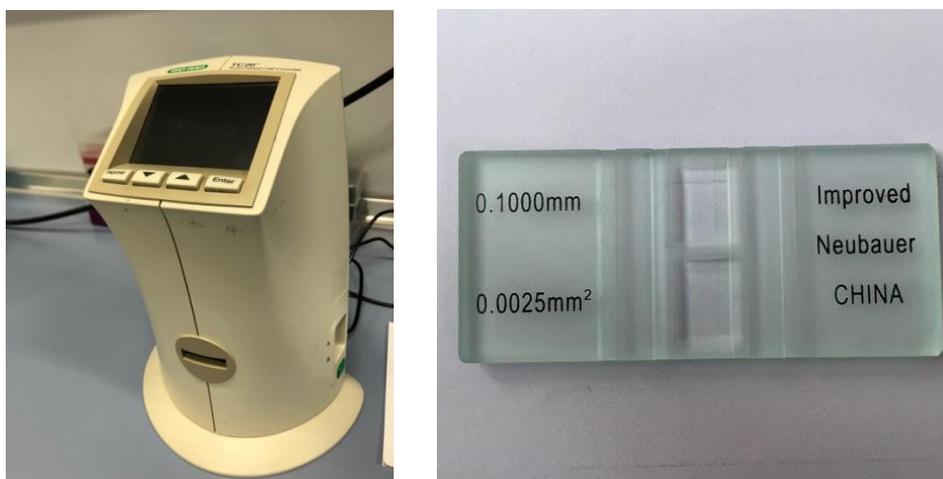


Figura 12: Hemocitómetro

Para el recuento, o bien pueden contarse las cuatro regiones secundarias de la cámara y realizar la media aritmética de los recuentos, o bien proceder al conteo del



cuadrante central junto con los cuatro cuadrantes secundarios. Tras hacer el recuento y la estimación de viabilidad, se ajustó la solución celular a 1×10^5 células/ml y se sembraron 3 ml por frasco de cultivo DMEM de 25 cm³ (Sarstedt) a 37°C, 5% CO₂, y 95% HR. En nuestro caso hicimos uso de una placa de 96 pocillos para el estudio y análisis de proliferación celular, una placa de 12 pocillos para el análisis de adhesión al material de estudio y finalmente un frasco de 75 cm³ ventilado para el mantenimiento celular.

4.4- CULTIVO DE CÉLULAS

Las células aisladas crecen adheridas al plástico del fondo de la placa de cultivo. Para su mantenimiento y expansión, se utilizó un medio de cultivo denominado basal (MB), compuesto por α -MEM al que se le añadieron diferentes componentes:

- SBF (Gibco) a una concentración del 15%
- Glutamina (Sigma) a una concentración 100 μ g/ml
- Ácido ascórbico 2 fosfato (Sigma) a una concentración 100 μ g/ml
- P/E (Sigma) a una concentración 100 μ g/ml
- Anfotericina (Sigma) con una concentración de 2,5 μ g/ml

Todo ello, se realizó con el principal objetivo de obtener un número adecuado de células para poder hacer la investigación. Así, cuando las células estaban cerca de llegar a la fase de confluencia, se llevó a cabo el siguiente proceso:

- Se separó el medio de cultivo del frasco que contenían las células, se adicionó tripsina 0,25% junto con EDTA 1mM en una cantidad suficiente para cubrir la superficie del mismo y se incubó a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad durante 6-7 minutos.
- A continuación, se llevó a cabo la neutralización de la actividad enzimática con medio de cultivo frío. La mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se procedió a resuspender las células obtenidas en 1ml de medio de cultivo basal. Posteriormente, se estimó la viabilidad, se ajustó el número de células de la suspensión, se sembraron en un frasco de medio de cultivo y se incubaron a una temperatura de 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad, cambiándose el medio de cultivo basal con una frecuencia de 3-4 veces a la semana.



4.5-ENSAYOS EXPERIMENTALES

4.5.1- ANÁLISIS DEL pH.

Se realizaron muestras de cada tipo de adhesivo y posteriormente se sumergieron en una solución salina equilibrada (HBSS) sin calcio ni magnesio durante 24 horas. El pH del HBSS antes y después de la inmersión de los adhesivos se estudió por triplicado (GLP21 + de Crison, Barcelona, España). Los resultados corresponden al promedio y a su desviación estándar.

4.5.2 ESTUDIO DE VIABILIDAD CELULAR (MTT).

La viabilidad celular se evalúa en presencia de diferentes eluciones de los adhesivos a estudiar, utilizando para ello el ensayo MTT (MTTCellGrowth kit, Chemicon, Rosemont, EE.UU.). Con esta técnica se quiere evaluar de forma indirecta la proliferación de los fibroblastos gingivales, mediante la determinación de la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas a través de la reducción metabólica que realiza la enzima mitocondrial succinato–deshidrogenasa sobre sustrato bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Como resultado se genera formazán, un compuesto de color azul cuya cantidad generada es proporcional a la cantidad de células vivas en cultivo(74).

Los fibroblastos gingivales humanos se colocaron en placas de 96 pocillos a una densidad de 10^4 células/pocillo y se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 hasta la confluencia. Posteriormente, el medio de cultivo celular se retiró de cada pocillo y se reemplazó por uno de los eluidos descritos anteriormente (1:1, 1:2 y 1:4) durante 72 horas. Las células sin extractos sirvieron como control. De acuerdo con las instrucciones del fabricante, se añadió el reactivo MTT a los pocillos y se dejó en reposo durante 4 horas. Cuando el precipitado púrpura era claramente perceptible, se añadió dimetilsulfóxido (DMSO) (100 μl /pocillo) para crear el colorante de formazán soluble. Se retiró la cubierta y se evaluó la absorción de luz en cada pocillo a 570 nm

utilizando un lector de microplacas (Synergy H1, BioTekWinooski, Vermont,EE:UU:) a 570 nm (Abs570)(Figura 13).

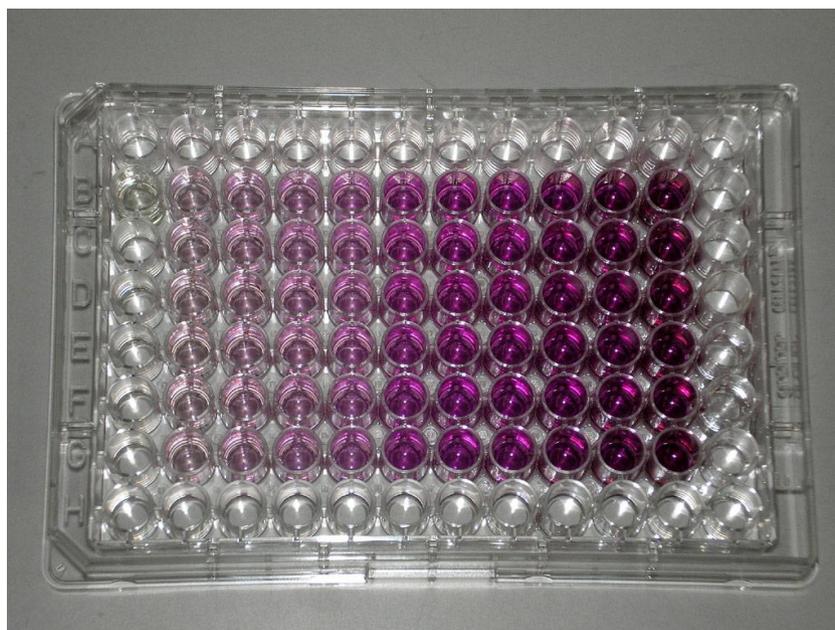


Figura 13: Formación de cristales de formazán, tras 4 horas de incubación.

4.5.3- ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA CELULAR

El análisis confocal se utilizó para analizar los cambios en el citoesqueleto de actina de las células gingivales, como se describió anteriormente en estudios similares(75). Las células se sembraron directamente sobre cubreobjetos de vidrio (10 mm) en placas de 12 pocillos cultivadas en medio de cultivo que contenía extractos sin diluir. Luego, las células se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS, se lavaron con PBS y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,25% en PBS durante 10 minutos. El citoesqueleto de actina F se detectó incubando células durante 1 h con faloidina conjugada con CruzFluor594 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania). Después de los lavados, las células se incubaron con diclorhidrato de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (sonda molecular fluorescente, 0,2 mg/ml en PBS) durante 1 hora a 37° C para marcar los núcleos celulares. Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio de fluorescencia Axiolmager M2 Zeiss (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania).



4.5.4 EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS/ NECROSIS CELULAR

La apoptosis celular es un ensayo común para cualquier tipo de análisis celular, que consiste en conocer si las células de estudio, en nuestro caso, fibroblastos gingivales, junto con el material experimental (adhesivos) se mantienen vivas, o si por el contrario, mueren. En la primera fase de la apoptosis, la membrana celular se mantiene prácticamente intacta, pero se pierde la simetría de la misma. Las anexinas, proteínas dependientes de calcio, se mantienen unidas a fosfolípidos de membrana. Éstas, junto con tinciones vitales, son utilizadas para la identificación de diferentes estados necróticos, para lo cual se utiliza la citometría de flujo. Dentro de ellas, la anexina V, es una proteína recombinante que se une a residuos de fosfatidil serina (PS). Estos residuos en condiciones vitales se encuentran orientados hacia el interior de la célula y solo cuando la célula entra en apoptosis celular es cuando quedan expuestos hacia el exterior de la membrana, pudiendo ser detectada mediante la Anexina V conjugada con ficoeritrina (PE). Si el proceso de apoptosis avanza, la integridad de la membrana celular se pierde, el ADN se hace accesible y se emplean moléculas fluorescentes que actúan como agentes intercalantes en los ácidos nucleicos de doble cadena como el Yoduro de Propidio (PI) y la 7-aminoactinomicina D (7-AAD).

El proceso consistió en que las células gingivales se cultivaron durante 72 h con diversas diluciones de los adhesivos analizados, se separaron con tripsina-EDTA y se lavaron dos veces con PBS. Luego, las células se tiñeron con 5 μ l de Anexina-V conjugada con FITC y 5 μ l de 7-AAD en 100 μ l de 1x tampón de unión Anexina-V durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las células se adquirieron en un citómetro de flujo BD LSR Fortessa (BD Biosciences, San José, EE.UU.).

