



## UNIVERSIDAD DE MURCIA

*DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGÍA, ESTOMATOLOGÍA, RADIOLOGÍA Y MEDICINA  
FÍSICA.*

# **ESTUDIO DE BIOCOMPATIBILIDAD DE DOS COMPOSITOS DE BAJA CONTRACCIÓN SOBRE CÉLULAS MADRE DE ORIGEN DENTAL.**

**D.JUAN FRANCISCO MARTÍNEZ-LAGE AZORIN**





***Agradecimientos:** A mis padres por ser siempre una luz en mi camino, por su incondicional apoyo, por ser un ejemplo a seguir. A mi familia. A Mar, por su tiempo, por su ayuda con el experimento y por enseñarme tanto. Al Dr. Maurandi por el apoyo estadístico. A mis directores por su inquebrantable paciencia. A Fran por no perder nunca la fe. A mi hijo Juan, que me regala todos los días un poquito más de vida, por ser la mayor y mejor de las aventuras.*



**Estudio de biocompatibilidad de dos composites de baja contracción sobre células madre de origen dental.**



# INDICE

## Introducción.

1. Breve historia de los materiales dentales.....	10
2. Evolución de las resinas compuestas para restauraciones directas.....	19
3. Las resinas compuestas.....	20
3.1 <i>Composición de las resinas compuestas para restauraciones</i> .....	22
3.2 <i>Clasificación de las resinas compuestas</i> .....	30
3.3 <i>Otras resinas compuestas</i> .....	37
3.4 <i>Propiedades de las resinas compuestas</i> .....	43
3.5 <i>Variaciones de las resinas compuestas</i> .....	51
4. Conceptos de citotoxicidad y biocompatibilidad.....	54
5. Evolución de los cultivos celulares.....	58
6. Células madre derivadas de tejidos orofaciales.....	65

## Objetivos.

- <i>Objetivos generales</i> .....	71
- <i>Objetivos específicos</i> .....	71

## Material y métodos.

7. Composites.....	73
8. Aislamiento celular.....	75
8.1 <i>Extracción del Ligamento Periodontal Humano (hPDL) y pulpa dental humana (hDP)</i> .....	75
8.2 <i>Disgregación enzimática</i> .....	76
8.3 <i>Disgregación mecánica</i> .....	77
9. Recuento y estimación de la viabilidad celular.....	77
10. Cultivo de células del ligamento periodontal y la pulpa dental.....	79
11. Caracterización inmunofenotípica de las DPSCs y PDLSCs.....	81



12. Preparación de las muestras.....	83
13. Ensayo MTT.....	85
14. Ensayo de apoptosis o muerte celular.....	87
15. Método estadístico.....	89
<b>Resultados.</b>	
16.- Aislamiento celular de DPSCs y PDLSCs.....	91
17.- Caracterización inmunofenotípica de las DPSCs y PDLSCs.....	92
18.-Análisis de la viabilidad celular.....	92
19.-Apoptosis o muerte celular.....	103
20.- Estabilidad del fenotipo tras la exposición a SDR y VENUS.....	105
<b>Discusión.</b>	
- <i>Idoneidad del ensayo in vitro</i> .....	108
- <i>Materiales usados en el estudio</i> .....	112
- <i>Investigaciones previas con los materiales bulk fill</i> .....	117
- <i>Limitaciones del estudio</i> .....	119
<b>Conclusiones.</b>	
Conclusiones.....	122
<b>Bibliografía.</b>	
Bibliografía.....	124
<b>Anexos.</b>	
Anexos.....	145



# INTRODUCCIÓN



# INTRODUCCIÓN

La caries dental es una entidad patológica que afecta a un porcentaje elevado de la población y junto con la enfermedad periodontal, constituyen las las principales causas de pérdida de piezas dentales. Se trata de un problema que afecta a la humanidad desde hace miles de años. Existen documentos que muestran que desde los tiempos de las primeras dinastías del Antiguo Egipto, ya se trataban de subsanar las caries con procedimientos primitivos y más o menos acertados, pero que demuestran el impacto tan importante que estas enfermedades han supuesto para la salud, ya desde tiempos muy remotos. El avance incontrolado de la caries, como bien sabemos, suele asociarse a cuadros variables de un dolor que podría llegar a ser incapacitante. Encontrar a pacientes que precisan de un tratamiento urgente por sufrir un dolor insoportable es, de hecho, parte del día a día en las consultas dentales. Además, cuadros incontrolados de lesiones no tratadas o mal tratadas pueden llevar a situaciones verdaderamente graves con infecciones mal definidas, cursando con celulitis y abscesos que podrían tener graves consecuencias debido a la situación de la cavidad oral, en una zona de gran inervación y cercana a estructuras de vital importancia, como el cerebro. Es lógico que de este modo, los intentos de solventar estos problemas, ya sea en manos del chamán de la tribu o de los mejores médicos del momento, sean tan antiguos como la enfermedad en sí (1).

Recientes estudios de arqueología, nos sugieren que el *streptococcus mutans*, principal culpable de estos males, no existía en tiempos de los neandertales y por tanto, estos al menos, no padecían caries. Son sin embargo, teorías que quedan por demostrar y que nos limitan poder datar cuándo existió el primer caso de caries de la historia, aunque como ya hemos dicho, sí sabemos que fue hace miles de años (2).

La cuestión es: ¿cómo debería tratarse? y ¿qué podemos hacer para prevenirla? Los diversos estudios a lo largo de la historia de la odontología han servido para establecer las causas principales que favorecen la aparición de caries (higiene oral deficiente,



microbiología, dieta...) y para desarrollar diversas técnicas y materiales para tratar las lesiones establecidas. De este modo, se han utilizado todo tipo de materiales para el relleno de las consecuentes cavidades, se han desarrollado los sistemas de adhesión cuya evolución ha sido uno de los mayores avances de la odontología y se ha ampliado extensamente el arsenal terapéutico con infinidad de aditamentos (matrices, cuñas, preformas...) para tratar de conseguir las restauraciones más adecuadas y duraderas. Los últimos años han servido, para que, a la par del ferviente desarrollo de la medicina y la odontología estética, consigamos además unas restauraciones que mimeticen los tejidos dentarios buscando lograr también, el éxito estético. De hecho, el mayor esfuerzo a nivel científico y de manufactura se ha centrado en la mejora de la fracción de relleno de estos materiales, desarrollándose una gran variedad de nuevas formulaciones a una escala micro o nano estructural, con el fin de mejorar su comportamiento mecánico y estético.

Por otro lado, y aunque en menor grado, también se han producido modificaciones a nivel de la matriz resinosa de los composites, la mayoría de ellos formada por monómeros de metacrilato. Estos monómeros son los responsables de la mayoría de las desventajas clínicas, como el grado de polimerización y la aparición de microfiltración en la interfase entre el diente y el material (3). De hecho, se pueden producir efectos adversos, debido a las sustancias liberadas de la matriz a consecuencia de una polimerización incompleta o de la propia degradación del material (4). Para intentar contrarrestar estos problemas han surgido nuevos sistemas de monómeros, como los *siloranos*, *oxiranos*, *dendrimeros...*, que tratan de sustituir a los monómeros de metacrilato convencionales (5).

Otro factor a considerar viene dado por el ritmo de vida en los tiempos actuales. Las exigencias de los pacientes e incluso de los clínicos han servido para tratar siempre de minimizar los tiempos de tratamiento, tanto por comodidad como para optimizar la agenda, así como para simplificar las técnicas operatorias. De esta manera, surgen los composites de bajo peso para contrarrestar el problema de la contracción de polimerización que sufren estos materiales y facilitar los procedimientos dentales. Durante este trabajo se analizará la evolución de los materiales utilizados para el relleno de las cavidades dentales, así como el comportamiento de estos materiales en términos



de citotoxicidad, tratando de evaluar si su aplicación en el medio oral puede considerarse útil y segura (6).

### 1.-Breve evolución histórica de los materiales dentales.

La historia de la Odontología es extensa, de modo que no es la pretensión de este apartado abarcar todas las personalidades dignas de mención, ni tan siquiera todos los procedimientos que se han ido llevando a cabo en las diferentes culturas y periodos de la historia. No obstante, no establecer un breve contexto histórico dejaría de algún modo incompleto el desarrollo de este trabajo, de manera que avanzaremos a gran velocidad a través de los años, dando unas pequeñas pinceladas que nos ayuden a recordar de dónde venimos.

Desde hace miles de años y a lo largo de la historia podemos encontrar ejemplos de tratamientos que han tratado de solucionar los diversos problemas bucales. En la América precolombina, los mayas realizaban tratamientos dentales, en este caso no con propósitos curativos, sino con fines rituales y religiosos. Preparaban cavidades en los dientes anteriores y, en ocasiones, en los primeros molares y realizaban incrustaciones de diversos minerales como la *pirita*, *jadeíta* (mineral similar a la piedra de jade), *hematita* (piedra de sangre) o *cuarzo*, para lo que utilizaban materiales abrasivos, creaban las cavidades e incluso utilizaban *cementos de fosfato de calcio* para unir el mineral con el diente, lo que ha permitido la conservación de ejemplos de estos procesos a pesar del largo paso del tiempo. A su vez, limaban y modificaban la forma de los dientes como parte de procedimientos tribales.



Fig. 1. Ejemplos de incrustaciones de las culturas precolombinas.



Sobre los aztecas, asentados en la zona que en la actualidad ocupa Méjico, tenemos muchos datos históricos debido al legado escrito por *Fray Bernardino de Sahagún* que convivió con ellos y pudo observar como utilizaban diversas hierbas para tratar los problemas dentales. Los aztecas pensaban que la caries era producida por un gusano, (teoría ya descrita en los textos sumerios 5000 años antes de Cristo y muy extendida en la antigüedad) y trataban de combatirla masticando *ají picante*. Las cavidades de los dientes se rellenaban con una mezcla de *polvo de caracol*, *sal marina* y una hierba de difícil pronunciación, llamada *tlalcacahuat*. De sus escritos nos llegan también prácticas de drenaje de abscesos, extracciones dentales, o sutura de heridas con mechones de pelo. De entre los pueblos de la cultura precolombina, probablemente los más desarrollados fueron los incas, asentados en el actual Perú. Utilizaban diversas hierbas y trataban los problemas gingivales mediante cauterización de los tejidos inflamados. Nuestros conquistadores, en este caso *Francisco Pizarro*, no supieron respetar y recopilar los diversos conocimientos de estos pueblos, privándonos de los sorprendentes conocimientos de astronomía y la cultura de un pueblo en algunos aspectos muy desarrollado. Los conocimientos que nos llegan, se los debemos a *Garcilaso de la Vega*, descendiente de incas, que fue quien recogió las técnicas utilizadas para el tratamiento de los problemas dentales.

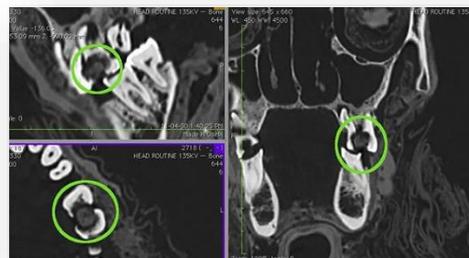


Fig. 2 y 3. Ejemplos de odontología en el antiguo Egipto. Escáner del cráneo de una momia que muestra la obturación de cavidades con paño de lino embebido en sustancias calmantes.



*Esculapio* describía en el 1250 a.C. las extracciones dentarias. Pero fue uno de los personajes más célebres, el considerado padre de la medicina, *Hipócrates*, quién comenzó a detallar las enfermedades como procesos biológicos sobre los que se podría intervenir, alejándose de la visión más espiritual y mágica que hasta entonces se había impuesto. Fue el primero en separar la religión y el misticismo popular, uniendo medicina y filosofía y rechazando de pleno que la enfermedad fuera un castigo divino, sino más bien la consecuencia de factores ambientales, dietéticos y los distintos hábitos de vida. Dentro de su obra, se pueden encontrar diversas alusiones a los dientes y sus tratamientos. *Hipócrates* habla de la erupción dental, del recambio de la dentición y de la necesidad de cauterizar los dientes cuando comienzan a doler. Además, acuñó el término “*muela del juicio*”. De los yacimientos arqueológicos de la antigua Grecia nos llegan los primeros fórceps hechos de hierro, aunque *Hipócrates* recomendaba realizar las extracciones con cautela, dada su peligrosidad. Los cuidados higiénicos se comenzaron a instaurar en Grecia cuando fue sometida y se convirtió en provincia de Roma, aprendiendo a utilizar diversos materiales para frotarse los dientes como el polvo de alabastro, talco de pómez, esmeril y óxido de hierro. En Roma surge la figura de *Celso*, que habla extensamente de las necesidades de higiene y del tratamiento de los diversos problemas dentales, incluyendo el tratamiento de fracturas de maxilares, las extracciones dentales e incluso refiere la ferulización de dientes con movilidad. *Claudio Galeno* (131 a.C.) fue el primero en hablar del dolor dental como consecuencia de pulpitis o pericementitis.

Los romanos eran además excelentes restauradores; realizaban coronas de oro para tratar los dientes cariados, presumiblemente encargando los trabajos a los orfebres. Durante este periodo se desarrolla ampliamente la prótesis existiendo ejemplos de completas o parciales e incluso ejemplos de prótesis fija.

Los *etruscos* durante los dos primeros siglos después de Cristo, son reconocidos por sus trabajos prostéticos. De su legado nos llegan coronas de oro y puentes fijos.