4.5.5 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Para conocer los niveles de cualquier especie reactiva del oxígeno (ROS) producidos



por los eluatos de los diferentes adhesivos para dentaduras postizas, las células gingivales se resuspendieron en 1 ml de medio de crecimiento completo y se tiñeron con 5 μ M de CM-H2DCFDA (Invitrogen, Carlsbad) durante 30 minutos. a 37°C. Luego, las células gingivales se lavaron dos veces y se analizaron por citometría de flujo como se indicó anteriormente.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos obtenidos fueron analizados usando Graph-Pad Prism (versión 8.1.0 GraphPad Software). Los datos de los resultados fueron estudiados usando el método de análisis de la varianza (ANOVA) y el test de Tukey. Los resultados fueron considerados significativos cuando la $p \leq 0,05$ y todos los ensayos fueron realizados al menos tres veces.



5-RESULTADOS



5- RESULTADOS

5.1 ANÁLISIS DEL pH.

Después de 24 horas de incubación, todos los adhesivos para dentaduras postizas probados habían producido una reducción en el pH del medio de crecimiento, especialmente KPPD (***) a 48 horas, KPPD y KPD han causado una reducción drástica en el pH del medio (***) p <0,001), mientras que FD produce una ligera disminución en el pH (* p <0,05). Finalmente, después de 72 horas de incubación, el pH del medio que contiene CSS y CAT se encontró que era significativamente más bajo que el del grupo control (***) p <0,001), pero más alto (***) p <0,001) que el de KPPD y KPD (Figura 14).

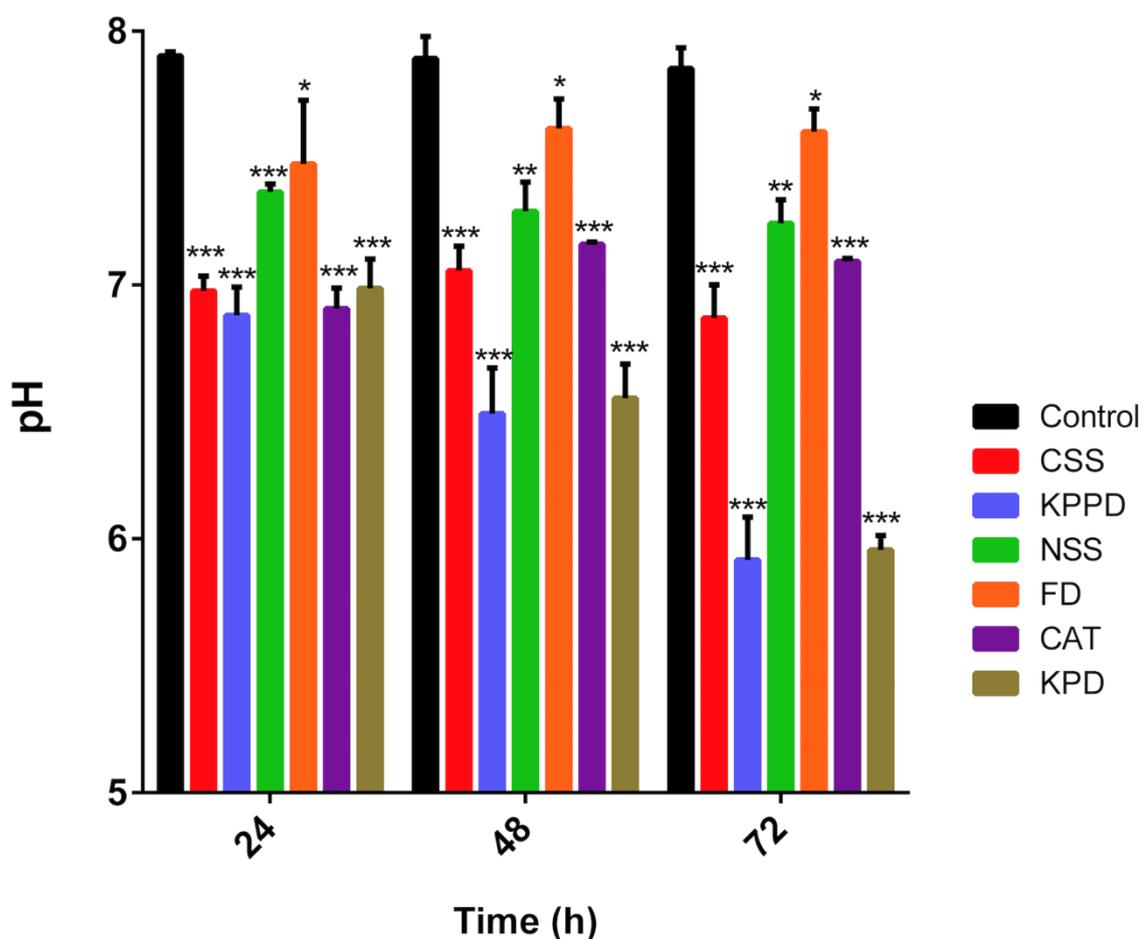


Figura 14. Análisis de pH



5.2 ESTUDIO DE DE VIABILIDAD CELULAR (MTT)

La actividad metabólica de las células expuestas a los extractos adhesivos se analizó a las 24, 48 y 72 horas y a diluciones 1:1, 1:2 y 1:4. Para KPPD y KPD se observó que la viabilidad celular disminuye significativamente en todas las diluciones (***) $p < 0,001$. La viabilidad celular con CSS fue significativamente más alta en todas las diluciones comparadas con el grupo control y el resto de adhesivos (***) $p < 0,001$. CAT también proporcionó mayor viabilidad celular que el grupo de control, excepto cuando no se diluyó a las 48 horas, pero los resultados con CAT fueron peores que los ensayos realizados con CSS en general. NSS obtuvo una viabilidad celular inferior que el grupo control, CSS y CAT, pero mejor que KPPD y KPD (Figuras 15- 17).

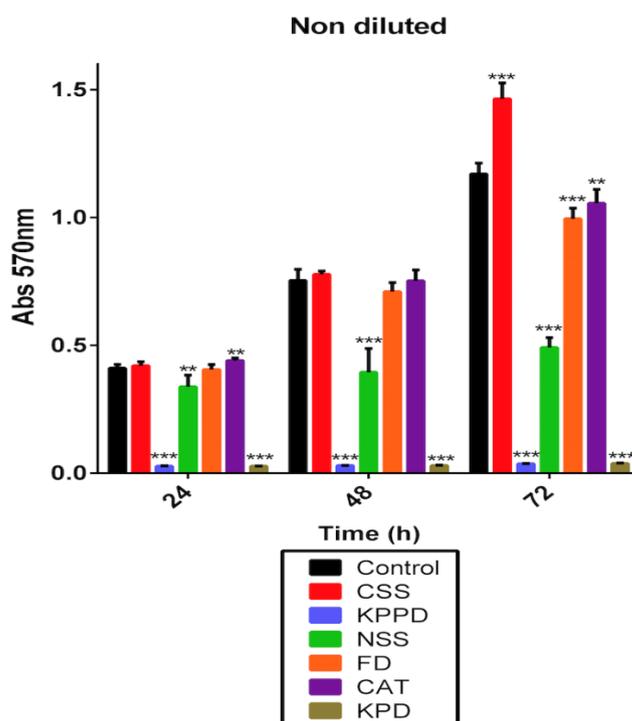


Figura 15. Viabilidad celular de los diferentes materiales aplicados sin diluir

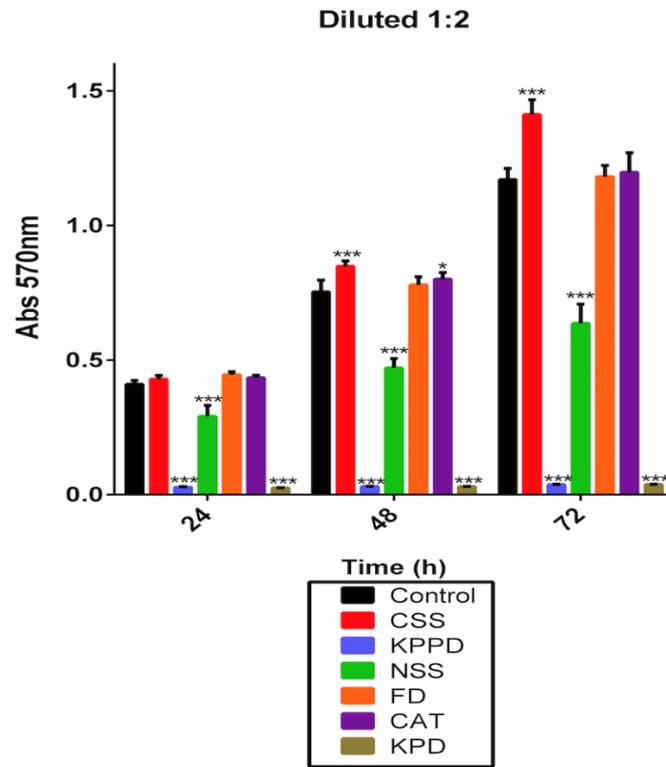


Figura 16. Viabilidad celular de los diferentes materiales aplicados a dilución 1:2

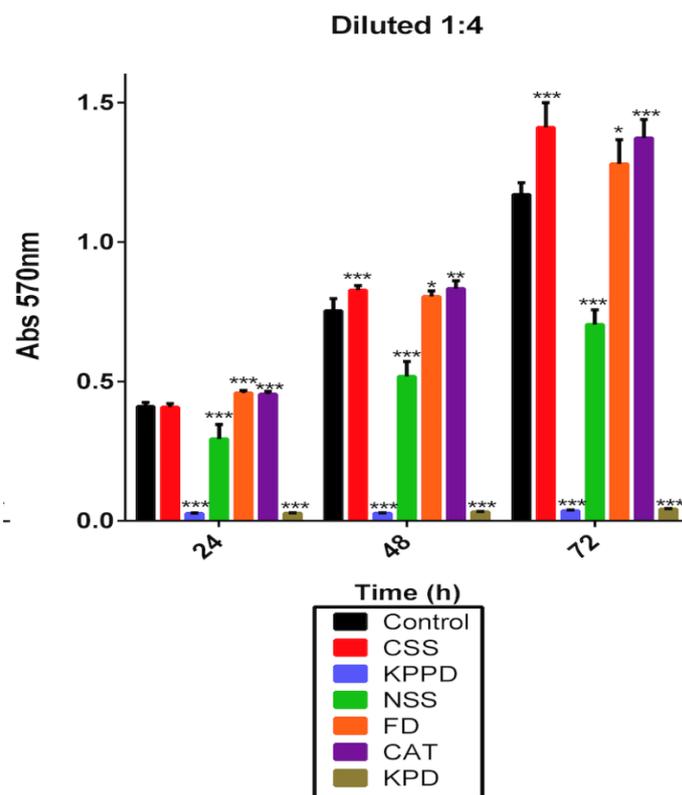


Figura 17. Viabilidad celular de los diferentes materiales aplicados a dilución 1:4

5.3 ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA CELULAR

Después de que los cultivos celulares fueran expuestos, durante 72 horas, a los diferentes extractos de los tipos de adhesivos, se observaron una gran cantidad de células bien adheridas mediante CSS, CAT y FD (Figura 18). Con NSS también se observaron algunas células pero en menor cantidad que con los extractos adhesivos anteriores. Cabe destacar que la presencia de células expuestas a KPPD y KPD fue mínima y que las pocas células que se observaron tenían una morfología irregular y núcleos picnóticos, indicativo del estado necrótico o apoptótico de las células gingivales.