Como sucedió con otros conocimientos de la historia de la medicina, los avances y procedimientos científicos eran mucho más avanzados en Oriente. De esta forma en China, ya se practicaba la odontología desde el II siglo a.C. Utilizaban el *arsénico* para el tratamiento de dientes con alteraciones pulpares y fueron los primeros en usar una



aleación de plata para realizar obturaciones de caries. La aleación estaba descrita en su composición con las partes que se detallan: *100 partes de mercurio, 45 partes de plata y 900 partes de zinc*. Estos compuestos se trituraban y obtenían una pasta sólida como la plata. De esta forma se adelantaron en el uso de estos materiales cerca de mil años respecto a Occidente.



Fig 4 y 5. Prótesis y relieve que muestra un tratamiento dental de la época romana.

En sus viajes a China, *Marco Polo*, describió cómo los chinos cubrían sus dientes con finas láminas de oro, y aunque no se sabe si con motivos cosméticos o rehabilitadores, lo cierto es que eran grandes restauradores. Así mismo y aunque también asociaron la aparición de la caries, a la presencia de un gusano, si describieron la importancia de eliminar los restos de comida de la boca y enjuagarse. De este modo, desarrollaron el *primer cepillo de dientes de la historia* en el año 1490.

Mientras, en Europa, tras la caída del Imperio Romano, el legado de la medicina griega y oriental pasó a manos de los monasterios católicos que funcionaron como instituciones de caridad para el cuidado de los enfermos. *Pablo de Egina* (625-690) fue el último de los eclécticos griegos que escribió sobre odontología. En su obra "*Epitome*" se recoge una compilación de los escritos antiguos. Dedicó un capítulo a las afecciones de la boca donde explicó con coherencia detalles sobre la dentición, el recambio, las extracciones y la higiene oral.

Posteriormente, la mentalidad monacal y cristiana de la época en la que se despreciaba el cuidado del cuerpo y se exacerbaba una mentalidad más doctrinal y espiritual, llevada



a unos límites que rozaban el fanatismo, llevó a una extensa época de oscurantismo para el desarrollo de la ciencia en general y de la odontología, principalmente restauradora, en particular.



Fig. 6. Grabado medieval que muestra el tratamiento dental de un barbero.

La Edad Media en Europa se caracterizó por la proliferación de los *barberos*, que fueron sustituyendo paulatinamente la labor de los monjes que inicialmente eran los que realizaban los tratamientos médicos y las cirugías. Fue una época de uso extenso de plantas medicinales y botánica con mayor o menor acierto. Con el desarrollo de las primeras universidades (*Salerno, Montpellier, Bolonia...*) aparecen importantes personajes en el mundo de la medicina y la cirugía. Cuando comienzan a realizarse las primeras disecciones de cadáveres es cuando realmente existe un avance en los conocimientos médicos, muy parcos hasta el momento. *Guy de Chauliac* es uno de los personajes más relevantes en los s. XIV-XV, destacando en el mundo de la cirugía tras



formarse en Toulouse y Bolonia. Escribió su gran trabajo “*Inventorium Chirurgicalis Medicinae*”, donde describió la anatomía dentaria, las enfermedades que afectaban la cavidad bucal y una serie de recomendaciones de higiene muchas de las cuales se mantienen vigentes en la actualidad. Para la obturación de piezas cariadas, habló de diversos materiales y extensas listas de hierbas, sin aclarar las proporciones o su modo correcto de empleo. Uno de sus sucesores, *Giovanni Arcolani*, profesor de la Universidad de Bolonia, escribió un tratado: “*Cirurgía Práctica*” (Venecia 1483), donde describía el uso de pan de oro para la obturación de cavidades cariadas, constituyendo el primer ejemplo escrito de *orificaciones* de la Historia. Otro autor coetáneo, *Giovanni da Vigo*, en su libro: “*Practica copiosa in arte chirurgica*” (1514), menciona nuevamente el relleno de las cavidades producidas por caries con oro. Los historiadores sugieren que bien pudo practicar este tipo de orificaciones al mismísimo *Papa Julio II* (quién encargó a *Miguel Ángel* la Capilla Sixtina), ya que se convirtió en su médico personal en Roma. Lo que resulta evidente es que el final de la Edad Media y comienzo del Renacimiento, fue un periodo donde existió un importante auge en la odontología restauradora.

La llegada del Renacimiento, supuso un cambio de paradigma y comenzó a dejarse atrás el oscurantismo y la superstición reinante durante el medievo, creando el clima adecuado para que el desarrollo de la ciencia adquiriese buen ritmo y fuese mucho más provechoso. Es una época de grandes anatomistas, que empiezan a describir el cuerpo humano tal y como es, grandes personajes como *Leonardo da Vinci*, que ya describió el seno maxilar, *Andrea Vesalio*, *Eustaquio* o *Paracelso*, quienes contribuyeron enormemente al desarrollo de los conocimientos médicos por entonces demasiado ligados al mundo de la religión y en manos de charlatanes, curanderos y chamanes. Así mismo, y a la par de los crecientes conocimientos en anatomía y medicina, comienza a sustituirse el oficio medieval de barbero y comienzan a aparecer los especialistas en cirugía. Destaca la figura de *Ambrosio Paré*, que también describió la estabilización de las fracturas maxilares mediante ligaduras de alambre y el tratamiento de las caries, aunque en este caso no hablaba de obturarlas. Creó además el obturador palatino para solventar las lesiones que se creaban consecuencia de las graves epidemias de sífilis, tan frecuentes en la época.

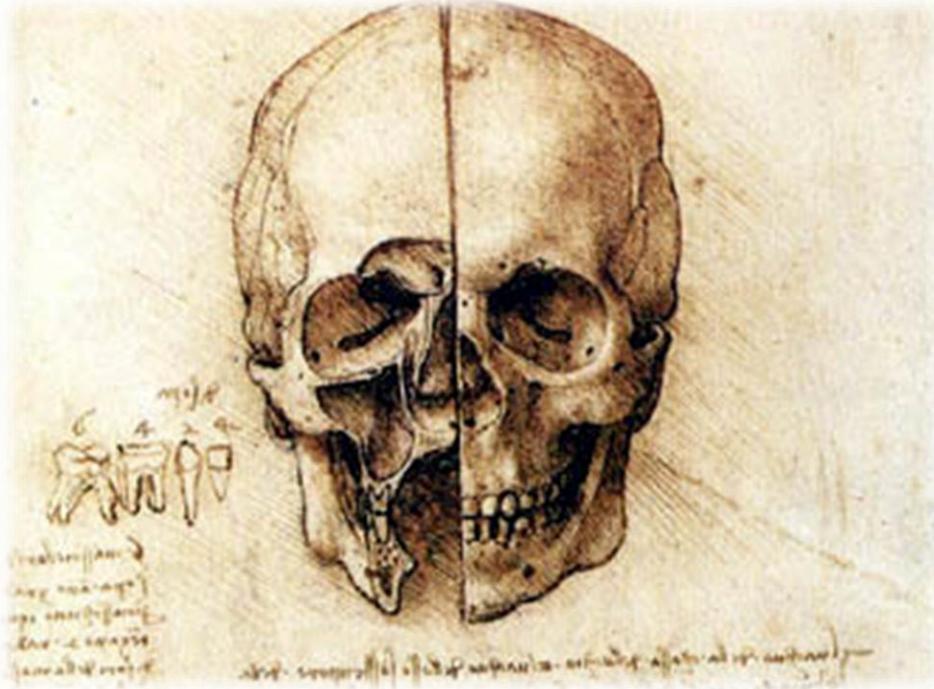


Fig. 7 Descripción del seno maxilar por Leonardo da Vinci.

Para los historiadores, la figura más influyente y el reconocido como padre de la Odontología Científica fue el francés *Pierre Fauchard* (1678). Pierre se enroló en la Marina a la edad de 15 años desoyendo los consejos de su padre y durante ese periodo, aprendió bajo la influencia de *Alexander Poteleret*, un gran cirujano, que se mostró muy interesado en las enfermedades de los dientes, gracias a lo que *Fauchard* ganó una inestimable experiencia como cirujano. Pronto comenzó a ser reconocido en París y fue el primero que luchó por diferenciar a los barberos de los cirujanos dentistas, título que el mismo se adjudicó. En 1728 escribió una obra de referencia bajo el título: “*Le chirurgien dentiste*”, con más de 800 páginas, y que supuso el verdadero cambio hacia una odontología científica. Desterró definitivamente la *teoría del gusano* como origen de las caries y recomendó su limpieza y obturación con *plomo, estaño u oro* para fortalecer los dientes ya debilitados.



Fig. 8. "Le Chirurgien Dentiste" de Pierre Fauchard 1798.

Desde principios del s XIX, se extendió el uso de la amalgama de plata como material de elección en odontología restauradora. *Thomas W. Evans*, fue el encargado de popularizar su uso en Europa. Desde entonces, se trató de encontrar la composición ideal para mejorar las propiedades de la aleación. De este modo Evans incorporó el *estaño*, para reducir la contracción del compuesto, lo que se convirtió en un componente usado hasta la actualidad. En 1895 *Greene Vardinan Black*, considerado uno de los padres de la odontología científica, modificó la aleación que contenía un 68% de *plata* y proporciones menores de *cobre, estaño* y *zinc*, mejorando las propiedades de la amalgama que de esta manera, se mostraba más duradera y con menor capacidad de corrosión.



Fig. 9. Instrumental dental de Black. SXIX



El uso de las amalgamas de plata ha sido paulatinamente sustituido por las resinas, debido principalmente a la continua evolución de estas últimas y a las evidentes demandas estéticas (7).

A esto se suma el controvertido problema surgido por la *presencia de mercurio* en la composición de las amalgamas, dada su toxicidad y los consecuentes daños a la salud que pueden derivarse de una extensa o inadecuada manipulación. Los estudios han demostrado que el mercurio puede acumularse en diversos tejidos del organismo y se han encontrado mayores concentraciones del mismo en orina y sangre. Este aumento de las concentraciones de mercurio podría causar daños en diversos órganos. Se ha relacionado principalmente en daños a nivel de cerebro, hígado y riñones, así como problemas de tipo alérgico. De esta manera, recientes estudios sugieren la posibilidad de daño renal en una relación dosis dependiente en pacientes portadores de amalgamas dentales (8), así como una mayor probabilidad de padecer autismo severo, en niños con madres portadoras de amalgamas dentales durante el periodo fetal y la infancia temprana (9).

Si bien los estudios no sugieren que la proporción de mercurio que llevan estos materiales sea suficientemente importante, lo cierto es que el uso de amalgamas está cada vez más relegado a zonas donde el factor económico es primordial, ya que las propiedades mecánicas que han supuesto la principal justificación de su uso mantenido en el tiempo (mayor resistencia y dureza), se han ido igualando con la aparición de resinas de última generación. Estas últimas, presentan propiedades mecánicas cada vez más favorables y con una inestimable ventaja estética respecto a las clásicas amalgamas de plata. La inserción de las resinas mediante técnicas de adhesión, permite además una odontología restauradora mínimamente invasiva, sin necesidad de realizar cavidades con grandes extensiones o bien realizadas con las formas de conveniencia necesarias para contener el material restaurador.



## **2.-Evolución de las resinas compuestas para restauraciones directas.**

Los *cementos de silicato* se suelen considerar como la base sobre la que se fija la evolución de las resinas compuestas (Fig. 10). Surgen en la primera mitad del siglo XX y poseían un color parecido al de los dientes aunque su baja resistencia al desgaste motivó el abandono de su uso (10).

A finales de los años 40 y principio de los 50, las *resinas acrílicas de polimetilmetacrilato* sustituyeron a los silicatos. Estas resinas tenían también un color parecido al de los dientes, eran insolubles en los fluidos orales, fáciles de manipular y además tenían bajo coste. Lamentablemente, estas resinas acrílicas presentaban una baja resistencia al desgaste y una contracción de polimerización y un coeficiente de variación dimensional térmica muy elevados, generando tensiones que en los bordes de la restauraciones producen la separación de las paredes del diente, provocando con demasiada frecuencia, filtración marginal (11). Con el fin de solventar estos problemas, se introdujo un relleno inerte, lo que permitió la reducción de la contracción de polimerización y disminuyó el coeficiente de variación dimensional térmica. Surge entonces un nuevo problema, debido a que las partículas *se desprendían con gran facilidad de la matriz de polimetilmetacrilato* al no estar adheridas químicamente. Los defectos que se desarrollaban entre las partículas retenidas mecánicamente y la resina de alrededor daban lugar a filtración, tinción y una menor resistencia al desgaste.

Con todo, este es el verdadero punto de partida de las resinas compuestas.

La era de las resinas modernas empieza en 1962 cuando el *Dr. Ray. L. Bowen*, desarrolló un nuevo tipo de resina compuesta. La principal innovación fue la matriz de resina de *Bisfenol-A-Glicidil Metacrilato (Bis-GMA)* y un agente de acoplamiento o *silano orgánico* entre la matriz de resina y las partículas de relleno, resolviendo así el problema de desprendimiento de éstas (12).