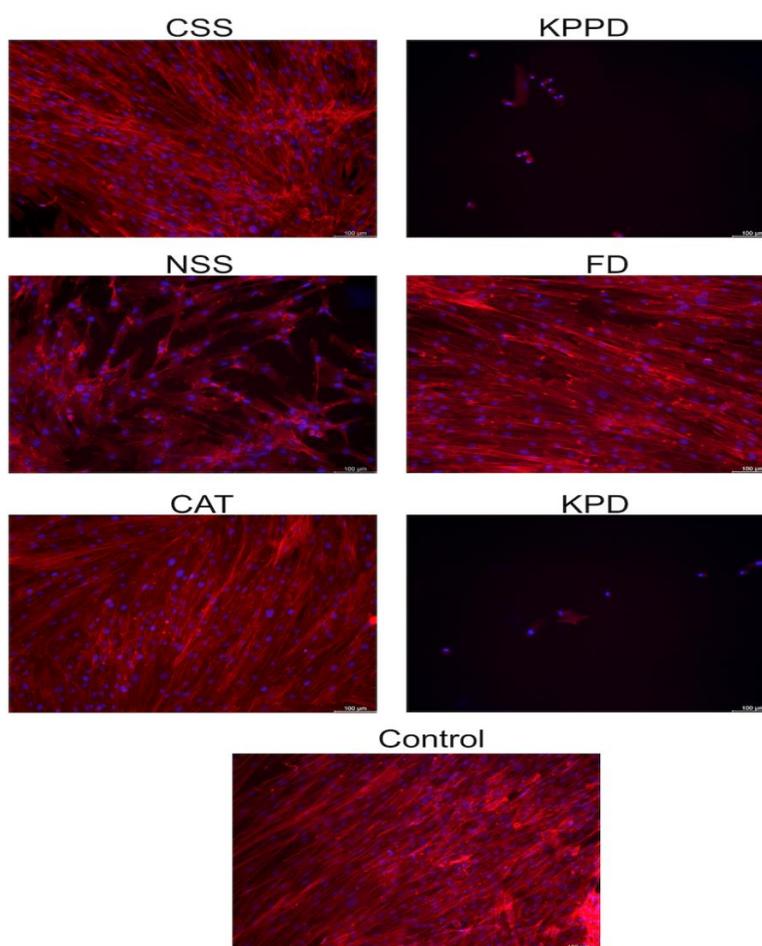


Figura 18. Morfología del citoesqueleto y núcleo de los fibroblastos gingivales a las 72 horas de cultivo en los seis tipos de adhesivos comerciales.

5.4- EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS/ NECROSIS CELULAR

Los fibroblastos gingivales se cultivaron sobre eluatos de los seis tipos diferentes de adhesivos comerciales, durante un período de 72 horas. Posteriormente, las células fueron marcadas con Anexina-5 y 7-AAD y analizadas mediante citometría de flujo.



Transcurridas las 72 horas, el número de células viables fue disminuyendo con un continuo incremento en la proporción de eluatos de KPD y KPP en los medios de cultivo (Figura 19). Una comparación entre los distintos grupos con extractos no diluidos proporcionó el siguiente resultado: FD > NSS > CAT = CSS > KPPD > KPD. Con dilución 1:2, el orden fue FD > CSS > NSS > CAT > KPPD > KPD. Y con dilución 1:4 fue: FD > CAT > NSS > CSS > KPPD > KPD.

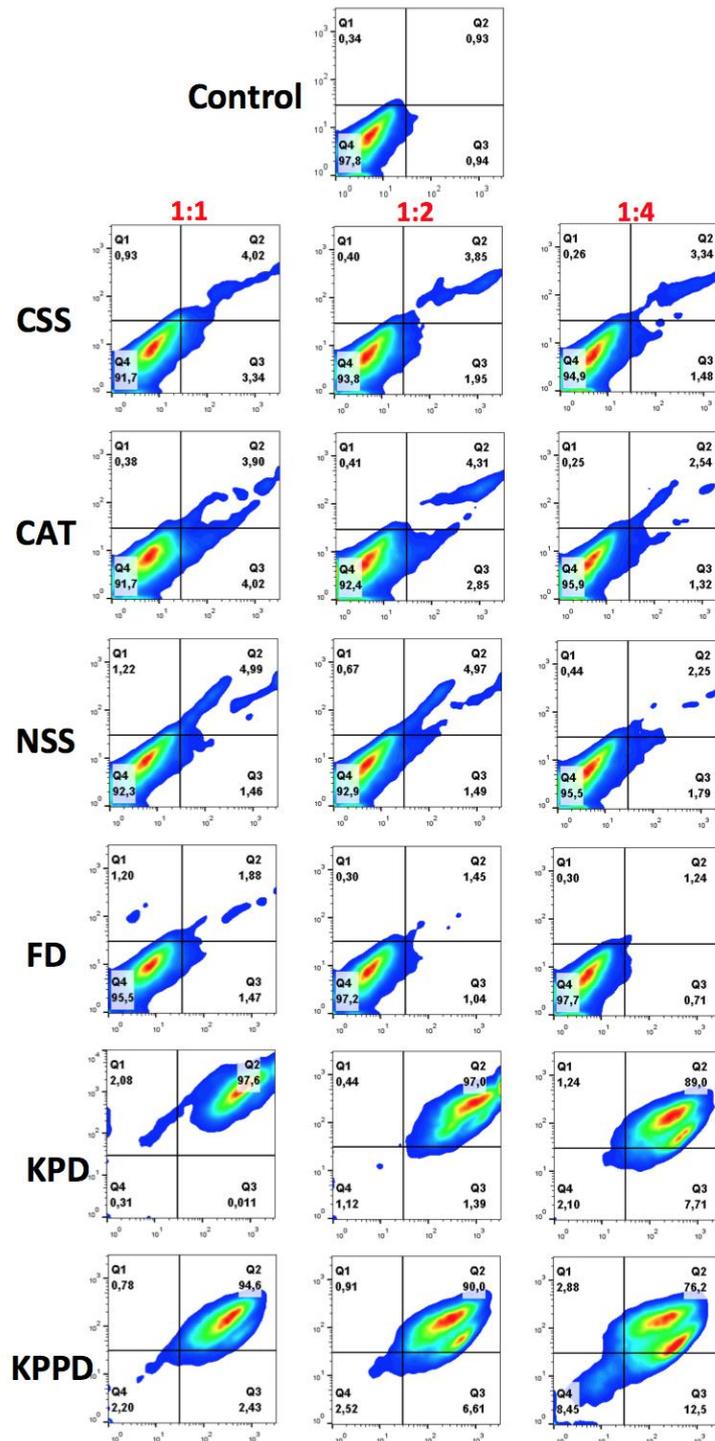


Figura 19: Proporción de células vivas, apoptosis temprana y tardía y células necróticas medidas mediante citometría de flujo



5.5 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS).

La producción intracelular de compuestos reactivos del oxígeno (ROS) inducidos por los diferentes adhesivos dentales fueron evaluados usando el test CM-H₂DCFDA. Como ilustra la Figura 20, la intensidad de fluorescencia obtenida en los grupos KPPD y KPD fue significativamente mayor que en la células control o células tratadas con otros adhesivos dentales (**p<0,001). Por el contrario, en el cultivo con CAT, los niveles de ROS intracelular detectados fueron similares a los del grupo control, excepto en una dilución 1:1 (*p<0,05).