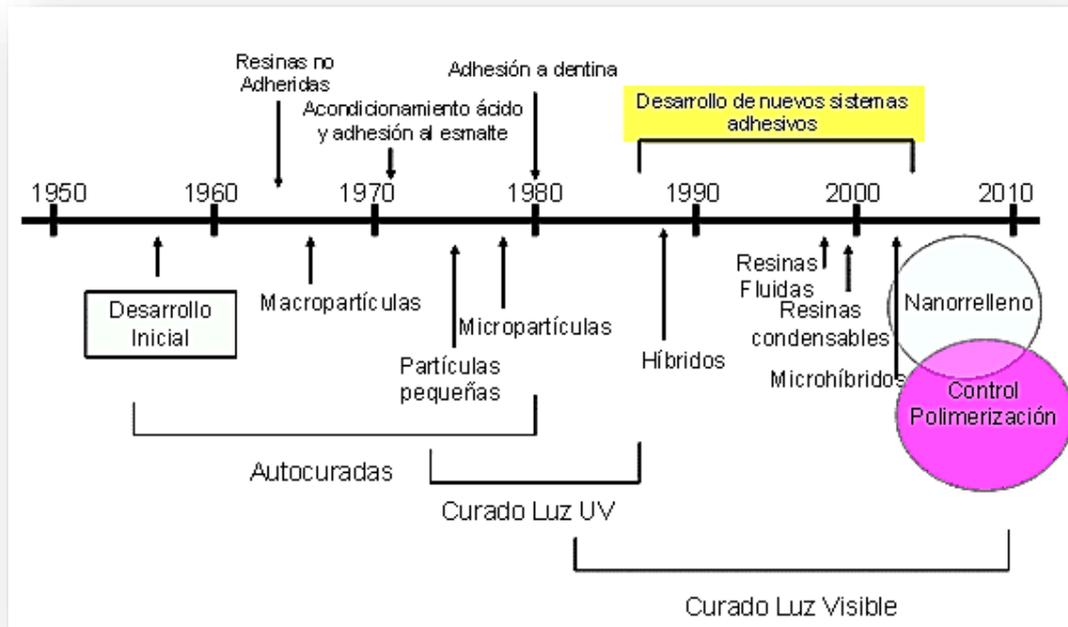


Fig. 10.

*Desarrollo de las resinas compuestas de acuerdo a las partículas, sistemas de polimerización y tecnología adhesiva disponible. Adaptado de Bayne S.(13)*

### 3.-Las resinas compuestas.

Los materiales compuestos son combinaciones tridimensionales de por lo menos dos materiales químicamente diferentes, con una interfase distinta, obteniéndose propiedades superiores a las que presentan sus constituyentes de manera individual (14).

Las resinas compuestas dentales, son una mezcla compleja de resinas polimerizables mezcladas con partículas de rellenos inorgánicos. Para unir las partículas de relleno a la matriz plástica de resina, el relleno es recubierto con silano, un agente de conexión o acoplamiento (Fig. 11). Otros aditivos se incluyen en la formulación para facilitar la polimerización, ajustar la viscosidad y mejorar la opacidad radiográfica.

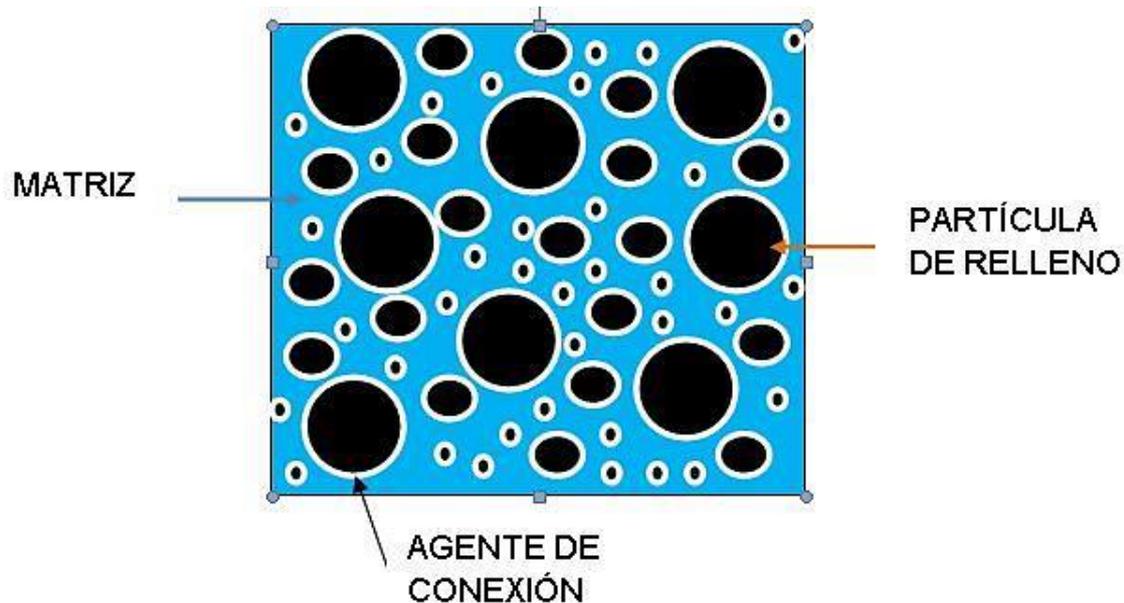


Fig. 11.

Componentes fundamentales de las resinas compuestas. Esquema general donde puede verse la matriz de resina, las partículas de relleno y el agente de conexión.

Tomado de Rodríguez D, Pereira N) (15).

Las resinas compuestas se modifican para obtener *color, translucidez y opacidad*, para de esa forma imitar el color de los dientes naturales, haciendo de ellas el material más estético de restauración directa. Inicialmente, las resinas compuestas se indicaban sólo para la restauración estética del sector anterior. Posteriormente, y gracias a los avances de los materiales, la indicación se extendió también al sector posterior. Entre los avances de las resinas compuestas, se reconocen mejoras en sus propiedades tales como la resistencia al desgaste, manipulación y estética (16).

Igualmente, las técnicas adhesivas se han perfeccionado de tal forma que la adhesión entre la resina compuesta y la estructura dental es más fiable, reduciendo la filtración marginal y la caries secundaria. Además, las restauraciones de resina por el hecho de ser adhesivas a la estructura dental permiten preparaciones cavitarias más conservadoras, preservando la valiosa estructura dental. Sin embargo, a pesar de todas estas ventajas, la colocación de las resinas compuestas es una técnica muy sensible, ya que se deben controlar diversos factores como la humedad del campo operatorio y la contracción de polimerización (17).



### 3.1.-Composición de las resinas compuestas para restauraciones.

Los componentes estructurales básicos de las resinas compuestas son (14, 18):

1. **Matriz:** se trata de una resina plástica que forma una *fase continua* y que a su vez hace las veces de vehículo de los demás componentes.
2. **Relleno:** son partículas y/o fibras de refuerzo que forman una *fase dispersa* en la matriz.
3. **Agente de conexión o acoplamiento:** que favorece la unión del relleno con la matriz.
4. **Sistema activador:** es el iniciador de la polimerización.
5. **Pigmentos** que permiten obtener un color semejante al de los dientes, para obtener el mimetismo de las restauraciones.
6. **Inhibidores de la polimerización** que sirven para alargar la vida de almacenamiento y aumentar el tiempo de trabajo.

**1.- Matriz Resinosa:** La mayoría están constituidas por *monómeros de dimetacrilato alifáticos y/o aromáticos, como el Bisfenol-A-Glicidil Metacrilato (Bis-GMA), y el trietilenglicol dimetacrilato (TEGDMA)*. El monómero base más utilizado durante los últimos 50 años ha sido el *Bis-GMA*. Comparado con el metilmetacrilato, el *Bis-GMA* tiene su peso molecular cinco veces mayor, lo que implica que su contracción durante la polimerización es mucho menor, además presenta menor volatilidad y menor difusividad en los tejidos.

Sin embargo, su alto peso molecular es también una característica limitante, ya que aumenta su viscosidad, pegajosidad y dificulta su manipulación. Además, en condiciones normales de polimerización, el grado de conversión del *Bis-GMA* es del 56% (19). Ferracane y colaboradores determinaron que el grado de conversión óptimo para que el comportamiento de una resina dental sea adecuado es del 55% (20).



En estudios más recientes, *Anusavice* y colaboradores determinaron que el grado de conversión que se considera máximo es del 50 al 60%.

Para superar estas deficiencias, se añaden monómeros de baja viscosidad tales como el *TEGDMA*. Actualmente el sistema *Bis-GMA/TEGDMA* es uno de los más usados en las resinas compuestas (21). En general este sistema muestra resultados clínicos relativamente satisfactorios, pero aún hay propiedades que necesitan mejorarse, como la resistencia a la abrasión (22).

Por otro lado, la molécula de *Bis-GMA*, tiene dos *grupos hidroxilos* los cuales promueven la sorción de agua. Un exceso de *sorción acuosa* en la resina tiene efectos negativos en sus propiedades y promueve una posible degradación hidrolítica (23). Posteriormente, monómeros menos viscosos como el *Bis-EMA6 (Bisfenol A Polietileno glicol dieter dimetacrilato)*, han sido incorporados en algunas resinas, lo que causa una reducción de *TEGDMA*. El *Bis-EMA6* posee mayor peso molecular y tiene menos uniones dobles por unidades de peso, en consecuencia produce una reducción de la contracción de polimerización, presenta una matriz más estable y también mayor hidrofobicidad, lo que disminuye su sensibilidad y alteración por la humedad (24).

Otro monómero ampliamente utilizado, acompañado o no de *Bis-GMA*, es el *UDMA (dimetacrilato de uretano)*, su ventaja es que posee menos viscosidad y mayor flexibilidad, lo que mejora la resistencia de la resina (25). Las resinas compuestas basadas en *UDMA* pueden polimerizar más que las basadas en *Bis-GMA* (26), lo que implica mayor contracción de polimerización, y además *Söderholm y col*, indicaron que la profundidad de curado era menor en ciertas resinas compuestas basadas en *UDMA* debido a una diferencia entre el índice de refracción de luz entre el monómero y el relleno (27, 28) (Fig.12) (Tabla 1).

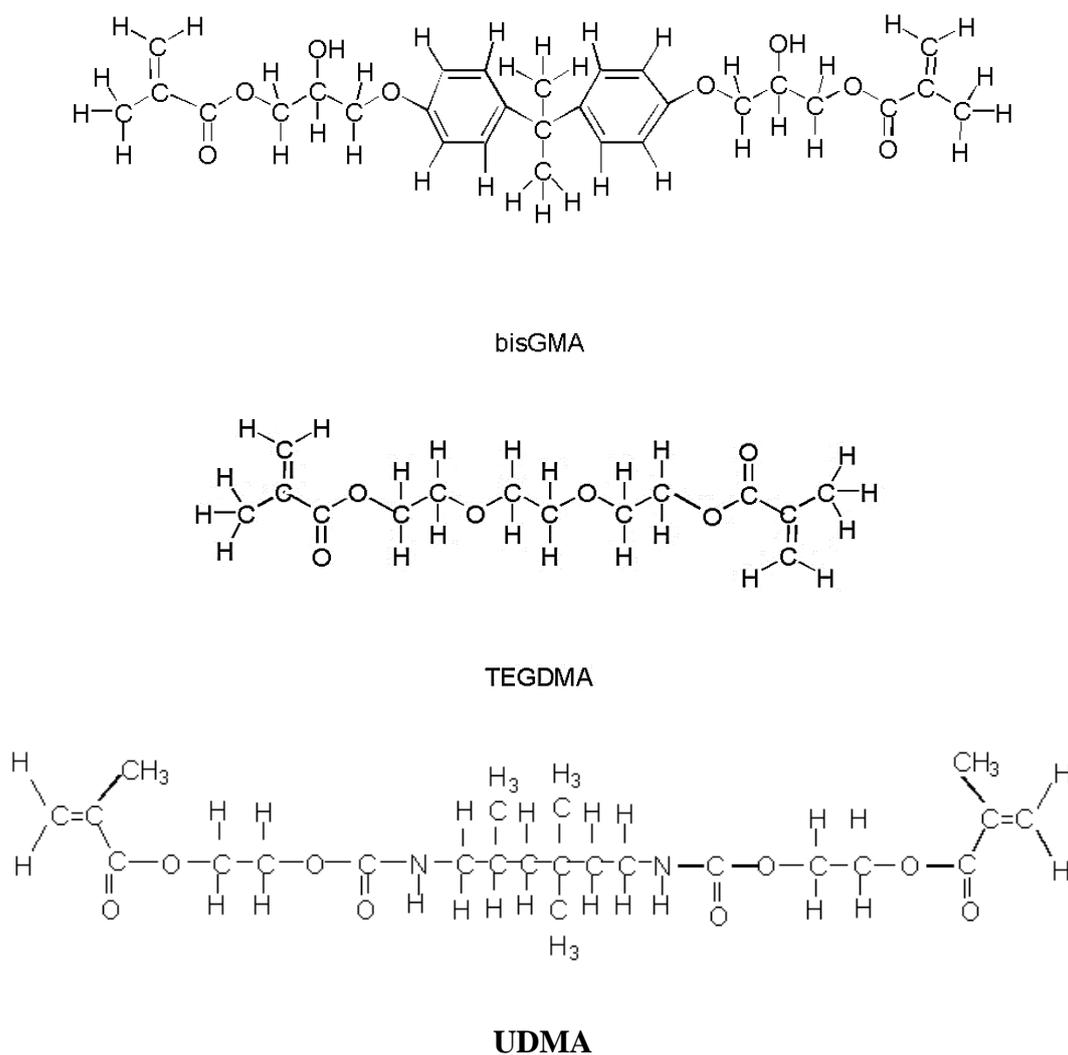


Fig. 12 Estructura molecular de las resinas más usadas en composites.

Monómero	Peso Molecular (g/mol)	Viscosidad (mPas)	$\Delta V_P$ (%)
<b>TEGDMA</b>	286	100	14,3
<b>UDMA</b>	470	5000-10000	6,7
<b>Bis-GMA</b>	512	500.000-800.000	6,1

Tabla 1 Relación entre peso molecular y viscosidad de los monómeros.

Modificado de Moszner N, Salz U.2001) (29)



**2.- Partículas de relleno.** Son las que proporcionan estabilidad dimensional a la matriz resinosa y mejoran sus propiedades. La adición de estas partículas a la matriz reduce la contracción de polimerización (entre el 1,5 y el 4% en las 2 horas posteriores al polimerizado (14), la sorción acuosa y el coeficiente de variación dimensional térmico, proporcionando un aumento de la resistencia a la tracción, a la compresión y a la abrasión, aumentando el *módulo de elasticidad* (rigidez), la viscosidad y la radiopacidad (30).

Las partículas de relleno *de cuarzo o vidrio de bario*, son obtenidas de distintos tamaños a través de diferentes procesos de fabricación (pulverización, trituración, molido). Las partículas de cuarzo son dos veces más duras y menos susceptibles a la erosión que el vidrio, además de que proporcionan mejor adhesión con los agentes de conexión (*silano*). También son utilizadas partículas de sílice de un tamaño aproximado de 0,04 mm (micropartículas), las cuales son obtenidas a través de procesos pirolíticos (quema) o de precipitación (sílice coloidal) (11).

La tendencia actual es la disminución del tamaño de las partículas, haciendo que la distribución sea lo más cercana posible, en torno a 0.05  $\mu\text{m}$  (31).

Es importante resaltar que cuanto mayor sea la incorporación de relleno a la matriz, mejores serán las propiedades de la resina, ya que, se produce una *menor contracción de polimerización* y en consecuencia menor filtración marginal, argumento en el cual se basa el surgimiento de las resinas pesadas (32).

Sin embargo, tan importante como la contracción de polimerización, es la tensión o el *estrés de contracción de polimerización*, es decir, la relación entre la contracción de la resina, su módulo de elasticidad (rigidez) y la cantidad de paredes o superficies dentarias a unir (*Factor C*). Con esto, las resinas con altísima incorporación de relleno acaban contrayendo menos, pero causando mayor estrés de contracción lo que conlleva a mayor filtración, por ser demasiado rígidas (33).

En total, las partículas de relleno representan entre el 30 – 70% del volumen, o del 50 – 85% en peso de la resina compuesta.



**3.- Agente de conexión o de acoplamiento.** Durante el desarrollo inicial de las resinas compuestas, *Bowen* demostró que las propiedades óptimas del material, dependían de la formación de una unión fuerte entre el relleno inorgánico y la matriz orgánica (34). La unión de estas dos fases se logra recubriendo las partículas de relleno con un agente de acoplamiento que tiene características tanto de relleno como de matriz. El agente responsable de esta unión es una molécula bifuncional que tiene *grupos silanos* ( $Si-OH$ ) en un extremo y *grupos metacrilatos* ( $C=C$ ) en el otro. Debido a que la mayoría de las resinas compuestas disponibles comercialmente tienen relleno basado en sílice, el agente de acoplamiento más utilizado es el *silano* (35).

El *silano* que se utiliza con mayor frecuencia es el  $\gamma$ -*metacril-oxipropil trimetoxi-silano* (*MPS*) (Fig. 13), éste es una molécula bipolar que se une a las partículas de relleno cuando son hidrolizados a través de puentes de hidrógeno y a su vez, posee grupos metacrilatos, los cuales forman uniones covalentes con la resina durante el proceso de polimerización ofreciendo una adecuada interfase resina / partícula de relleno (36).

Asimismo, el silano mejora las propiedades físicas y mecánicas de la resina compuesta, pues establece una transferencia de tensiones de la fase que se deforma fácilmente (matriz resinosa), para la fase más rígida (partículas de relleno). Además, estos agentes de acoplamiento previenen la penetración de agua en la *interfase BisGMA / partículas de relleno*, promoviendo una estabilidad hidrolítica en el interior de la resina (37).

Se han experimentado otros agentes tales como el *4-META*, varios *titanatos* y *zirconatos*, sin embargo ninguno de estos agentes demostró ser superior al *MPS* (38). Los avances en la tecnología de silanización se preocupan más que nada en obtener un recubrimiento uniforme de la partícula de relleno lo cual provee mejores propiedades a la resina compuesta. Para lograr este recubrimiento uniforme, los fabricantes utilizan diferentes formas de cubrimiento y envuelven hasta tres veces la partícula de relleno (39).

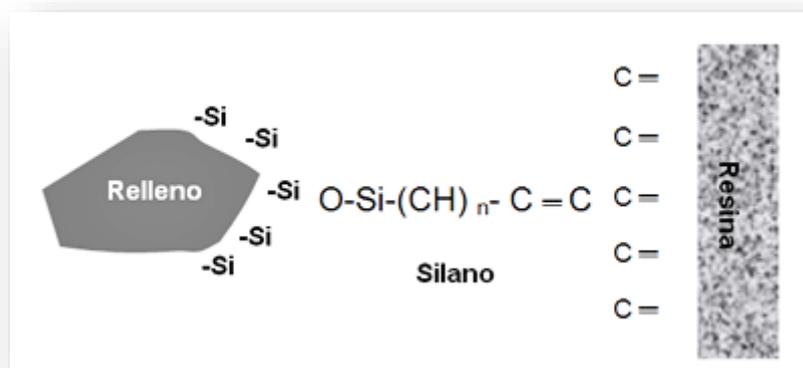


Fig. 13

Agente de Conexión Silano.

Modificado de Chain M, Baratieri L. *Restauraciones Estéticas con Resina Compuesta en Dientes Posteriores*. Sao Paulo, BR.: Artes Médicas Latinoamérica; 2001.(18)

**4.- Sistema Iniciador-Activador de Polimerización.** El proceso de polimerización de los monómeros en las resinas compuestas se puede lograr de varias formas. En cualquiera de éstas, es necesaria la acción de los radicales libres para iniciar la reacción. Para que estos radicales libres se generen es necesario un estímulo externo. En las resinas de activación química (autopolimerizado o fraguado en frío) el estímulo proviene de la mezcla de dos pastas, una de las cuales tiene un activador químico (*amina terciaria aromática* como la *N, N dimetil-p-toluidina*) y la otra un iniciador (*peróxido de benzoílo*). Durante el mezclado, es casi imposible evitar la incorporación de aire, que se incorpora en forma de poros que fragilizan la estructura y atrapan oxígeno; éste último es un inhibidor de la polimerización lo que dará como resultado final una resina compuesta de propiedades mecánicas inferiores. Otro problema añadido de este tipo de polimerización es que el operador no tiene control sobre el tiempo de trabajo una vez iniciada la reacción.



Estos problemas fueron solucionados en parte con la introducción de los sistemas de resina compuestas de fotocurado. Las primeras resinas se activaban por luz ultravioleta. En la actualidad se usa luz visible azul la cual provee el estímulo que activa un iniciador en la resina (una *amina alifática, canforoquinonas, lucerinas u otras diquetonas*) (40).

Este tipo de amina proporciona una mejor estabilidad del color que las aminas aromáticas. Es necesaria que la resina sea expuesta a una fuente de luz con la *adecuada longitud de onda* entre 400 y 500 nanómetros en el espectro de luz visible considerablemente (28). Sin embargo, el clínico debe ser cuidadoso en minimizar la exposición de luz, hasta que el material esté listo para curar, de otra forma puede comenzar una polimerización prematura y el tiempo de trabajo se puede reducir considerablemente (41). Además hay otras limitaciones de las resinas activadas por luz como puede ser la necesidad de colocarlas de forma incremental, evitando capas de más de 2 a 3 mm ya que la penetración de la luz podría verse limitada. Como veremos más adelante, esta es una de las grandes innovaciones de los *Bulk Fill* ya que permiten un grosor de capas muy superior. Otra limitación es el acceso relativamente pobre a ciertas zonas posteriores e interproximales.

Este inconveniente puede ser subsanado con la utilización de un tercer grupo de resinas compuestas para restauraciones directas en las que el estímulo es una combinación de los dos anteriores, es decir, la activación es química y por luz a la vez. Por tal motivo a estas *resinas compuestas* se las conoce como *duales*.

Otra forma común de polimerizar las resinas es a través de la aplicación de calor solo o en conjunto con fotocurado. Este procedimiento es bastante común en las resinas usadas en laboratorio para la fabricación de *inlays* y *onlays*. Para los materiales termocurados, temperaturas de 100 °C o más, proveen la temperatura que sirve de estímulo para activar el iniciador. El termocurado tras el fotocurado mejora las propiedades de la resina, sobre todo la resistencia al desgaste y la resistencia a la degradación marginal (42). Cualquiera de estos mecanismos es eficiente y produce un alto grado de polimerización en condiciones apropiadas.



**5.- Modificadores ópticos.** Para obtener una apariencia natural, las resinas compuestas deben tener unas propiedades de tono y translucidez semejantes a la estructura dental. La tonalidad se logra mediante la adición de diferentes pigmentos que normalmente son cantidades minúsculas de óxidos metálicos. La translucidez y la opacidad se ajustan con el fin de semejarse a la dentina y al esmalte, para lo cual los fabricantes añaden cantidades mínimas de *dióxido de titanio* y *óxido de aluminio* (0,001 a 0,007% en peso).

Es importantísimo darse cuenta de que los modificadores ópticos afectan a la transmisión de la luz a través de la resina compuesta. De esta forma, cuando se emplean tonalidades más oscuras o bien cuando existe mayor opacidad, la profundidad de fraguado disminuye, por lo que o bien aumentamos el tiempo de exposición, o bien debemos polimerizar en capas más finas. Debemos considerar pues en el apartado de los *Bulk Fill*, el hecho de que los fabricantes contemplen la comercialización de colores universales casi translúcidos o muy blancos.

**6.- Inhibidores.** Se añaden para minimizar o prevenir la polimerización accidental o espontánea de los monómeros, reaccionando con los radicales libres mucho más rápido que los radicales libres reaccionan con el monómero. Esto interrumpe la reacción en cadena. Un inhibidor típico es el *hidroxitolueno butilado (HTB)*, empleado en concentraciones del 0,01% en peso. El *HTB* y otros captadores de radicales libres también se emplean como conservantes alimentarios evitando que ésta se oxide y se ponga rancia. Estos inhibidores tienen dos funciones: aumentar la vida media de almacenamiento y garantizar un tiempo de trabajo adecuado.



### 3.2 Clasificación de las resinas compuestas.

A lo largo de los años las resinas compuestas se han clasificado de distintas formas con el fin de facilitar al clínico su identificación y posterior uso terapéutico. Una de las primeras clasificaciones es la propuesta por *Lutz y Phillips* (43), citada con mucha asiduidad. Esta clasificación divide las resinas en base al tamaño y distribución de las partículas de relleno en: convencionales o macrorelleno (partículas de 0,1 a 100  $\mu\text{m}$ ), microrelleno (partículas de 0,04  $\mu\text{m}$ ) y resinas híbridas (con rellenos de diferentes tamaños) (Fig. 14).

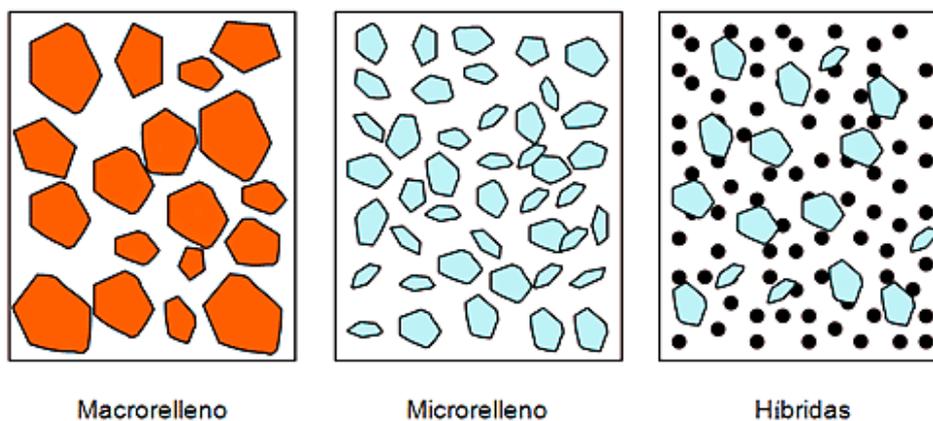


Fig. 14

*Clasificación de las resinas compuestas de Lutz y Phillips. (1983)*

Otro sistema de clasificación fue el ideado por Willems y col., que a pesar de ser más complejo, aporta más información sobre diversos parámetros como el módulo de Young, el porcentaje del relleno inorgánico (en volumen), el tamaño de las partículas, la rugosidad superficial y la resistencia compresiva (45). (Tabla 2)



Tipos de Resinas Compuestas	Rellenos
<b>Densificados</b>  - <i>De relleno medio</i>  <input checked="" type="checkbox"/> Ultrafinos <input checked="" type="checkbox"/> Finos  - <i>De relleno compacto &gt;60% en volumen</i>  <input checked="" type="checkbox"/> Ultrafinos <input checked="" type="checkbox"/> Finos	< 60% en volumen  Partículas < 3 µm  Partículas > 3 µm  > 60% en volumen  Partículas < 3 µm  Partículas > 3 µm
<b>Microfinos</b>  <input checked="" type="checkbox"/> Homogéneos <input checked="" type="checkbox"/> Heterogéneos	<i>Tamaño medio de las partículas = 0,004 µ</i>
<b>Mixtos</b>	<i>Mezcla de resinas densificados y microfinos</i>
<b>Tradicional</b>	<i>Equivalente a las llamadas resinas de macrorelleno en otras clasificaciones.</i>
<b>Reforzados con fibra</b>	<i>Resinas de uso en laboratorio – industrial</i>

Tabla 2

*Clasificación de las Resinas Compuestas (Adaptado de Willems y Col. 1992).*

Con el transcurso de los años y las nuevas incorporaciones al arsenal terapéutico del odontólogo, actualmente se pueden reunir las resinas compuestas en seis categorías principales (Tabla 3):

### 1.- Resinas tradicionales, de macrorelleno o convencionales.

Tienen partículas de relleno con un tamaño promedio entre 10 y 50 µm (44). Aunque *Anusavice*, amplía el espectro del tamaño de partícula entre 1 y 50 µm, con una carga del 70 al 80% en peso o del 60 al 70% del volumen (14). Este tipo de resinas, se desarrolló en los años 70 y fueron muy usadas. Sin embargo, sus desventajas justifican



que entraran en desuso. Su desempeño clínico es deficiente y el acabado superficial es pobre, debido a que existe un desgaste preferencial o selectivo de la matriz resinosa, propiciando la prominencia de las grandes partículas de relleno, ya que son más resistentes. Además, su rugosidad influencia el poco brillo superficial y produce una mayor susceptibilidad a la pigmentación (45). Los rellenos más utilizados en este tipo de resinas fueron el *cuarzo* y el *vidrio de estroncio o bario* (46). El relleno de cuarzo tiene buena estética y durabilidad pero carece de radiopacidad y produce un alto desgaste al diente antagonista. Los *vidrios de estroncio o bario* son radiopacos pero desafortunadamente son menos estables que el cuarzo (47). Al comparar las propiedades de estas resinas compuestas con las resinas sin relleno, hay una mejora considerable. La resistencia a la compresión mejoró entre el 300 y el 500%, debido a la transferencia de las tensiones de la matriz a las partículas de relleno. De manera similar el módulo de elasticidad es de cuatro a seis veces mayor y la resistencia a la tracción es más del doble. Asimismo, se redujo la absorción de agua, la contracción de polimerización y el coeficiente de variación dimensional térmico. La dureza pasó a 55 (KHN) frente a la de 15 (KHN) de las resinas acrílicas sin relleno.