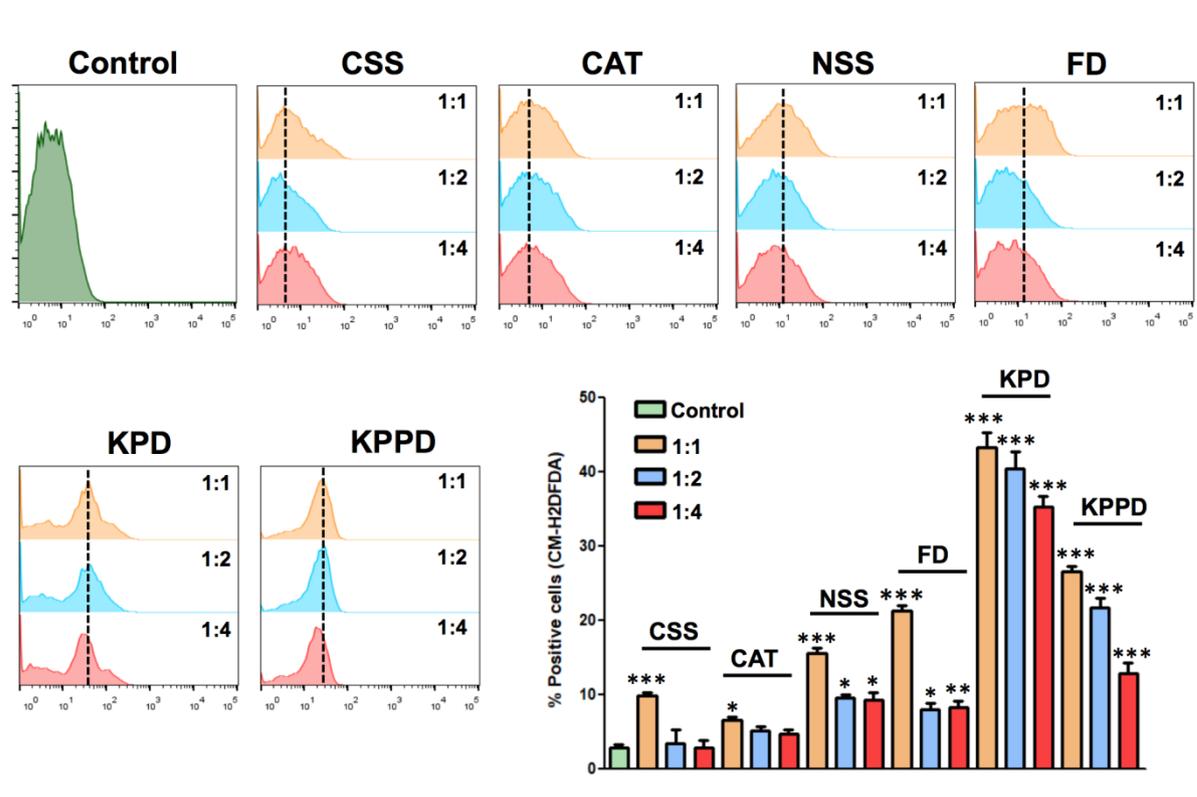


Figura 20: Análisis del test CM-H₂DCFDA para la producción intracelular de compuestos ROS inducidos por los adhesivos de estudio



6-DISCUSIÓN



6- DISCUSIÓN

Debido a una escasa evidencia científica y a la carencia de investigaciones sobre la citotoxicidad de los materiales odontológicos, se han podido cometer errores en el uso de estos. Existen pocos estudios que valoren la biocompatibilidad de los adhesivos de prótesis en la actualidad, ya que desde su aparición, las investigaciones han ido más enfocadas a estudiar sus propiedades químicas y mecánicas que sus propiedades biológicas. Este enfoque nos parece equivocado, ya que dichos productos van a estar en contacto directo con los tejidos bucales, pudiendo ser algunos de sus componentes tóxicos para la mucosa oral y pudiendo a su vez, provocar diferentes tipos de reacciones locales y/o sistémicas. Por ello, para este estudio decidimos usar fibroblastos gingivales humanos junto con seis adhesivos de prótesis de uso frecuente y fácil adquisición para así valorar estas propiedades biológicas que creemos tan importantes.

Aunque el objetivo primordial cuando el clínico realiza una prótesis removible es que el ajuste sea lo suficientemente bueno para que el portador de este tipo de dentaduras no necesite ningún tipo de producto extra para la retención de la prótesis, un gran número de pacientes terminan usando de forma rutinaria los adhesivos de prótesis, ya sea para obtener una mayor seguridad o por problemas de ajuste en la prótesis.

La cantidad de adhesivos en el mercado es inmensa, apareciendo cada pocos meses nuevos productos. Además, estos productos, aunque están en contacto con las mucosas y a veces pueden ser ingeridos sus restos accidentalmente, se pueden obtener sin receta médica y estar a disposición de cualquier paciente aunque no haya sido prescrito por un profesional, siendo ésta otra de las razones trascendentes por la cual se deben estudiar sus efectos biológicos.

6.1 Sobre la metodología

Los adhesivos para dentaduras postizas tipo crema no se mezclan fácilmente con el medio de cultivo. En estudios anteriores, las células se cultivaron directamente sobre los adhesivos para dentaduras postizas tipo crema en ensayos de citotoxicidad directa



y, en ensayos de citotoxicidad indirecta, los extractos de los adhesivos para dentaduras postizas se obtuvieron incubando el medio de cultivo y el adhesivo para prótesis juntos antes de agregar el cultivo celular de acuerdo con normas internacionales (76-78). En nuestro caso, también debido a la alta viscosidad de los materiales, se realizaron tres pasos de centrifugación (10 minutos a 4000 rpm) hasta que se obtuvo un extracto claro y no sólido. Posteriormente, los extractos se recogieron y diluyeron en medio de cultivo sin suero (1:1, 1:2 y 1:4). Al igual que en otros estudios, los extractos de los adhesivos para dentaduras postizas fueron homogeneizados y mezclados con el medio de cultivo para inmediatamente exponer los fibroblastos gingivales humanos sin un paso separado de extracción (79).

Este trabajo se basa en distintas pruebas de citotoxicidad *in vitro*, que son útiles para diferenciar los productos reactivos de aquellos que no lo son, discriminando, de este modo, los materiales que son biocompatibles. Es útil conocer si un ensayo de citotoxicidad es positivo, para conocer si un producto deber ser usado clínicamente o, al menos, tener precaución ante su utilización en pacientes, ya que esto implicaría que tiene algún componente nocivo. El objetivo de las pruebas de toxicidad es la simulación de las reacciones biológicas cuando los tejidos vivos se ponen en contacto con algún tipo de material, ofreciéndonos una manera de estudiar materiales novedosos que puedan salir al mercado, más barata y en la que no se utilizan animales de laboratorio (80).

El conjunto de pruebas para evaluar la biocompatibilidad de los productos se compone de los cultivos celulares, la experimentación animal y los estudios clínicos. Los métodos analíticos de última generación proponen, en primera instancia, los estudios *in vitro* para conocer los posibles efectos contraproducentes sobre las células (citotoxicidad y mutagenicidad). Los denominados estudios secundarios se realizan sobre animales pequeños en piel o mucosas, para detectar posibles efectos sistémicos puestos de manifiesto cuando dan lugar a irritación de los tejidos. Y como último paso, los materiales son aplicados sobre animales de la misma manera que se aplicarían sobre los humanos (81).



En estudios como el nuestro, son de obligado cumplimiento las normas internacionales sobre dispositivos médicos y sus efectos biológicos denominadas “Evaluación de la biocompatibilidad de los productos sanitarios utilizados en odontología” (ISO 10993:2009), haciendo hincapié en el apartado de preparación de muestras y materiales de referencia (ISO 10993-12:2009) (82) y al apartado de “Ensayos de citotoxicidad *in vitro*” (ISO 10993-5:2009)(73). El subapartado 12, “Ensayos para la preparación de muestras y materiales de referencia”, explica cómo debemos preparar los materiales, siendo su forma final la más aconsejada y se debe usar un control positivo y un control negativo. El subapartado 5 propone varias pruebas para valorar los efectos biológicos de los materiales utilizando cultivos de células de mamíferos como las de ratón o las humanas, en frascos de cultivo y utilizando medios de cultivo apropiados. Las pruebas estándar de citotoxicidad consisten en sembrar células de estos frascos donde crecen en monocapa, consiguen la confluencia y se ponen en contacto con los productos que se están probando. Con el método de elución, se hacen las diluciones pertinentes de los productos para ponerlas en contacto con las células. Tras los períodos designados, se observa si las células muestran cambios producidos por la toxicidad de los materiales tales como cambios de tamaño o apariencia, desarrollo de componentes celulares o pérdida de su integridad.

En nuestro trabajo se realizaron pruebas de biocompatibilidad *in vitro* de los adhesivos de prótesis sobre células humanas, en este caso fibroblastos, con el objetivo de confirmar que su uso fuera seguro en la práctica diaria. Las ventajas que este método nos ofrece son la simplicidad, la rapidez, la fiabilidad de los resultados y su buena relación coste/beneficio(83).

El tiempo de exposición de los adhesivos es importante en el diseño experimental, ya que afecta al nivel de citotoxicidad. En nuestro estudio las pruebas realizadas se hicieron a tiempos de 24, 48 y 72 horas, tal y como regulan las recomendaciones ISO. En el estudio de Lee y cols. (79) se llevó a cabo un tiempo de exposición de 48 horas y en otros estudios similares fue de 24 horas(78, 84, 85). Usando varios tiempos de exposición, pretendemos simular una situación real en la cual un paciente no sabe o no puede limpiar correctamente los restos de adhesivo de la prótesis y/o su boca, o no se



quita la prótesis para limpiarla durante varios días. El tiempo de uso de los adhesivos recomendado es de 12 a 16 horas (76), pero los pacientes a menudo los utilizan para un período de tiempo más prolongado, por lo que también realizamos la exposición a ellos a las 48 y 72 horas. Ante esto, las recomendaciones del odontólogo suelen ser que el paciente duerma sin la prótesis y la lave después de cada comida, pero la mayoría de los pacientes no siguen estos consejos, lo que puede llevar a tener en contacto demasiadas horas el producto sobre la mucosa oral.

6.2 Sobre el linaje celular

La encía se compone de tejido conectivo rodeado de tejido epitelial. Está altamente vascularizada e innervada y contiene gran variedad de células incluyendo células inmunitarias, colágeno y donde destacan los fibroblastos gingivales (86). Los fibroblastos gingivales son células mononucleares, no polarizadas y son las células más abundantes de todos los tejidos conjuntivos, representan entre 60% a 65%, es decir, alrededor de 200×10^6 células por cm^3 de dicho tejido. Estas células constituyen un elemento indispensable en las diversas propiedades de la encía. Son partícipes de la regulación de la embriogénesis, organogénesis y el desarrollo y, también de la homeostasis y remodelación de los tejidos (87).

Para la realización de nuestra investigación se decidió la utilización de fibroblastos gingivales humanos, ya que según algunos estudios, los resultados obtenidos varían considerablemente dependiendo del linaje celular. De este modo, nuestros resultados se acercarían lo máximo posible al ser humano, en comparación con el uso de líneas celulares de animales (77, 88, 89). Además, se han seleccionado los fibroblastos ya que son las células en íntimo contacto con los adhesivos de prótesis, cuando el paciente los usa, y por tanto son las que sufrirían una reacción biológica provocada por dicho contacto. Algunos autores como Perin y cols. (89) usaron células epiteliales como los queratinocitos orales para comprobar la citotoxicidad de los adhesivos de prótesis. de Gomes y cols.(77) usaron fibroblastos de ratón, y otros autores, como Soares y cols.(88) y Lee y cols. (79), en consonancia con nuestro estudio, utilizaron para ello los fibroblastos gingivales humanos.