## **2.- Resinas compuestas de partícula pequeña.**

En un esfuerzo por mantener o mejorar las propiedades favorables de las resinas tradicionales y conseguir una superficie con mejor pulido, se redujo el tamaño de las partículas de relleno a un rango de 0,5 a 3  $\mu\text{m}$ , con una amplia distribución, que facilita una gran carga que oscila entre el 80 y el 90% en peso y el 65 y el 77% en volumen. Algunas resinas de partículas pequeñas emplean *sílice amorfo* como relleno, pero la mayoría incorporan cristales que contienen metales pesados que le confieren radiopacidad. El *sílice coloidal* se añade en cantidades de aproximadamente el 5% en peso para ajustar la viscosidad de la pasta de forma que permita una mejor adaptación a las paredes de la cavidad. Con el aumento de la cantidad de relleno, mejoran las propiedades de resistencia a la compresión y el módulo de elasticidad, llegando a ser la resistencia traccional hasta 1,5 veces mayor que la de las resinas tradicionales. Además el pulido mejora sustancialmente. Sin embargo el coeficiente de variación dimensional térmico y la contracción de polimerización disminuyen.



Estos materiales, al contener cristales que contienen metales pesados son radiopacos. La radiopacidad es una propiedad importante en los materiales que se emplean para la restauración de dientes, ya que facilita el diagnóstico de desarrollo de caries secundarias. Desgraciadamente, los rellenos de cristal con metales pesados son más blandos y más proclives a hidrolizarse y disolverse en agua, mucho más que la sílice amorfa y el vidrio. Al cabo del tiempo, se ablandan y muestran tendencia al desgaste y al deterioro (14).

### **3.-Resinas de microrelleno.**

Los inconvenientes de las resinas de los dos grupos anteriores, como la rugosidad superficial y la baja traslucidez, se han superado al incorporar en su composición, relleno de *sílice coloidal* con un tamaño de partícula entre 0.01 y 0.05  $\mu\text{m}$  (48). Estas partículas pueden formar aglomerados de hasta 0,4  $\mu\text{m}$ . En teoría, este relleno se puede añadir directamente a la resina y en grandes cantidades. Sin embargo, esto no es fácil de llevar a cabo debido a la gran superficie que debe ser mojada por el monómero y sobre todo a la formación de pseudocadenas poliméricas entre las partículas coloidales. Este fenómeno aumenta de forma significativa la viscosidad y produce un engrosamiento indebido, incluso cuando se añade muy poca cantidad de microrrelleno. A pesar de que ha habido varios intentos para aumentar la carga de relleno, en todos los casos se ha comprometido el concepto ideal de un relleno de resina homogéneo con *sílice coloidal disperso*. Sin embargo, el método más usual para aumentar la carga de relleno es realizar nuevas partículas triturando una resina compuesta prepolimerizada que tenga una gran carga de partículas de *sílice coloidal*. Las partículas de este material con gran cantidad de microrrelleno se incorporan a la pasta de resina para producir un material de obturación con unas características de manipulación aceptables. El contenido final de relleno inorgánico solo es del 50% en peso, aunque si contabilizan las partículas de resina compuesta prepolimerizada como partículas de relleno, este contenido puede alcanzar del 80% en peso, aproximadamente el 60% en volumen. Esto hace que las propiedades sean de forma general, inferiores a las resinas de partículas pequeñas ya que no hay una buena unión entre partículas prepolimerizadas y la matriz (14). Clínicamente estas resinas se comportan mejor en la región anterior, donde



las ondas y la tensión masticatoria son relativamente pequeñas, proporcionan un alto nivel de pulido y brillo superficial, por lo que confieren alta estética a la restauración (48). Sin embargo, debido a sus inferiores propiedades mecánicas y físicas, muestran desventajas cuando se aplican en la región posterior, ya que, presentan mayor porcentaje de sorción acuosa, alto coeficiente de expansión térmica y menor módulo de elasticidad (49).

#### **4.- Resinas híbridas.**

En principio, cualquier resina con dos o más tamaños de relleno se puede considerar como *híbrida*, así como aquellas que contienen fibras y/o rellenos de nanopartículas.

La mayoría de las resinas compuestas modernas que usan rellenos en el rango de las micras, contienen pequeñas cantidades (< 5% en peso) de microrrellenos para que la pasta adquiera viscosidad adecuada. Las resinas compuestas híbridas empleadas con mayor frecuencia desde el año 2000, normalmente son aquellas que contienen rellenos con un tamaño medio de partículas de aproximadamente 0,5 a 1  $\mu\text{m}$  junto con un 10 a un 15% de microrrelleno. Las partículas de relleno más modernas las constituyen el *sílice coloidal* y las *partículas de vidrio triturado* que contienen metales pesados, lo que aporta un contenido total de relleno aproximadamente del 75 – 80% en peso. En este grupo incluimos las *resinas fluidas* y las mal llamadas condensables, que preferimos designar como de cuerpo pesado o alta viscosidad. Las propiedades oscilan entre las de las resinas tradicionales y las resinas de partículas pequeñas (14).

Se caracterizan por disponer de gran variedad de colores presentando además, gran capacidad de mimetización con la estructura dental y excelentes características de pulido y texturización. Mecánicamente, sufren menor contracción de polimerización, y presentan una baja sorción acuosa, Además presentan un grado de abrasión, desgaste y un coeficiente de expansión térmica muy similar al experimentado por las estructuras dentarias. Comercialmente encontramos fórmulas para uso universal, es decir, útiles tanto en el sector anterior como en el posterior, con diferentes grados de opacidad y translucidez, en diferentes matices y presentan fluorescencia (50-52).



## 5.- Híbridos Modernos.

Este tipo de resinas tienen un alto porcentaje de relleno de *partículas sub-micrométricas* (más del 60% en volumen). Su tamaño de partícula reducida (desde 0.4 $\mu$ m a 1 $\mu$ m), unido al porcentaje de relleno, provee una óptima resistencia al desgaste y otras propiedades mecánicas adecuadas. Sin embargo, estas resinas son difíciles de pulir y el brillo superficial se pierde con rapidez (53).

## 6.-Resinas de Nanorelleno.

El término *nanotecnología*, fue acuñado por el *Prof. Kerie E. Drexler*, investigador, conferencista y escritor sobre *nanotecnología*. Es una ciencia que se distingue principalmente por la escala a la que actúa. En términos simples, es ingeniería a nivel atómico o molecular. Este tipo de resinas se han desarrollado de manera reciente, y contienen partículas con tamaños menores a 10 nm (0.01 $\mu$ m). Este relleno se dispone de forma individual o en grupos, "*nanoclusters*" o *nanoagregados* de aproximadamente 75 nm (41). La *nanotecnología* en las resinas compuestas ofrece propiedades como una elevada translucidez y un pulido superior, similar a las resinas de microrelleno. El porcentaje de relleno oscila alrededor del 90% en peso, con una contracción de polimerización del 1,57%. Presentan una fuerza y resistencia al desgaste significativamente alta, equivalente a las *resinas híbridas*, con excelente estética y alta estabilidad del color. Además presentan un modelado óptimo, ya que el material no se pega al instrumento. (Fig. 15 y Fig. 16) (14, 48, 49, 54, 55). Las *nanopartículas* debido a su tamaño no reflejan la luz, ya que las ondas de luz las atraviesan sin reflejarse en ellas. Así, cuando se añaden a los composites, no alteran su opacidad ni translucidez. Las *nanopartículas*, debido al *efecto cuántico*, no se comportan como sólidos sino como líquidos. Al ser transparentes y comportarse como líquidos, no podrían ser utilizadas como material de relleno, por lo que se acompañan con partículas más grandes entre 0.7 micrones. Estas, actúan como soporte, y dan viscosidad al material, proporcionando el color, la opacidad y la radiopacidad a este tipo de resinas. Por estas razones, un sólo material tiene aplicaciones, tanto en el sector anterior como en el posterior, para todas las clases de cavidades.

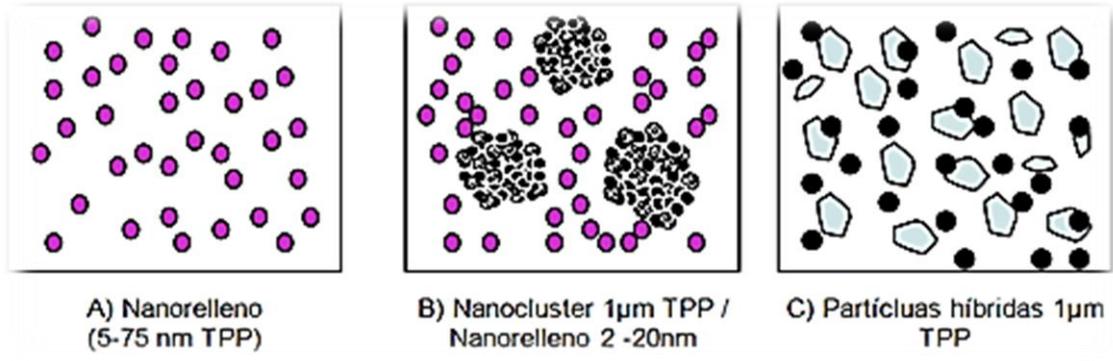


Fig. 15 Esquema de la tecnología del nanorelleno. A) Partículas nanométricas, B) Partículas nanoclusters, C) Partículas híbridas. TPP: Tamaño promedio de las partículas. Tomado de Rodríguez D, Pereira N, 2008)

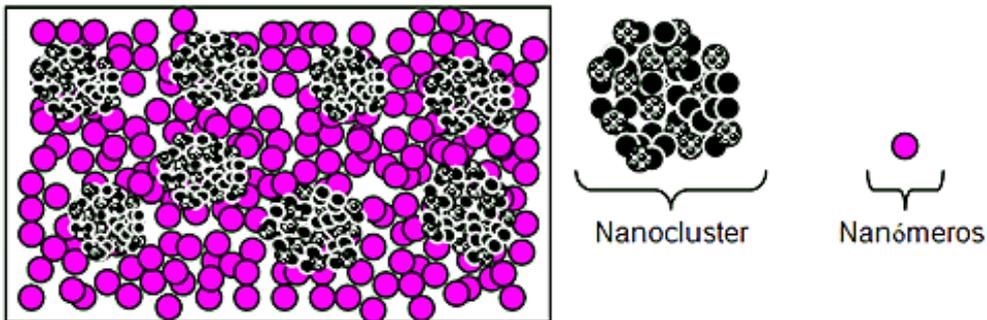


Fig. 16 Disposición de las partículas en una resina de nanorelleno.



Tipo de resina	Tamaño del relleno ( $\mu\text{m}$ )	Material de relleno
Macrorrelleno	1 – 50	Cuarzo o vidrio
Partículas Pequeñas	0,5 – 3	Vidrio y sílice coloidal
Microrrelleno	0,01 – 0,05	Sílice coloidal y rellenos prepolimerizados
Híbrida	0,5 – 1	Vidrio y sílice coloidal
Híbridos modernos	0,4 – 1	Vidrio, zirconio y sílice coloidal
Nanorrelleno	< 0,01 (10nm)	Sílice o zirconio

Tabla 3 Principales tipos de resinas compuestas. (Adaptado de (Anusavice K. et al. 2004).

### 3.3.-Otras resinas compuestas.

#### A) Resinas compuestas de baja viscosidad o fluidas.

Surgen como una modificación de las *resinas compuestas de partículas pequeñas* y las *resinas híbridas*. La primera generación de este tipo de resinas data de 1996. Son resinas a las que se les ha disminuido el porcentaje de relleno inorgánico, lo que las hace más susceptibles al desgaste. A su vez, se han agregado a la matriz algunas sustancias o modificadores reológicos (diluyentes) para de esta forma disminuir su viscosidad (56). Entre sus ventajas destacan: una alta capacidad de humectación de la superficie dental (asegurando la penetración en todas las irregularidades) (57), tienen el potencial de fluir en pequeños socavados, puede formar espesores de capa mínimos, lo que previene el atrapamiento de burbujas de aire (58), tiene una alta elasticidad o bajo módulo elástico (3,6 - 7,6 GPa), creando una capa elástica entre la dentina y el material restaurador que puede absorber la contracción de polimerización. De esta forma, se asegura la continuidad en la superficie adhesiva y se reduce la posibilidad de desalajo en áreas de concentración de estrés (59).