6.3 Sobre el análisis del pH

Las características químicas que de los productos de uso médico se deben concretar y ser estudiadas dada su relevancia a nivel de la célula y a nivel cromosómico. Los materiales liberan moléculas hacia el espacio extracelular que pueden provocar cambios en el pH de este entorno. Como afirman algunos estudios, los bajos niveles de pH y una alta osmolaridad se asocian con una mayor citotoxicidad de algunos agentes quimioterapéuticos(90). Así, se pueden provocar cambios en los niveles de pH y esto dar lugar a daño celular a nivel cromosómico debido la incorporación de iones monovalentes al medio extracelular. Aunque esta situación puede minimizarse, obtener un pH neutro y reducir el contenido de iones que se liberan mediante un cambio en las condiciones derivadas del material utilizado (91). Debido a esto, debemos saber qué iones y en qué concentraciones se liberan. Para ello, realizamos pruebas de pH de los materiales para conocer si los productos usados liberan iones en condiciones de biocompatibilidad.

Nuestros resultados concluyen que los adhesivos a cualquier tiempo presentan un pH mayor a 5.5, concordando con los datos obtenidos por otros autores (64, 76). Según los resultados obtenidos en nuestro estudio, los adhesivos de prótesis provocan cambios en el pH. Algunos autores como Silva y cols.(92) y Rajaram y cols.(93) que afirman que estos cambios pueden ser los responsables de la citotoxicidad, coincidiendo un pH más ácido con una mayor citotoxicidad, como en el caso de los adhesivos KPPD y KPD de nuestro trabajo. Sin embargo, otros autores como Luczaj-Cepowicz y cols. (94) describieron que no existían diferencias en la citotoxicidad mostrada aunque hubiera cambios en el pH, aunque en el caso de su estudio todos los pH obtenidos fueron alcalinos aunque hubiera variaciones.

6.4 Sobre la viabilidad celular

Para el análisis de la viabilidad celular, es decir, para evaluar la citotoxicidad y la proliferación celular, encontramos varios métodos *in vitro*. La prueba ideal para ello debe tener una serie de características principales como: ser sensible y fiable, que se pueda realizar en un único paso, que sea segura y no tóxica para las células (95).



En nuestro caso, se utilizó el ensayo colorimétrico de sal de tetrazolio de MTT descrito por Mosmann en 1983 (96). Este método se basa en la reducción del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro, un colorante amarillo que es soluble en agua y que es reducido en células viables mediante los componentes de la cadena respiratoria a formazán (cristales azul violeta, insoluble en agua), fundamentalmente por la respiración (deshidrogenasas mitocondriales) y su flujo de electrones, lo cual es intrínsecamente tóxico para las células (97, 98). Otros autores como Collado-González (99) o Rodríguez-Lozano (100) usan en sus estudios el ensayo MTT.

En cuanto a nuestros resultados, demostraron unas diferencias significativas a las 72 horas entre CSS, CAT y el grupo de Kukident, teniendo el máximo en el grupo CSS, lo que concuerda con otros estudios realizados por de Gomes y cols. que analizaron diez adhesivos sobre fibroblastos de ratones, de entre ellos, cinco eran de tres de las marcas analizadas en nuestro estudio: Corega, Kukident y Novafix; el Kukident demostró ser el que mayor citotoxicidad provocaba con diferencias significativas, siendo el grupo Corega de los que mejores resultados obtenía, sin embargo, los resultados de Novafix difieren con los nuestros mostrando una menor afectación celular que en nuestro estudio (77). Perin y cols. realizaron un estudio en el que usaron tres adhesivos, todos de la marca Corega, y no encontraron toxicidad exponiéndolos a la línea celular humana NOK-SI, lo que concuerda también con nuestro estudio (89). Otro trabajo exponía fibroblastos humanos a cuatro adhesivos de prótesis, uno de ellos, Corega, sus resultados demostraron que era de los adhesivos que menor cantidad de apoptosis presentaba, así como de los más parecidos al control en la viabilidad celular analizada mediante MTT, lo que indican resultados parecidos a nuestro estudio (79).

En resumen, se observó mayor biocompatibilidad en los productos de Corega y sin embargo, los productos Kukident mostraron una menor biocompatibilidad, comparando tanto con el grupo control como con el resto de adhesivos. Aunque la identificación de los compuestos culpables de la toxicidad es muy difícil, debido a que la composición y concentración de los productos de los adhesivos rara vez están disponibles en detalle, tanto en nuestro estudio como en los de otros autores, parece ser que los adhesivos menos biocompatibles son aquellos que llevan en su composición sales de Zn^{2+} , como lo son los de Kukident (77). Se ha visto que las sales



de Zn^{2+} inducen efectos citotóxicos (77, 101-103) incluso superando al hierro, cobalto, cobre o manganeso en la misma concentración (77). Por este motivo, se cree que debería evitarse este elemento en la composición de los adhesivos de prótesis. Además, también se ha observado que puede conllevar un riesgo de desarrollar problemas neuronales (104, 105). Sin embargo, para poder afirmarlo, se deberían analizar estos mismos adhesivos sin Zn^{2+} en su composición, de esta forma podremos corroborar que es este componente el que produce este efecto citotóxico.

Todos los adhesivos para prótesis, en estudios previos y en el nuestro, muestran diversos grados de citotoxicidad sobre los fibroblastos gingivales humanos. Por ello, los odontólogos deberían aconsejar a sus pacientes que no abusen de estos en términos de cantidad y tiempo de duración de su aplicación.

6.5 Sobre el análisis morfológico

Los efectos sobre la morfología celular son dependientes de la dosis y se observan alteraciones de la organización del citoesqueleto de actina en la mayoría de adhesivos. La actina es una proteína estructural que está muy concentrada justo debajo de la membrana plasmática, estableciendo una capa organizada que controla la forma celular y el movimiento de la superficie, modulando los mecanismos celulares subyacentes a los eventos de proliferación y diferenciación. Así, las alteraciones citoesqueléticas como las observadas en presencia de los extractos de los adhesivos, pueden comprometer el crecimiento celular y la expresión del fenotipo, considerándose un importante signo de respuesta a la citotoxicidad (106). En el grupo control se muestran células bien diseminadas, con una morfología alargada, un citoesqueleto de actina bien desarrollado y un prominente núcleo. En los extractos preparados de los adhesivos, se muestran efectos deletéreos como condensación de material nuclear, una disminución significativa en el compartimento citoplasmático asociado con la contracción del citoesqueleto de actina, un redondeo de las células y una reducción del número de células adherentes (79).

Nuestros resultados coinciden con los de Lee y cols., que describen en su estudio sobre citotoxicidad de adhesivos que aquellos que presentaban una buena compatibilidad con fibroblastos presentan extensiones citoplasmáticas y núcleos redondeados,



mientras que aquellos que tenían mayor citotoxicidad se apreciaba una contracción de la membrana celular, así como menor cantidad de células adheridas (79). Este tipo de alteraciones citoplasmáticas se observa predominantemente en los adhesivos de la marca Kukident (77). Otras investigaciones han demostrado que, cuando los fibroblastos están expuestos a materiales dentales citotóxicos, hubo una disminución del volumen citoplasmático asociado con contracción del citoesqueleto de actina y se pudo observar una reducción de fibroblastos adherentes (77, 79, 107).

6.6 Sobre la apoptosis celular

El procedimiento para valorar la apoptosis celular, se llevó a cabo mediante la técnica de la citometría de flujo. Existen numerosos métodos que nos permiten evaluar la apoptosis, como podrían ser la inmunofluorescencia, la detección *in situ* mediante la técnica de TUNEL, el *western blot*, la electroforesis de ADN o la ya citada citometría de flujo (108). En nuestro estudio hemos usado este último método, ya que nos permite cuantificar mejor los valores obtenidos, además de que ya se ha usado en el ámbito odontológico por diversos autores con buenos resultados (83, 99, 109).

Dependiendo del tipo de adhesivo que tuvo contacto con los fibroblastos gingivales, los efectos sobre la inducción de apoptosis y/o necrosis fueron diferentes. En el caso de KPPD y KPD provocaron necrosis, y tras contacto con KPD en dilución 1:4 se sometieron a apoptosis. Existen estudios que han demostrado que aquellos adhesivos de prótesis con formaldehído o diazolidinilurea en su composición tienen una mayor cantidad de apoptosis (60, 79), aunque con respecto al contenido en zinc, no encontramos estudios sobre éste y su posible inducción de apoptosis y/o necrosis celular.

6.7 Sobre la formación de ROS

Estudios anteriores sugirieron que un alto nivel de producción de ROS altera la función celular e induce senescencia prematura en las células (110, 111). Por lo tanto, diferentes factores estresantes para las células o condiciones ambientales, pueden



inducir acumulación de ROS, lo que da lugar al acortamiento de los telómeros, causa daño en el ADN y se asocia con la muerte celular (112, 113). Algunos autores demuestran que, la exposición a diversos biomateriales usados en odontología aumenta la producción de especies reactivas del oxígeno (114). Nuestro estudio muestra que los productos Kukident promovieron la producción de ROS en células gingivales. La exposición a Zn^{2+} condujo a la disfunción mitocondrial, la inactivación de la glutatión reductasa y la estimulación de la producción de ROS(115) . Parece que la disminución en el número de células gingivales tras la exposición exógena al zinc se debió al Zn^{2+} disuelto en el medio de cultivo (116). Por lo tanto, los adhesivos para dentaduras postizas que contienen zinc, KPD,KPPD , exhibieron una citotoxicidad más alta que los adhesivos para dentaduras postizas que no contenían zinc en su composición.

6.8 Limitaciones del estudio

Este estudio presenta una serie de limitaciones. Podemos encontrar decenas de adhesivos diferentes en el mercado, así como nombres comerciales distintos dependiendo del país donde nos encontremos. Lo ideal sería poder tener muestras del máximo número de adhesivos diferentes para obtener unos resultados más consistentes y cerciorarnos, de esta manera, de nuestras hipótesis. Sin embargo, esto sería muy complicado por la gran cantidad de adhesivos que existen, así como por el elevado coste que supondría.

Los adhesivos con mayor toxicidad en nuestro estudio presentan en su composición el Zn^{2+} . Para comprobar que realmente este elemento es el causante de la toxicidad, lo apropiado sería poder obtener un adhesivo con la misma composición que estos pero sin la presencia del Zn^{2+} . De esta manera podríamos asegurarnos de si éste es el causante o no de la toxicidad.

En muchos estudios sobre citotoxicidad una de las pruebas que se realizan de manera rutinaria es la espectrometría dispersiva de rayos X (EDX), que sirve para conocer la composición de los materiales de estudio. Algunas casas comerciales son reticentes a



facilitar a los investigadores la composición completa de sus productos. Con este método podríamos comprobar exactamente la composición de los productos, que ésta se corresponda con la que afirma el fabricante y conocer si contienen o no elementos causantes de la toxicidad de los mismos.



7-CONCLUSIONES



7- CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que los adhesivos para dentaduras postizas que contienen zinc pueden inhibir la viabilidad celular, estimular la producción de ROS, provocar una morfología celular aberrante e inducir la apoptosis y la muerte celular.

1. El pH del entorno celular disminuye en presencia de todos los adhesivos de prótesis, sobre todo en los de la marca comercial Kukident (KPPD y KPD).
2. Con respecto a la viabilidad celular, el Corega Sin Sabor (CSS) es el que mejores resultados obtiene, siendo los productos Kukident (KPPD y KPD) los más citotóxicos.
3. En relación a la morfología de las células, aquellas sembradas sobre Corega Sin Sabor, Corega Acción Total y FiftyDent fue correcta y éstas estaban bien adheridas. Las células expuestas a KPPD y KPD eran mínimas y con morfología aberrante.
4. El adhesivo FixtyDent es el que menos apoptosis provoca, mientras que los que más lo hacen son KPPD y KPD.
5. Los adhesivos KPPD y KPD son los que inducen mayor cantidad de especies reactivas del oxígeno, siendo el adhesivo Corega Acción Total el que menos lo hace.



8-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



8- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kontis V, Bennett JE, Mathers CD, Li G, Foreman K, Ezzati M. Future life expectancy in 35 industrialised countries: projections with a Bayesian model ensemble. *Lancet*. 2017;389(10076):1323-35.
2. Christensen K, Doblhammer G, Rau R, Vaupel JW. Ageing populations: the challenges ahead. *Lancet*. 2009;374(9696):1196-208.
3. Roberto LL, Crespo TS, Monteiro-Junior RS, Martins A, De Paula AMB, Ferreira EF, et al. Sociodemographic determinants of edentulism in the elderly population: A systematic review and meta-analysis. *Gerodontology*. 2019;36(4):325-37.
4. Lee DJ, Saponaro PC. Management of Edentulous Patients. *Dent Clin North Am*. 2019;63(2):249-61.
5. Slade GD, Akinkugbe AA, Sanders AE. Projections of U.S. Edentulism prevalence following 5 decades of decline. *J Dent Res*. 2014;93(10):959-65.
6. Dye BA, Weatherspoon DJ, Lopez Mitnik G. Tooth loss among older adults according to poverty status in the United States from 1999 through 2004 and 2009 through 2014. *J Am Dent Assoc*. 2019;150(1):9-23.e3.
7. Karl M. Editorial: Complete dentures. *Quintessence Int*. 2019;50(7):509.
8. Puturidze S, Margvelashvili M, Bilder L, Kalandadze M, Margvelashvili V. RELATIONSHIP BETWEEN GENERAL HEALTH, ORAL HEALTH AND HEALTHY LIFESTYLE IN ELDERLY POPULATION (REVIEW). *Georgian Med News*. 2018(Issue):17-21.
9. Suominen AL, Varsio S, Helminen S, Nordblad A, Lahti S, Knuuttila M. Dental and periodontal health in Finnish adults in 2000 and 2011. *Acta Odontol Scand*. 2018;76(5):305-13.
10. Felton DA. Complete Edentulism and Comorbid Diseases: An Update. *J Prosthodont*. 2016;25(1):5-20.
11. Shaghaghian S, Taghva M, Abduo J, Bagheri R. Oral health-related quality of life of removable partial denture wearers and related factors. *J Oral Rehabil*. 2015;42(1):40-8.
12. Kim JJ. Revisiting the Removable Partial Denture. *Dent Clin North Am*. 2019;63(2):263-78.



13. Myint Oo KZ, Fueki K, Yoshida-Kohno E, Hayashi Y, Inamochi Y, Wakabayashi N. Minimal clinically important differences of oral health-related quality of life after removable partial denture treatments. *J Dent.* 2020;92:103246.
14. Kattadiyil MT, AlHelal A, Goodacre BJ. Clinical complications and quality assessments with computer-engineered complete dentures: A systematic review. *J Prosthet Dent.* 2017;117(6):721-8.
15. Critchlow SB, Ellis JS. Prognostic indicators for conventional complete denture therapy: a review of the literature. *J Dent.* 2010;38(1):2-9.
16. Tallgren A. The continuing reduction of the residual alveolar ridges in complete denture wearers: a mixed-longitudinal study covering 25 years. 1972. *J Prosthet Dent.* 2003;89(5):427-35.
17. Atwood DA, Coy WA. Clinical, cephalometric, and densitometric study of reduction of residual ridges. *J Prosthet Dent.* 1971;26(3):280-95.
18. Jahangiri L, Devlin H, Ting K, Nishimura I. Current perspectives in residual ridge remodeling and its clinical implications: a review. *J Prosthet Dent.* 1998;80(2):224-37.
19. Yang J, Farnell D, Devlin H, Horner K, Graham J. The effect of ovariectomy on mandibular cortical thickness in the rat. *J Dent.* 2005;33(2):123-9.
20. Carlsson GE. Clinical morbidity and sequelae of treatment with complete dentures. *J Prosthet Dent.* 1998;79(1):17-23.
21. Huddar DA, Hombesh MN, Sandhyarani B, Chandu GS, Nanjannawar GS, Shetty R. Effect of denture cleanser on weight, surface roughness and tensile bond strength of two resilient denture liners. *J Contemp Dent Pract.* 2012;13(5):607-11.
22. Mohammed HS, Singh S, Hari PA, Amarnath GS, Kundapur V, Pasha N, et al. Evaluate the Effect of Commercially Available Denture Cleansers on Surface Hardness and Roughness of Denture Liners at Various Time Intervals. *Int J Biomed Sci.* 2016;12(4):130-42.
23. Puri S, Kattadiyil MT, Puri N, Hall SL. Evaluation of correlations between frequencies of complete denture relines and serum levels of 3 bone metabolic markers: A cross-sectional pilot study. *J Prosthet Dent.* 2016;116(6):867-73.
24. Felton D, Cooper L, Duqum I, Minsley G, Guckes A, Haug S, et al. Evidence-based guidelines for the care and maintenance of complete dentures: a publication of the American College of Prosthodontists. *J Prosthodont.* 2011;20 Suppl 1:S1-s12.



25. Murray MD, Darvell BW. The evolution of the complete denture base. Theories of complete denture retention--a review. Part 1. Aust Dent J. 1993;38(3):216-9.
26. Srinivasan M, Gjengedal H, Cattani-Lorente M, Moussa M, Durual S, Schimmel M, et al. CAD/CAM milled complete removable dental prostheses: An in vitro evaluation of biocompatibility, mechanical properties, and surface roughness. Dent Mater J. 2018;37(4):526-33.
27. Saponaro PC, Yilmaz B, Johnston W, Heshmati RH, McGlumphy EA. Evaluation of patient experience and satisfaction with CAD-CAM-fabricated complete dentures: A retrospective survey study. J Prosthet Dent. 2016;116(4):524-8.
28. Kivovics P, Jáhn M, Borbély J, Márton K. Frequency and location of traumatic ulcerations following placement of complete dentures. Int J Prosthodont. 2007;20(4):397-401.
29. McLaughlin JB, Ramos V, Jr., Dickinson DP. Comparison of Fit of Dentures Fabricated by Traditional Techniques Versus CAD/CAM Technology. J Prosthodont. 2019;28(4):428-35.
30. Yilmaz B, Azak AN, Alp G, Ekşi H. Use of CAD-CAM technology for the fabrication of complete dentures: An alternative technique. J Prosthet Dent. 2017;118(2):140-3.
31. Goodacre BJ, Goodacre CJ, Baba NZ, Kattadiyil MT. Comparison of denture tooth movement between CAD-CAM and conventional fabrication techniques. J Prosthet Dent. 2018;119(1):108-15.
32. Steinmassl O, Dumfahrt H, Grunert I, Steinmassl PA. CAD/CAM produces dentures with improved fit. Clin Oral Investig. 2018;22(8):2829-35.
33. Wimmer T, Eichberger M, Lümekemann N, Stawarczyk B. Accuracy of digitally fabricated trial dentures. J Prosthet Dent. 2018;119(6):942-7.
34. Bidra AS, Farrell K, Burnham D, Dhingra A, Taylor TD, Kuo CL. Prospective cohort pilot study of 2-visit CAD/CAM monolithic complete dentures and implant-retained overdentures: Clinical and patient-centered outcomes. J Prosthet Dent. 2016;115(5):578-86.e1.
35. Carlsson GE. Implant and root supported overdentures - a literature review and some data on bone loss in edentulous jaws. J Adv Prosthodont. 2014;6(4):245-52.
36. Crum RJ, Rooney GE, Jr. Alveolar bone loss in overdentures: a 5-year study. J Prosthet Dent. 1978;40(6):610-3.