Aunque este tipo de resinas posee una alta contracción de polimerización (4 a 7 %), su gran elasticidad es un factor que contrarresta el esfuerzo interfacial. Sin embargo, la mayoría de estos materiales presentan una radiopacidad insuficiente (53), lo que puede producir confusión a la hora de determinar la presencia de caries recurrente. Estos materiales estarían indicados para: restauraciones de clase V, restauraciones oclusales mínimas o bien como materiales de base cavitaria (21, 60, 61). Este último es un aspecto controvertido, ya que las resinas fluidas no satisfacen el principal propósito de las bases cavitarias, que es la protección del complejo dentino-pulpar (62).

### **B) Resinas compuestas de alta viscosidad, condensables, de cuerpo pesado, compactables o empacables.**

Se introdujeron a finales de la década de los 90. Las resinas compuestas de alta viscosidad, son resinas con un alto porcentaje de relleno. Este tipo de resinas han sido llamadas erróneamente "*resinas condensables*", ya que no disminuyen su volumen al compactarlas, sino que ofrecen una alta viscosidad que trata de imitar la técnica de colocación de las *amalgamas de plata*. La consistencia de este tipo de materiales permite producir áreas de contacto más estrechas, con la banda matriz que los logrados con los materiales de viscosidad estándar en restauraciones de clase II (63). Para lograr esta característica, se desarrolló un compuesto denominado *PRIMM (Polimeric Rigid Inorganic Matrix Material)*, formado por una resina *Bis-GMA o UDMA* y un alto porcentaje de relleno (superior a un 80% en peso) de partículas irregulares de cerámica (*Alúmina y Bióxido de Silicio*). Estas partículas de relleno fibrosas y alargadas tienen aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de longitud que junto a superficies texturizadas presentan gran capacidad de engranaje y resistencia a la fluidez. De esta forma, se reduce la cantidad de matriz de resina aumentando su viscosidad y creando esta particular propiedad que las diferencia de las resinas híbridas convencionales en su manejo clínico. Estas resinas son relativamente resistentes al desplazamiento durante la inserción y su comportamiento físico-mecánico es superior al de las resinas híbridas (64). No obstante, su comportamiento clínico es similar muy similar (65).

Como principales inconvenientes, destacan: la difícil adaptación entre una capa de resina y otra y con ello su dificultad de manipulación y la poca estética que ofrecen en



los dientes del sector anterior. Un aspecto que se debe tener en cuenta es la forma de polimerización de este tipo de resinas, ya que se han obtenido mejores resultados con la técnica de polimerización retardada (66). En un principio, los fabricantes manifestaron que se podían colocar en capas de 5 mm. Clínicamente resultó no ser así, ya que se producía una gran contracción, en contra de lo que podría esperarse dado su alto porcentaje de carga, generando un gran estrés tensional y la consecuente separación entre el material y el tejido dentario, originando filtraciones.

Para obtener mejores resultados, se debería utilizar una resina fluida como base. La resina fluida, al poseer un bajo módulo de elasticidad, escurre mejor, creando una mayor humectación y mejor adaptación, a la vez que alivia la tensión, compensando el estrés de contracción de polimerización de la resina de alta viscosidad. Estas resinas, estarían indicadas para la restauración de cavidades de clase I, II y VI (67).

### **C) Resinas de baja contracción de polimerización.**

Con la finalidad de reducir la contracción de polimerización, se han propuesto gran variedad de monómeros, entre ellos, los llamados monómeros con capacidad de expansión, como los *espiroortocarbonatos (SOC)* que se introdujeron en el mercado dental en la década de los 70, aunque no se popularizaron (68).

Del mismo modo, Stansbury desarrolló los *monómeros SOC*, junto a un núcleo de dimetacrilato (SOCs), con la finalidad de reducir la contracción de polimerización y mejorar el grado de conversión de los composites, mediante el mecanismo de expansión polimérica y un sistema de polimerización paralelo de radicales libres (69).

Simultáneamente *Byerley y Eick*, sintetizaron *SOCs unido a un núcleo de oxirano*, capaz de producir polimerización catiónica que también ayudaba a compensar la contracción de polimerización y mejoraba considerablemente el grado de conversión de los composites (70, 71).



*Krenkel y col.* presentaron un sistema experimental de resinas compuestas, cuya matriz orgánica se basaba en *monómeros SOC, diepoxi y un grupo polyol*, capaz de reducir el *estrés de polimerización* al ser comparado con un sistema de resinas patentado (*Z100*) (72). A pesar de que ambos sistemas eran compatibles desde el punto de vista químico, no se comercializaron ya que el grado de conversión o índice de curado total del sistema *SOC* es menor que el sistema convencional de *dimetacrilatos* (73). No obstante, estos índices pueden mejorar modificando la fotorreactividad del *sistema SOC* y añadiendo promotores de la reacción (74). Por su parte, *Condon y col.*(75) y *Freilich y col.* (76), concluyeron que las combinaciones de *sistemas Epóxicos-Polyoles*, muestran *in vitro*, cambios volumétricos durante el proceso de polimerización entre un 40 y un 50% menores a los obtenidos con los sistemas tradicionales (*BisGMA/TEDGMA*) (75-77). Además, poseen propiedades mecánicas similares a las resinas tradicionales y menor capacidad de sorción acuosa (78).

Otra alternativa es el *silorano*. Se trata de una resina experimental de naturaleza hidrofóbica desarrollada por *3M ESPE*, derivada de la combinación de los componentes químicos básicos de los *siloxanos* y los *oxiranos (grupos epóxicos)* (79). La estructura del *siloxano* se introdujo para dotar de una naturaleza más hidrofóbica al *silorano*. De este modo, se reduce considerablemente la sorción acuosa del medio bucal, mejorando sus propiedades físicas, a la vez que se absorben menos los colorantes de la dieta y por lo tanto son mucho menos sensibles a las pigmentaciones exógenas (80).

Hay que destacar que la red de los *siloranos* se crea debido a un proceso de polimerización por apertura de anillos de los *oxiranos*. Se trata de una *polimerización catiónica*. Esta polimerización empieza cuando un *catión ácido* abre un *anillo oxirano* y genera un nuevo centro ácido (un carbocatión). El *anillo de oxirano* abierto forma entonces una cadena de dos monómeros multifuncionales (77). Este tipo de polimerización, por apertura de anillo, ocurre con una contracción muy baja, mostrando valores menores al 1% (81). Esta propiedad, representa una ventaja clínica evidente, ya que minimiza la posibilidad de formación de brechas marginales que conllevarían a la microfiltración. Aunque este material aún está en fase experimental, los resultados son muy alentadores, ya que presentan valores de contracción y estrés de polimerización



más bajos, cuando es comparado con los metacrilatos y mayor estabilidad en luz ambiental (82).

Igualmente, los *siloranos* revelan propiedades físicas comparables a las resinas compuestas basadas en *metacrilato* y los resultados toxicológicos en general sugieren que los *siloranos* son biocompatibles (83). Esta tecnología representa un gran paso al futuro en la ciencia de los materiales y una mejora significativa para la odontología restauradora.

Otra línea de investigación paralela en el campo de los polímeros de uso odontológico, son los *sistemas basados en vinilciclopropanos, oligómeros difuncionales y multifuncionales ciclopimerizables*, que similar a los sistemas anteriores, mejoran el grado de conversión de las resinas compuestas y reducen su contracción de polimerización, aunque existe escasa información publicada al respecto (39, 84-90).

Según estudios *in vitro*, el uso de moléculas de alto peso molecular, como el *multi-etilglicol-dimetacrilato* y los *copolímeros*, pueden llegar a lograr una conversión entre el 90-100%. Este fenómeno parece ser el resultado de la reducción considerable de uniones de doble enlace de carbonos (C=C) (91).

Un adelanto notable a destacar, es el desarrollo de los *ormóceros* basados en un sistema de moléculas híbridas (orgánica-inorgánica), *uretanos multifuncionales, thio-etermetacrilato* y *alkosiloxanos* (92).

El término *Ormocer* deriva de las siglas en inglés "*Organically Modified Ceramic*". En estos materiales se reemplaza la matriz de *Bis-GMA/TEGDMA* por otra donde copolimerizan monómeros inorgánicos (material vidrio-cerámico con matriz vítrea) con monómeros orgánicos. Se obtiene primero una columna, sintetizando un polímero inorgánico (*polisiloxano, alkoxisilano*) en un proceso sol-gel que polimeriza moléculas o monómeros de *tetraóxido de silicio* (monómeros inorgánicos cerámicos). A esta columna, se le agregan grupos orgánicos (*dimetacrilatos*, con capacidad de polimerizar por adición de radicales libres), obteniendo así la molécula de *Ormocer* (93).

De esta forma, se obtiene una matriz cerámica y orgánica y con moléculas de mayor peso molecular, lo que disminuye en gran medida la contracción de polimerización (94). Las moléculas de *Ormocer* son de hecho, de 1000 a 2000 veces más grandes que las



moléculas de *Bis-GMA*, lo que disminuye el porcentaje de contracción final de la matriz (95).

Otra ventaja de este sistema es la formación del 100% de doble enlaces, ya que, son moléculas con más sitios activos y capaces de generar uniones covalentes. Esto se traduce en mejoras en las propiedades mecánicas y biológicas al no quedar monómeros libres. A este tipo de formulación se debe el fenómeno de reducción de la contracción de polimerización (0.90 al 2%), el aumento del grado de conversión y las adecuadas propiedades físico-mecánicas de éstos sistemas, en comparación con los sistemas convencionales (96, 97). Este material es fabricado y distribuido comercialmente por *VOCO GmbH* (Alemania) y es conocido con el nombre de *Admira* (98).

#### **D) Resinas de empaquetado en masa o bulk fill.**

Surgen para solventar el problema de tener que aplicar incrementos de composite de 2 en 2 mm, para una correcta polimerización de los materiales, lo que hace que el procedimiento para grandes cavidades sea tedioso. Los composites para dientes posteriores tipo *Bulk Fill* se pueden aplicar en capas de hasta 4 mm antes de su polimerización. Junto a los fotoiniciadores más usados, la *canforoquinona* y la *lucerina*, se puede emplear además el iniciador de polimerización llamado *ivocerin*. Éste resulta mucho más reactivo y con capacidad de ser activado en las cavidades profundas.

Los monómeros más utilizados que forman la matriz son: la resina *dimetacrilato de uretano modificada*, el *Dimetacrilato Bisfenol A etoxilado (EBPADMA)*, el *bisEMA*, y las resinas *Procrylat* y *Trietileneglicol dimetacrilato (TEGDMA)* (6).

En cuanto al proceso de polimerización de los composites, una característica importante es la translucidez del material empleado. De este modo, cuanto más oscuro y opaco sea, menor será la profundidad de polimerización, ya que a los iniciadores les llega menos luz. Esto hace que los composites *bulkfill*, por lo general, estén disponibles en un solo tono universal semitranslúcido o en tonos claros.

Esta característica, limita las propiedades estéticas de este tipo de materiales. De este modo, cuando el ángulo cavo superficial se encuentra en la superficie oclusal o la extensión de la caja proximal se encuentra en una zona visible, se podría apreciar la transición entre el diente y el material restaurador. Así mismo una dentina muy teñida puede ser visible a través del material polimerizado. En estos casos se debe utilizar un



color apropiado o un material restaurador opaco con el adecuado espesor en las zonas visibles. Debemos tener en cuenta, por tanto que en el empleo de estos composites, hay que dejar al menos 2 mm para la posterior colocación del material elegido para la superficie oclusal.

Para las capas de 4 mm de profundidad, se debe usar una luz visible apropiada, con un espectro de salida de 470 nm. La potencia debe tener una exposición desde 550mW/cm<sup>2</sup> como mínimo a 1.100 mW/cm<sup>2</sup> como máximo, durante 10, 20 ó 40 segundos dependiendo del fabricante y del color.

Se han integrado unos mitigadores de estrés en la composición del relleno que gracias a su bajo módulo de elasticidad, actúan como muelles microscópicos durante la polimerización, reduciendo el estrés de contracción. Esto permite un óptimo sellado marginal.

Suelen ser *composites nanohíbridos*. Los rellenos utilizados en su composición son el *óxido de zirconio / sílice* con un tamaño de partícula de 0,01 a 3,5  $\mu$  y el *Trifluoruro de iterbio* (YbF<sub>3</sub>) para aumentar la radiopacidad, con un rango de tamaño de partícula de 0,1 a 5,0  $\mu$ . La carga de relleno inorgánico es aproximadamente 65-68% en peso y el 38-44% en volumen.

### 3.4-Propiedades de las resinas compuestas.

#### 1.- Resistencia al Desgaste.

Junto con la contracción de polimerización, es el problema clínico más frecuente que presentan (Fig. 8), y se define como la capacidad que poseen las resinas compuestas de oponerse a la pérdida superficial, como consecuencia del roce con la estructura dental, el bolo alimenticio o elementos tales como cerdas de cepillos y palillos de dientes (36). Cuando esta propiedad es deficiente, no supone un efecto perjudicial inmediato, pero lleva a la pérdida de la forma anatómica de las restauraciones y disminuye su longevidad (99). Esta propiedad depende del tamaño, la forma y el contenido de las partículas de relleno así como de la localización de la restauración en la arcada dental y las relaciones de contacto oclusales, a las que se verá sometidas (100). Cuanto mayor



sea el porcentaje de relleno, menor el tamaño y mayor la dureza de sus partículas, la resina tendrá menor abrasividad (101).