37. Schwartz IS, Morrow RM. Overdentures. Principles and procedures. Dent Clin North Am. 1996;40(1):169-94.
38. Bansal S, Aras MA, Chitre V. Tooth Supported Overdenture Retained with Custom Attachments: A Case Report. J Indian Prosthodont Soc. 142014. p. 283-6.
39. Ettinger RL, Qian F. Incidence of attachment loss of canines in an overdenture population. J Prosthet Dent. 2014;112(6):1356-63.
40. Carlsson GE. Responses of jawbone to pressure. Gerodontology. 2004;21(2):65-70.
41. Kordatzis K, Wright PS, Meijer HJ. Posterior mandibular residual ridge resorption in patients with conventional dentures and implant overdentures. Int J Oral Maxillofac Implants. 2003;18(3):447-52.
42. Kronstrom M, Carlsson GE. An International Survey among Prosthodontists of the Use of Mandibular Implant-Supported Dental Protheses. J Prosthodont. 2019;28(2):e622-e6.
43. MacEntee MI, Walton JN. The economics of complete dentures and implant-related services: a framework for analysis and preliminary outcomes. J Prosthet Dent. 1998;79(1):24-30.
44. Thomason JM, Feine J, Exley C, Moynihan P, Müller F, Naert I, et al. Mandibular two implant-supported overdentures as the first choice standard of care for edentulous patients--the York Consensus Statement. Br Dent J. 2009;207(4):185-6.
45. Bhargava A, Sehgal M, Gupta S, Mehra P. Classification system on the selection of number of implants and superstructure design on the basis available vertical restorative space and interforaminal distance for implant supported mandibular overdenture. J Indian Prosthodont Soc. 2016;16(2):131-5.
46. Rodríguez C, Rico L, Evans O, Pradies G. Adhesives for complete dentures: present situation. 2007;12:273-82.
47. Kossioni AE. Prevalence and Factors Associated with the Use of Denture Adhesives by Older Complete Denture Wearers. Eur J Prosthodont Restor Dent. 2018;26(4):197-201.
48. Pradíes G, Sanz I, Evans O, Martnez F, Sanz M. Clinical study comparing the efficacy of two denture adhesives in complete denture patients. Int J Prosthodont. 2009;22(4):361-7.



49. Nicolas E, Veyrune JL, Lassauzay C. A six-month assessment of oral health-related quality of life of complete denture wearers using denture adhesive: a pilot study. *J Prosthodont.* 2010;19(6):443-8.
50. Papadiochou S, Emmanouil I, Papadiochos I. Denture adhesives: a systematic review. *J Prosthet Dent.* 2015;113(5):391-7.e2.
51. Grasso JE. Denture adhesives. *Dent Clin North Am.* 2004;48(3):721-33, vii.
52. Okazaki H, Yoshida K, Egoshi T, Takase K, Murata H. Influence of composition and powder/water ratio on adhesion strength and initial viscosity of powder-type denture adhesives based on CMC-Na and PVM-MA. *Dent Mater J.* 2019;38(6):994-1001.
53. Bartlett DW, Maggio B, Targett D, Fenlon MR, Thomas J. A preliminary investigation into the use of denture adhesives combined with dietary advice to improve diets in complete denture wearers. *J Dent.* 2013;41(2):143-7.
54. Ellis B, Al-Nakash S, Lamb DJ. The composition and rheology of denture adhesives. *J Dent.* 1980;8(2):109-18.
55. Han JM, Hong G, Hayashida K, Maeda T, Murata H, Sasaki K. Influence of composition on the adhesive strength and initial viscosity of denture adhesives. *Dent Mater J.* 2014;33(1):98-103.
56. Munoz CA, Gendreau L, Shanga G, Magnuszewski T, Fernandez P, Durocher J. A clinical study to evaluate denture adhesive use in well-fitting dentures. *J Prosthodont.* 2012;21(2):123-9.
57. Kulak Y, Ozcan M, Arikan A. Subjective assessment by patients of the efficiency of two denture adhesive pastes. *J Prosthodont.* 2005;14(4):248-52.
58. Torres-Sánchez C, Montoya-Salazar V, Torres-Lagares D, Gutierrez-Pérez JL, Jimenez-Castellanos E. Satisfaction in complete denture wearers with and without adhesives: A randomized, crossover, double-blind clinical trial. *J Clin Exp Dent.* 2018;10(6):e585-e90.
59. Salinas TJ. Treatment of edentulism: optimizing outcomes with tissue management and impression techniques. *J Prosthodont.* 2009;18(2):97-105.
60. Bogucki ZA. Clinical aspects of the use of dental adhesive materials in patients with chronic xerostomia. *Gerodontology.* 2013;30(2):162-6.
61. Folse GJ. Denture adhesives: when, why, and how. *Dent Today.* 2004;23(12):70-1.



62. Ekstrand K, Hensten-Pettersen A, Kullmann A. Denture adhesives: cytotoxicity, microbial contamination, and formaldehyde content. *J Prosthet Dent.* 1993;69(3):314-7.
63. Nomura T, Murakami T, Shimoyama Y, Kobayashi T, Furuya J, Sasaki M, et al. Effects of denture adhesives on growth and morphological transformation of *Candida albicans*. *J Prosthodont Res.* 2020;64(1):78-84.
64. Chen F, Mao T, Cheng X. pH and effects on *Streptococcus mutans* growth of denture adhesives: an in vitro study. *Gerodontology.* 2014;31(2):95-100.
65. Soares A, Scelza MZ, Spoladore J, Gallito MA, Oliveira F, Moraes RCM, et al. Comparison of primary human gingival fibroblasts from an older and a young donor on the evaluation of cytotoxicity of denture adhesives. *J Appl Oral Sci.* 2018;26:e20160594.
66. Lv J, Liu Y, Jia S, Zhang Y, Tian H, Li J, et al. Carbon Monoxide-Releasing Molecule-3 Suppresses Tumor Necrosis Factor- α - and Interleukin-1 β -Induced Expression of Junctional Molecules on Human Gingival Fibroblasts via the Heme Oxygenase-1 Pathway. *Mediators Inflamm.* 2020;2020:6302391.
67. Kamadjaja MJK, Abraham JF, Laksono H. Biocompatibility of *Portunus Pelagicus* Hydroxyapatite Graft on Human Gingival Fibroblast Cell Culture. *Med Arch.* 2019;73(6):378-81.
68. Peters OA. Research that matters - biocompatibility and cytotoxicity screening. *Int Endod J.* 2013;46(3):195-7.
69. Murray PE, García Godoy C, García Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007;12(3):E258-66.
70. Tronstad L, Wennberg A. In vitro assessment of the toxicity of filling materials. *Int Endod J.* 1980;13(3):131-8.
71. Gibb S. Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy. *Reprod Toxicol.* 2008;25(1):136-8.
72. Yang SY, Kang MK. Biocompatibility and Antimicrobial Activity of *Reynoutria elliptica* Extract for Dental Application. *Plants (Basel).* 2020;9(6).
73. Standardization. IOF. 10993-5. Biological Evaluation of Medical Devices-Part 5: Test for in vitro cytotoxicity. 2009.
74. López-García S, Pecci-Lloret MP, Pecci-Lloret MR, Oñate-Sánchez RE, García-Bernal D, Castelo-Baz P, et al. In Vitro Evaluation of the Biological Effects of ACTIVA



Kids BioACTIVE Restorative, Ionolux, and Riva Light Cure on Human Dental Pulp Stem Cells. *Materials (Basel)*. 2019;12(22).

75. Tomás-Catalá CJ, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Forner L, Llena C, et al. Biocompatibility of New Pulp-capping Materials NeoMTA Plus, MTA Repair HP, and Biodentine on Human Dental Pulp Stem Cells. *J Endod*. 2018;44(1):126-32.

76. Zhao K, Cheng XR, Chao YL, Li ZA, Han GL. Laboratory evaluation of a new denture adhesive. *Dent Mater*. 2004;20(5):419-24.

77. de Gomes PS, Figueiral MH, Fernandes MH, Scully C. Cytotoxicity of denture adhesives. *Clin Oral Investig*. 2011;15(6):885-93.

78. Al RH, Dahl JE, Morisbak E, Polyzois GL. Irritation and cytotoxic potential of denture adhesives. *Gerodontology*. 2005;22(3):177-83.

79. Lee Y, Ahn J-S, Yi Y-A, Chung S-H, Yoo Y-J, Ju S-W, et al. Cytotoxicity of four denture adhesives on human gingival fibroblast cells. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2015;73(2):87-92.

80. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater*. 1996;12(3):186-93.

81. Schmalz G, Widbiller M, Galler KM. Material Tissue Interaction--From Toxicity to Tissue Regeneration. *Oper Dent*. 2016;41(2):117-31.

82. Standardization. IOF. 10993-12. Biological evaluation of Medical Devices—Part 12: Sample Preparation and Reference Materials. 2007.

83. Rodríguez-Lozano FJ, Serrano-Belmonte I, Pérez Calvo JC, Coronado-Parra MT, Bernabeu-Esclapez A, Moraleta JM. Effects of two low-shrinkage composites on dental stem cells (viability, cell damaged or apoptosis and mesenchymal markers expression). *J Mater Sci Mater Med*. 2013;24(4):979-88.

84. Tello CG, Ford P, Iacopino AM. In vitro evaluation of complex carbohydrate denture adhesive formulations. *Quintessence Int*. 1998;29(9):585-93.

85. DeVengencie J, Ng MC, Ford P, Iacopino AM. In vitro evaluation of denture adhesives: possible efficacy of complex carbohydrates. *Int J Prosthodont*. 1997;10(1):61-72.

86. Peng L, Ye L, Zhou XD. Mesenchymal stem cells and tooth engineering. *Int J Oral Sci*. 2009;1(1):6-12.



87. Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, Dazzi F. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica*. 2009;94(2):258-63.
88. Soares ASLS, Scelza MZ, Spoladore J, Gallito MA, Oliveira F, Moraes RdCM, et al. Comparison of primary human gingival fibroblasts from an older and a young donor on the evaluation of cytotoxicity of denture adhesives. *Journal of applied oral science: revista FOB*. 2018;26:e20160594.
89. Perin Leite AR, de Oliveira Júnior NM, Mendoza Marin DO, Compagnoni MA, Pero AC. Proinflammatory cytokine production from NOK-SI keratinocytes after exposure to denture adhesives. *J Prosthet Dent*. 2018;119(3):404-8.
90. Hahn GM, Shiu EC. Effect of pH and elevated temperatures on the cytotoxicity of some chemotherapeutic agents on Chinese hamster cells in vitro. *Cancer Res*. 1983;43(12 Pt 1):5789-91.
91. Brusick D. Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environ Mutagen*. 1986;8(6):879-86.
92. Silva EJ, Rosa TP, Herrera DR, Jacinto RC, Gomes BP, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. *J Endod*. 2013;39(2):274-7.
93. Rajaram A, Manoj SS. Influence of 3 different forms of a commercially available denture adhesive material on the growth of *Candida* species: An in vitro study. *J Prosthet Dent*. 2017;118(3):379-85.
94. Luczaj-Cepowicz E, Marczuk-Kolada G, Pawinska M, Obidzinska M, Holownia A. Evaluation of cytotoxicity and pH changes generated by various dental pulp capping materials - an in vitro study. *Folia Histochem Cytobiol*. 2017;55(2):86-93.
95. Czekanska EM. Assessment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye. *Methods Mol Biol*. 2011;740:27-32.
96. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
97. Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods*. 1986;94(1-2):57-63.
98. Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J Immunol Methods*. 1990;131(2):165-72.