Las únicas pruebas que permiten evaluar de manera real la resistencia al desgaste de los materiales de restauración, son las evaluaciones clínicas con grupos control, y según éstas, las mejores resinas compuestas tienen una tasa de desgaste de 10 a 20  $\mu\text{m}$  al año. Éste desgaste que podría parecer pequeño, no lo es si consideramos que las resinas se desgastan alrededor de 0.1 a 0.2 mm más que el esmalte al cabo de 10 años(14).

*Leinfelder y col.* explican el fenómeno de la siguiente manera: la resina y las partículas de relleno, presentan módulos de elasticidad diferentes, siendo menor el módulo elástico de la resina. Además, las partículas que conforman el relleno son más resistentes al desgaste, de forma que comprimen la matriz en los momentos de presión (como las cargas cíclicas), lo que causa el desprendimiento de dichas partículas y del agente de conexión silano. Finalmente, el desprendimiento de las partículas, expone la matriz, que es más susceptible al desgaste. Este fenómeno de pérdida de partículas superficiales, se conoce como "*plucking out*" (102).

Se han propuesto dos mecanismos principales del desgaste de la resina compuesta, dependiendo de las zonas anatómicas implicadas:

- El primero, el *desgaste de dos cuerpos*, se basa en el contacto directo de la restauración con una cúspide antagonista o con una superficie proximal adyacente, de manera que se generan altas tensiones en pequeñas zonas de contacto. El proceso de desgaste en esta zona anatómica, se debe a los grandes niveles de fuerza ejercidos por las cúspides antagonistas o por la fuerza transmitida a la superficie proximal.
- La pérdida de material en las áreas libres de contacto se debe probablemente al contacto con el bolo alimenticio, cuando se está moviendo sobre la superficie oclusal. Se trata de un *desgaste de tres cuerpos*, que puede estar controlado de forma compleja por las propiedades de la resina compuesta, como la tenacidad, porosidad, estabilidad del agente de conexión, grado de conversión del monómero, carga de relleno y la forma y tamaño de las partículas de relleno. En este proceso de desgaste también desempeñan un papel importante, las



variaciones propias entre los pacientes, como los diferentes hábitos masticatorios, los diversos niveles de fuerza y las variaciones propias del medio oral. La *figura 17*, muestra un patrón de desgaste típico, en una restauración de resina compuesta de partículas pequeñas tras 9 años de uso.



*Fig. 17*

*Fotografía al MEB de una resina compuesta de partícula pequeña con nueve años de uso.*

*Tomado de Anusavice K, et al, 2004.(14)*

A nivel clínico, la pérdida de material causada por el desgaste directo en las zonas de contacto entre dos dientes es mayor que la que se produce en las zonas libres por causa del contacto con la comida. Las resinas compuestas de partículas pequeñas, con gran carga de partículas y con el relleno correctamente adherido a la matriz, son las más resistentes al desgaste. Las restauraciones grandes, se despegan más que las pequeñas, y por tanto más en molares que en premolares (14).

## **2.-Textura Superficial**

Se define como la uniformidad de la superficie del material de restauración (103). En las resinas compuestas, la textura de la superficie está relacionada en primer lugar con el tipo, tamaño y cantidad de las partículas de relleno y en segundo lugar con el empleo de técnicas correctas de acabado y pulido. Una resina rugosa favorece la acumulación de placa bacteriana y puede actuar como irritante mecánico especialmente en las zonas próximas a los tejidos gingivales (104). Mediante la fase de acabado y pulido de las restauraciones se logra una menor carga superficial y se elimina la capa inhibida,



evitando o minimizando la adhesión de placa bacteriana, lo que prolonga en el tiempo la restauración de resina compuesta (99). Las resinas compuestas de nanorelleno, tienen un excelente pulido, lo que proporciona un alto brillo superficial (43).

### **3.-Coeficiente de Expansión Térmica.**

Es la velocidad de cambio dimensional, por unidad de cambio de temperatura (105). Cuanto más se aproxime el coeficiente de expansión térmica de la resina al coeficiente de expansión térmica de los tejidos dentarios, habrá menos probabilidades de formación de brechas marginales entre el diente y la restauración, al cambiar la temperatura (106). Un bajo coeficiente de expansión térmica se asocia con una mejor adaptación marginal. Las resinas compuestas, presentan un coeficiente de expansión térmica unas tres veces mayor que el de la estructura dental. Esta diferencia es significativa, teniendo en cuenta que las restauraciones pueden verse sometidas a cambios de temperatura que van desde los 0° C hasta los 60° C (107).

### **4.-Sorci3n Acuosa (adsorci3n y absorci3n) y Expansi3n Higrosc3pica.**

Esta propiedad est3 relacionada con la cantidad de agua adsorbida por la superficie y absorbida por la masa de una resina en un tiempo determinado y la expansi3n relacionada a esa sorci3n (100). La incorporaci3n de agua en la resina, puede causar solubilidad de la matriz afectando negativamente a las propiedades de la resina, lo que se conoce como degradaci3n hidrol3tica (108). Dado que la sorci3n es una propiedad que afecta a la fase org3nica, cuanto mayor sea la proporci3n de relleno inorg3nico, menor ser3 la sorci3n de agua (14, 109, 110). La expansi3n relacionada con la sorci3n acuosa (expansi3n higrosc3pica) es capaz de compensar la contracci3n de polimerizaci3n. Los estudios de *Yin*, mostraron que las resinas h3bridas proporcionan baja sorci3n acuosa (47).

### **5.-Resistencia a la Fractura**

Se considera como la tensi3n necesaria para provocar una fractura (resistencia m3xima). Las resinas compuestas presentan diferentes resistencias a la fractura lo que depende en gran medida de la cantidad de relleno. Las resinas compuestas de alta viscosidad presentan alta resistencia a la fractura debido a que absorben y distribuyen mejor el impacto de las fuerzas de masticaci3n (111).



## **6.-Resistencia a la Compresión y a la Tracción**

Mide la máxima fuerza que un material puede resistir al sufrir compresión o estiramiento antes de su rotura. Las resistencias a la compresión y a la tracción son mejores cuanto más similares son a la dentina. Son propiedades relacionadas con el tamaño y el porcentaje de partículas de relleno: a mayor tamaño y mayor porcentaje de partículas de relleno, mayor resistencia a la compresión y a la tracción (112).

## **7.-Módulo de elasticidad**

El módulo de elasticidad indica la rigidez de un material. Un material con un módulo de elasticidad elevado será más rígido (menos elástico), mientras que un material con un módulo de elasticidad bajo es más flexible. En las resinas compuestas esta propiedad igualmente se relaciona con el tamaño y porcentaje de las partículas de relleno: a mayor tamaño y porcentaje de partículas de relleno, mayor módulo elástico. O lo que es lo mismo, conforme aumentamos el componente inorgánico en detrimento de la matriz orgánica, el composite es más rígido (106).

## **8.-Estabilidad del color**

Las resinas compuestas sufren alteraciones de color debido a manchas superficiales y decoloración interna. Las manchas superficiales están relacionadas con la penetración de colorantes provenientes principalmente de la alimentación y el consumo de tabaco, que pueden pigmentar la resina. La decoloración interna ocurre como resultado de un proceso de foto-oxidación de algunos componentes de las resinas, como las aminas terciarias (113). Es importante destacar que las resinas fotopolimerizables son mucho más estables al cambio de color que las que se activan de forma química (114).

## **9.-Radiopacidad**

Las resinas compuestas son radiolúcidas por sí mismas. Los materiales de restauración de resina deben incorporar *elementos radiopacos, como bario, estroncio, circonio, zinc, iterbio, itrio y lantano*, que permitan interpretar en un examen radiográfico la presencia de caries alrededor o debajo de la restauración. Para lograr un óptimo contraste que facilite el diagnóstico, la radiopacidad de la restauración debe ser casi igual a la del esmalte, es decir, dos veces la de la dentina. Por otro lado, cuando la radiopacidad es

excesivamente mayor que la del esmalte, se puede llegar a enmascarar la presencia de zonas radiolúcidas en la interfase o incluso la existencia de caries secundarias (14).

### 10.-Contracción de Polimerización

La contracción de polimerización es el mayor inconveniente que presentan estos materiales de restauración (115). Las moléculas de la matriz de una resina compuesta (monómeros) se encuentran separadas antes de polimerizar por una distancia promedio de 4 nm (distancia de unión secundaria). Al polimerizar, se establecen uniones covalentes entre dichas moléculas y esa distancia se reduce a 1.5 nm (distancia de unión covalente). Ese reordenamiento espacial de monómeros a polímeros provoca la reducción volumétrica del material (116).

La contracción de polimerización de las resinas es un proceso complejo que genera fuerzas internas en la estructura del material y que se traducen en tensiones en la interfase, cuando el material está adherido a las superficies dentarias (117).

Los sistemas de monómeros que actualmente se utilizan en la fabricación de resinas compuestas para uso dental, tienen una contracción de polimerización que oscila entre el 6.1% y el 14.3%. La contracción de polímeros por apertura de anillo, oscila alrededor del 1% (Fig.18).

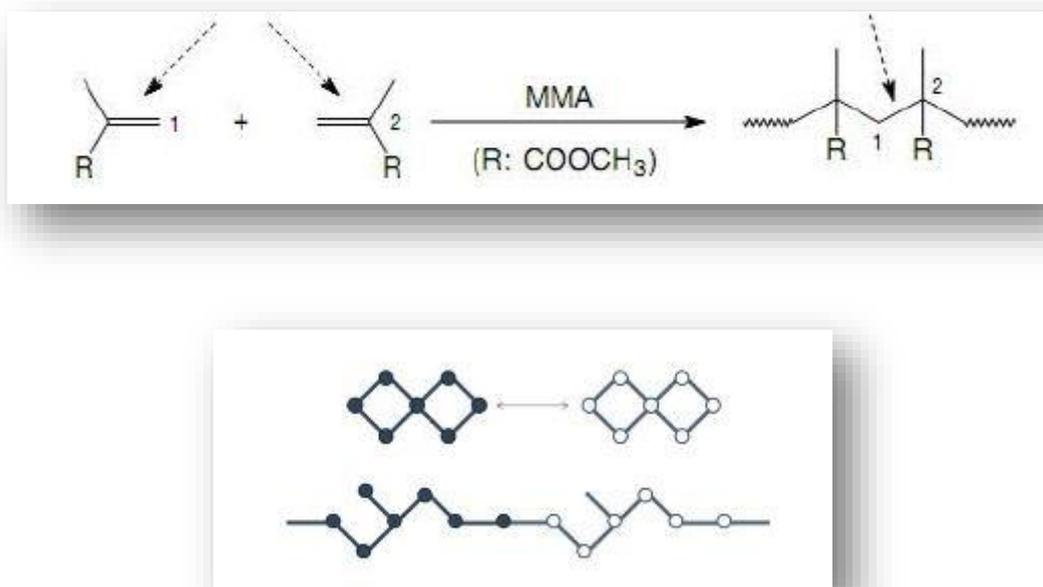


Fig. 18 Esquema general de la polimerización por apertura de anillos. Adaptado de Moszner N, Salz U.2001) (18)



Según *Chen y col*, las tensiones que se producen durante la *etapa pre-gel* (etapa de la polimerización donde el material puede aún fluir), pueden ser disipadas en gran medida con el flujo del material. Pero una vez alcanzado el punto de gelación, el material no fluye y las tensiones en su intento de disiparse pueden generar:

- a. *Deformación externa del material* sin afectar a la interfase adhesiva (cuando existen suficientes superficies libres o superficies donde el material no está adherido).
- b. *Brechas en la interfase* diente/restauración (cuando no existen suficientes superficies libres y cuando la adhesión no es adecuada).
- c. *Fractura cohesiva del material restaurador* (cuando la adhesión diente/restauración es buena y no existen superficies libres) (118).

La contracción por polimerización también está influida por otros factores como el modo de activación de la polimerización, así como los tipos y concentración de los iniciadores que regulan el grado de conversión y la cinética de la reacción. Cuanto más alto sea el grado de conversión de la resina, mayor será la contracción del polímero, generando un mayor estrés. De forma similar, una polimerización muy rápida del material implica que la matriz orgánica que está polimerizando tenga una gran cantidad de energía cinética. Éste movimiento acelerado de las moléculas, produce una rápida rigidez del polímero en formación, dando lugar a un desarrollo más rápido de estrés por contracción, que cuando se realiza el proceso de forma más lenta.

La contracción asociada a la cinética de reacción es mayor en los materiales que endurecen a través de fotoactivadores, debido al gran número de radicales libres que se generan. Esto se traduce en un mayor grado de conversión de moléculas. En comparación, con los materiales autopolimerizables, donde el número de radicales libres formados no es tan elevado, se producen menores valores de estrés por contracción (Tabla 4).



<b>Factor</b>	<b>Repercusión Clínica</b>
<i>Tiempo de polimerización</i>	<i>Depende del color del composite, potencia de la lámpara, profundidad de la cavidad, espesor de la capa, estructuras dentarias interpuestas y cantidad, tamaño, distribución dureza e índice de refracción del relleno</i>
<i>Color del composite</i>	<i>Los tonos más oscuros requieren mayor tiempo de polimerización (60 segundos a profundidad máxima de 0,5 mm)</i>
<i>Temperatura</i>	<i>El composite a temperatura ambiente polimeriza en menos tiempo</i>
<i>Espesor de la capa de composite</i>	<i>Se recomienda no trabajar con capas de más de 2 mm de espesor</i>
<i>Tipo de relleno</i>	<i>Cuanto más pequeña es la partícula peor polimeriza debido a la poca refracción de la luz</i>
<i>Distancia entre foco de luz y composite</i>	<i>Distancia óptima: &lt; 1 mm, con la luz perpendicular al material</i>
<i>Calidad del foco de luz</i>	<i>Longitud de onda entre 400 y 500 nm. La intensidad de la luz debe ser igual o mayor a 600 mW/cm<sup>2</sup> para asegurar un mínimo de 400 en el primer incremento de composite en cavidades del sector posterior</i>
<i>Contracción de Polimerización</i>	<i>Depende del %, tamaño, distribución y dureza del relleno, así como del tipo de resina que forma la matriz</i>

Tabla 4

*Factores que afectan el grado de conversión de las resinas compuestas.*

*Tomado de Hervas-Garcia A, et al 2006. (10)*



### 3.5-Modificaciones de las resinas compuestas.

#### **Monómeros Hidrofóbicos.**

*Sankarampandian y col.*, investigaron el proceso de sorción de agua, dureza y el módulo de elasticidad de varios sistemas *BisGMA* y análogos, a los que se les sustituyó un grupo fenílico del carbón central de su cadena por *fluorine*. Se encontraron que éste reducía la sorción de agua en un 10%. Además, observaron que los polímeros fluorinados eran más estables en contacto con el agua, aunque producían una disminución de la dureza y modificaban el módulo de elasticidad de los composites considerablemente (119).