99. Collado-Gonzalez M, Pecci-Lloret MR, Tomas-Catala CJ, Garcia-Bernal D, Onate-Sanchez RE, Llena C, et al. Thermo-setting glass ionomer cements promote variable biological responses of human dental pulp stem cells. *Dent Mater.* 2018;34(6):932-43.
100. Rodríguez-Lozano FJ, Collado-González M, López-García S, García-Bernal D, Moraleda JM, Lozano A, et al. Evaluation of changes in ion release and biological properties of NeoMTA-Plus and Endocem-MTA exposed to an acidic environment. *Int Endod J.* 2019;52(8):1196-209.
101. Pires CW, Botton G, Cadoná FC, Machado AK, Azzolin VF, da Cruz IB, et al. Induction of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity by root filling pastes used in primary teeth. *Int Endod J.* 2016;49(8):737-45.
102. de Oliveira Mendes ST, Ribeiro Sobrinho AP, de Carvalho AT, de Souza Côrtes MI, Vieira LQ. In vitro evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. *J Endod.* 2003;29(2):95-9.
103. Lee JH, Lee HH, Kim HW, Yu JW, Kim KN, Kim KM. Immunomodulatory/anti-inflammatory effect of ZOE-based dental materials. *Dent Mater.* 2017;33(1):e1-e12.
104. Schmalz G, Arenholt-Bindslev D, Hiller KA, Schweikl H. Epithelium-fibroblast co-culture for assessing mucosal irritancy of metals used in dentistry. *Eur J Oral Sci.* 1997;105(1):86-91.
105. Yamamoto A, Honma R, Sumita M. Cytotoxicity evaluation of 43 metal salts using murine fibroblasts and osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res.* 1998;39(2):331-40.
106. Stamenović D. Effects of cytoskeletal prestress on cell rheological behavior. *Acta Biomater.* 2005;1(3):255-62.
107. Asgary S, Moosavi SH, Yadegari Z, Shahriari S. Cytotoxic effect of MTA and CEM cement in human gingival fibroblast cells. Scanning electronic microscope evaluation. *N Y State Dent J.* 2012;78(2):51-4.
108. Meehan TL, Yalonetskaya A, Joudi TF, McCall K. Detection of Cell Death and Phagocytosis in the Drosophila Ovary. *Methods Mol Biol.* 2015;1328:191-206.
109. Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Ortolani-Seltenerich PS, Álvarez-Muro T, Lozano A, et al. Cytotoxicity and bioactivity of various pulpotomy materials on stem cells from human exfoliated primary teeth. *Int Endod J.* 2017;50 Suppl 2:e19-e30.



110. Yoshino F, Yoshida A, Okada E, Okada Y, Maehata Y, Miyamoto C, et al. Dental resin curing blue light induced oxidative stress with reactive oxygen species production. *J Photochem Photobiol B*. 2012;114:73-8.
111. Kang W, Jia Z, Tang D, Zhang Z, Gao H, He K, et al. *Fusobacterium nucleatum* Facilitates Apoptosis, ROS Generation, and Inflammatory Cytokine Production by Activating AKT/MAPK and NF- κ B Signaling Pathways in Human Gingival Fibroblasts. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:1681972.
112. Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res*. 2006;85(10):870-7.
113. Hou J, Han ZP, Jing YY, Yang X, Zhang SS, Sun K, et al. Autophagy prevents irradiation injury and maintains stemness through decreasing ROS generation in mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis*. 2013;4(10):e844.
114. Llena C, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Martínez CM, Moraleda JM, et al. Comparison of diffusion, cytotoxicity and tissue inflammatory reactions of four commercial bleaching products against human dental pulp stem cells. *Sci Rep*. 2019;9(1):7743.
115. San Miguel SM, Opperman LA, Allen EP, Zielinski JE, Svoboda KK. Antioxidant combinations protect oral fibroblasts against metal-induced toxicity. *Arch Oral Biol*. 2013;58(3):299-310.
116. Deng X, Luan Q, Chen W, Wang Y, Wu M, Zhang H, et al. Nanosized zinc oxide particles induce neural stem cell apoptosis. *Nanotechnology*. 2009;20(11):115101.



9-ANEXOS



ANEXO I

HOJA EXPLICATIVA AL PARTICIPANTE

Proyecto de Investigación titulado: “Estudio in vitro de la citotoxicidad de seis adhesivos de prótesis sobre fibroblastos humanos”

Investigadores principales: D. María Andrea García Guirao, Dr. Francisco Javier Rodríguez Lozano.

Promotor: Servicio de Doctorado en Integración y Modulación de Señales en Biomedicina (Universidad de Murcia).

Se solicita su participación en este proyecto de investigación, cuyo objetivo principal es profundizar en el conocimiento de la biocompatibilidad de adhesivos de prótesis

En este estudio participa el servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca y el Laboratorio de Investigación Biosanitaria (LAIB) de la Universidad de Murcia

Se estima que participen un total de 10 pacientes de dicho servicio hospitalario.

Su participación en este estudio no implica que obtenga un beneficio económico. Sin embargo, la identificación de posibles factores citotóxicos relacionados con la utilización de estos cementos podría beneficiar el curso de la terapia protésica a nivel clínico. Su participación en el estudio es totalmente voluntaria, y si usted decide no participar recibirá todos los cuidados médicos que usted precise y la relación con el equipo médico que le atiende no va a verse afectada.

Si usted decide participar, se le realizará una historia clínica breve y la exodoncia de un/varios cordal/es programada por su dentista/facultativo y se extraerá el tejido gingival circundante a la/las pieza/as exodonciada/as para obtener las muestras de células gingivales. La toma de muestras no supone ningún riesgo para su salud ya que se realiza en un laboratorio de manera *in vitro* a partir de los cordales ya exodonciados.

Se le pedirá su consentimiento para que con sus cordales exodonciados se hagan 2 cosas:

1. Que acepte que se obtengan células gingivales a partir de los tejidos circundantes a sus cordales para la realización de este estudio.
2. Que autorice al investigador a almacenar su muestra para la realización de otros estudios similares al presente, con técnicas similares y con los mismos u otros productos que se desarrollen en el futuro. Si usted acepta autorizar este almacenamiento, se eliminarán de la muestra todos los vínculos con su identidad, antes de guardarla, y no será posible llegar a conocer su identidad a partir de ella.

Usted debe otorgar su consentimiento informado por escrito.



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto de Investigación titulado: “Estudio in vitro de la citotoxicidad de seis adhesivos de prótesis sobre fibroblastos humanos”

Investigadores principales: D. María Andrea García Guirao, Dr. Francisco Javier Rodríguez Lozano

Promotor: Servicio de Doctorado en Integración y Modulación de Señales en Biomedicina (Universidad de Murcia).

1. Yo.....
declaro bajo mi responsabilidad que he leído la hoja de información sobre el estudio y acepto participar en este estudio.

2. Se me ha entregado una copia de la hoja de información al paciente y una copia de este consentimiento informado, fechado y firmado. Se me han explicado las características y el objetivo del estudio y los posibles beneficios y riesgos que puedo esperar. Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas. Todas las preguntas fueron respondidas a mi entera satisfacción.

3. Sé que se mantendrá en secreto mi identidad y que se identificará mi/s cordal/es con un número codificado.

4. Soy libre de retirarme del estudio en cualquier momento por cualquier motivo, sin tener que dar explicación y sin que repercuta negativamente sobre mi tratamiento médico futuro. Tras ello se procederá a la destrucción de la muestra codificada. Si se hubiera retirado previamente el vínculo de identificación de la muestra, no se podrá relacionar conmigo, de forma que no se podrá destruir.

5. Entiendo que el objetivo del estudio es evaluar la biocompatibilidad de células gingivales humanas frente a adhesivos de prótesis y que los resultados del mismo no se comunicarán ni a mí ni a mi médico, excepto en el caso de que dichos hallazgos tengan alguna implicación significativa para la salud de los participantes.

Consiento en participar voluntariamente en este estudio.

Fecha:

Firma del
paciente:.....
.....

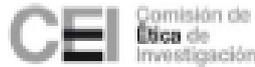
Constato que he explicado las características y el objetivo del estudio y sus apartados y los riesgos y beneficios potenciales al sujeto cuyo nombre aparece escrito más arriba. El sujeto consiente en participar por medio de su firma fechada en persona.

Fecha:

Firma del facultativo: D. María Andrea García Guirao



ANEXO II



INFORME DE LA COMISIÓN DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

Jaime Peris Riera, Catedrático de Universidad y Secretario de la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia,

CERTIFICA:

Que D. Francisco Javier Rodríguez Lozano ha presentado el Proyecto de Investigación titulado "Comparación de células madre de ligamento y pulpa dental de pacientes con síndromes genéticos y pacientes sanos", a la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia.

Que dicha Comisión analizó toda la documentación presentada, y de conformidad con lo acordado el día seis de marzo de dos mil diecinueve¹, por unanimidad, se emite INFORME FAVORABLE, desde el punto de vista ético de la Investigación.

Y para que conste y tenga los efectos que correspondían firmo esta certificación con el visto bueno del Presidente de la Comisión.

Vº Bº
EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN
DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE LA
UNIVERSIDAD DE MURCIA

Fdo.: Francisco Esquembre Martínez

ID: 21992018

¹A los efectos de lo establecido en el art. 19.5 de la Ley 40/2015 de 1 de octubre de Régimen Jurídico del Sector Público (B.O.E. 02-10), se advierte que el acta de la sesión citada está pendiente de aprobación



Código seguro de verificación: 8DxPM102-vNR0015-x0Rt-SPoI-ByEaTHGE

0018 ELECTRONICA... Página 1 de 1

Este es una copia electrónica legítima de un documento administrativo emitido por la Universidad de Murcia, según el artículo 19.5 de la Ley 40/2015, de 1 de octubre, de Régimen Jurídico del Sector Público, en cumplimiento de lo establecido en el artículo 40.1 de la Ley 39/2015, de 30 de septiembre, de Procedimiento Administrativo Común de los organismos de la Administración General del Estado, y sus normas aplicables.