Se han propuesto otros sistemas con la finalidad de disminuir la sorción de agua, entre estos se incluyen análogos químicos del *dimetacrilato de uretano (UDMA)*, que poseen un *grupo fenoximetil* en la porción periférica o central como grupo alifático (91, 120). Estos sistemas, al ser comparados con los sistemas habituales *UDMA*, consiguen reducir entre un 10-30% la sorción de agua. Sin embargo, presentan como efecto secundario una disminución de la resistencia comprensiva (121).

#### **Materiales Anticariogénicos.**

*Imazato y col.* son los pioneros en este campo de investigación, ya que han logrado desarrollar un monómero antibacteriano compatible con los sistemas de resinas compuestas, el *metacriloxydodecypiridium bromide (MDPB)*, capaz de inhibir el crecimiento de *streptococos mutans* sobre el material restaurador y en los márgenes cavo-superficiales (122). La adición de este monómero a la composición de los composites convencionales no modifica el grado de conversión, el estrés de polimerización, la sorción de agua, ni cualquier otra de sus propiedades físico-mecánicas (122-125).

#### **Polímeros Remineralizantes.**

Existe un gran interés en desarrollar biomateriales dentales que sean capaces de restablecer la matriz inorgánica que se ha perdido, por un proceso de desmineralización activo o pasivo. En esta línea, *Skrtic y col.*, desarrollaron un prototipo polimérico de restauración directa basado en fosfato de calcio, con la finalidad de que el material,



tuviese la capacidad de *liberar iones de fosfato y calcio* al entrar en contacto con el sustrato dentario (126). El problema es que estos compuestos son inestables y presentan propiedades mecánicas insuficientes (127).

Por otro lado, se estudió *in vitro* un *composite bioactivo con fosfato de calcio amorfo (ACP)*, capaz, mediante técnicas de hibridación de las matrices de la resina compuesta, de formar elementos vítreos al unirse con los complejos de *BisGMA, TEDGMA e hidroxietilmetacrilato (HEMA)*. Este material muestra una capacidad potencial de remineralización, aunque no posee las propiedades mecánicas suficientes para ser utilizado como material restaurador definitivo sin previas modificaciones en su constitución química (128).

No podemos olvidar mencionar los materiales sellantes de superficie, desarrollados por *Bohlig y col.* que actúan evitando la retención de placa dental sobre la restauración y la desmineralización de los márgenes cavosuperficiales, además de ser resistentes a la abrasión producida por el cepillado dental (129). Los grupos químicos más utilizados son *copolímeros del ácido acrílico*, como el *iso-butil-metacrilato* y los *polisiloxanos*, que parecen ser las formulaciones más estables (128, 130).

### **Reducción del estrés de polimerización**

La causa principal del fracaso de las restauraciones con resinas compuestas es el desarrollo de caries secundarias (85, 131-134). Este fenómeno según *Feilzer y col.* guarda relación directa con la contracción que sufre el composite (1.35 al 7%) durante el proceso de fotopolimerización (63, 135) (Fig. 10). La tensión generada durante el proceso de polimerización afecta la zona de interfase diente-material restaurador, siendo capaz de provocar *microcracks* o fallos de la unión (desadaptaciones microscópicas) (136). La magnitud del estrés de polimerización y la contracción total de la restauración, depende directamente del módulo de elasticidad, capacidad de fluir y deformación del composite, del uso de bases, del sistema de adhesión dental, y el método y sistema de fotocurado, entre otros (137).

El continuo desarrollo de los sistemas adhesivos dentales, ha disminuido la aparición de la brecha o microcracks en la zona de interfase (138). Sin embargo, sigue siendo necesario modificar las fórmulas químicas de los sistemas de resinas compuestas



convencionales, con el objetivo de reducir la sensibilidad de la técnica, y mejorar la versatilidad y las propiedades bio-físico-químicas de los composites (114, 139).

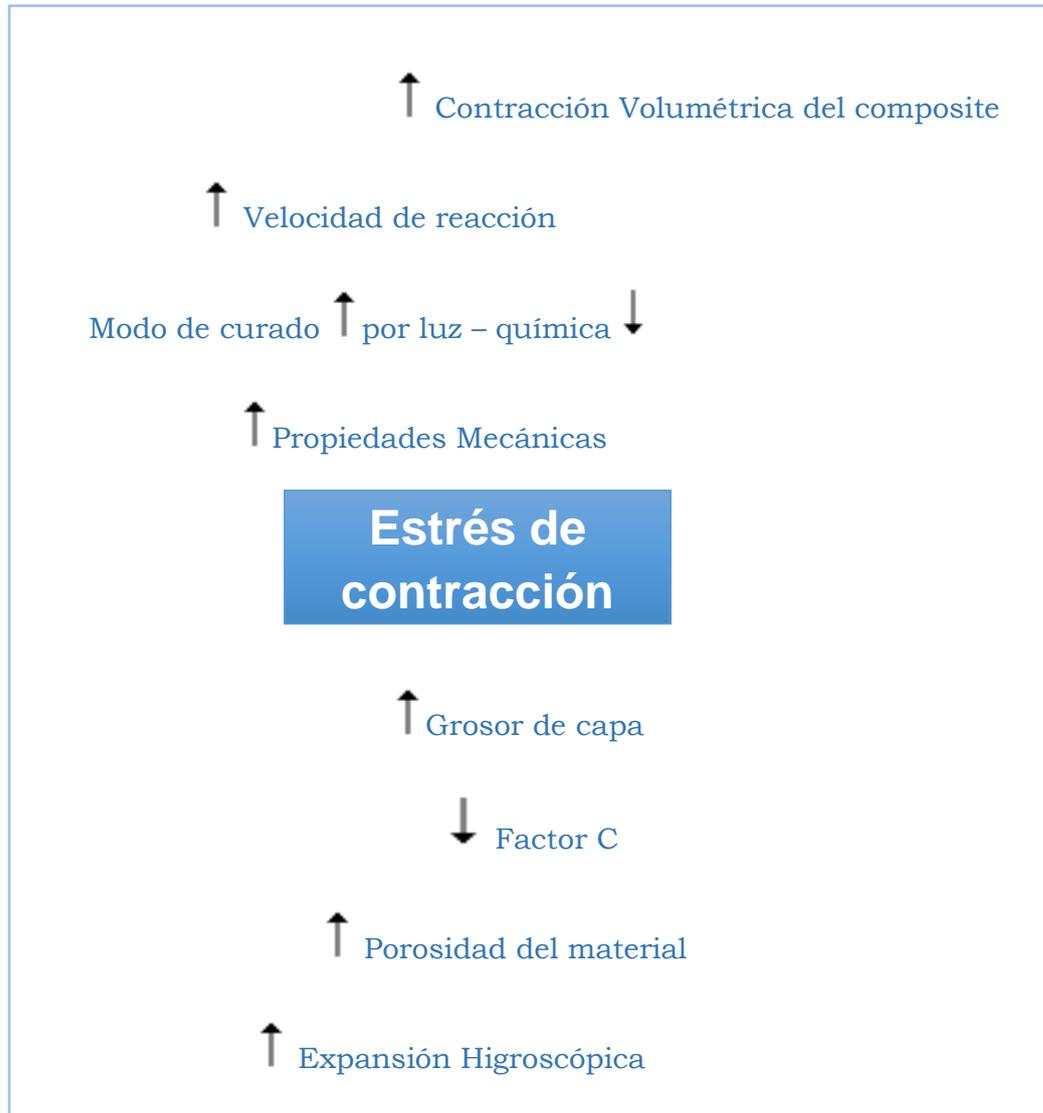


Fig. 19

Parámetros que influyen la formación de estrés ocasionado por la contracción por polimerización.

(Modificado de Moszner N, Salz U. 2001) (18).

El futuro de las resinas compuestas está marcado por cambios en la formulación química de los sistemas convencionales, mediante la hibridación molecular o el desarrollo de nuevos monómeros y/o copolímeros, con la finalidad de solucionar los inconvenientes o limitaciones que presentan hoy en día dichos materiales. Los



problemas a resolver se centran en la contracción de polimerización, el estrés causado por contracción, la estabilidad del color, el grado de conversión, la mejora de las propiedades físicas, mecánicas, radiológicas, y estéticas, y sin lugar a dudas una mejora en términos de biocompatibilidad.

#### **4.-Conceptos de citotoxicidad y biocompatibilidad.**

Para el correcto entendimiento de los fines de nuestro estudio experimental y la comprensión de los efectos biológicos que los dos materiales a estudio podrían tener durante su aplicación clínica, es fundamental diferenciar entre los conceptos de citotoxicidad y biocompatibilidad.

Es evidente que la Odontología es una ciencia en continuo estudio y evolución, como necesariamente sucede en cualquier otra rama de la medicina. La evolución de las técnicas clínicas y de los materiales utilizados es constante y necesaria para la mejora y optimización de nuestros tratamientos. No obstante, la gran cantidad de compañías y empresas dedicadas a la producción de los materiales empleados en clínica y su lógica implicación comercial, hacen que en muchas ocasiones, se introduzcan nuevos productos en el mercado con un mero afán comercial, y en ocasiones sin el respaldo científico adecuado. La Odontología, por el hecho de ser una rama que en su mayoría se desarrolla en la práctica privada, ha perdido la clara perspectiva sanitaria, primando en numerosas ocasiones la faceta comercial o mercantil, lo que supone un flaco favor al prestigio de una profesión donde la labor asistencial y sanitaria debería ser siempre el objetivo primordial (140).

Los materiales empleados en odontología restauradora o rehabilitadora: *resinas, adhesivos, cementos, materiales para la elaboración de prótesis...* deberían ser siempre correctamente evaluados antes de su utilización clínica generalizada. Los ensayos clínicos se realizan con tal fin. De hecho, la literatura nos ha mostrado ampliamente que la liberación de los monómeros de metacrilato procedentes de las resinas compuestas, así como de otros componentes de los sistemas de polimerización, pueden producir una gran variedad de reacciones biológicas adversas, que van desde la aparición de toxicidad local o sistémica, reacciones pulpares, hasta efectos alérgicos y estrogénicos



(141). Durante las fases de experimentación clínica podemos encontrarnos con pruebas *in vivo* e *in vitro*. Las pruebas *in vivo* se realizan sobre animales que posteriormente son biopsiados o bien son sacrificados y se les realiza una necropsia de los tejidos diana para comprobar los resultados. La mayor ventaja de este tipo de estudios, es que permite estudiar los efectos acumulativos y a distancia sobre cualquier órgano y no solo sobre unas determinadas células. Por contra, supone la realización de pruebas caras, largas y de difícil control. Si bien son pruebas más completas, debemos tener en cuenta que existe, además, cierto rechazo a este tipo de experimentación animal en la sociedad actual (142).

Por este motivo las pruebas de toxicología en ensayos *in vitro*, constituyen una alternativa necesaria para el correcto conocimiento del comportamiento de materiales que van a ser utilizados en íntimo contacto con el organismo de nuestros pacientes. El estudio de los materiales dentales es por tanto fundamental por el hecho de utilizar productos con componentes tóxicos, que podrían dañar los tejidos circundantes, impedir los procesos de curación o reparación y producir respuestas alérgica (143).

De forma habitual se realizan cultivos celulares, para poner en contacto diferentes líneas celulares con los materiales objetos de estudio a fin de contabilizar en un periodo de tiempo determinado, las tasas de proliferación y muerte celular (toxicidad).

### **1.-Citotoxicidad:**

Podemos definir citotoxicidad, como una alteración de las funciones celulares básicas, de forma que se produce una modificación o daño, que puede ser detectada (144).

Un *ensayo de citotoxicidad*, es una prueba toxicológica que utiliza diversos mecanismos celulares conocidos, para conseguir interpretar los efectos que genera una determinada sustancia, objeto de estudio, en contacto con diversas líneas celulares u órganos. De esta forma se pueden medir alteraciones en cuanto a cambios estructurales de la célula, alteraciones en la proliferación celular o alteraciones en alguna de sus funciones. Se miden cambios en la *integridad de la membrana, degradación de alguno de sus componentes, metabolismo, liberación de diversos constituyentes celulares, regulación iónica y división celular*.



Los ensayos de citotoxicidad *in vitro*, se utilizan para evaluar que un determinado producto o material no ejerza efectos tóxicos sobre células vivas.

Podemos encontrar diferentes tipos de ensayos para su medición, dentro de los cuales tenemos: *ensayo de captación del rojo neutro*, *ensayo de enlazamiento al azul de kenacid* y el que nosotros hemos utilizado para la realización de nuestra fase experimental, el ensayo conocido como MTT.

## 2.-Biocompatibilidad:

Según la *Sociedad Europea de Biomateriales*, biocompatibilidad, es la habilidad de un determinado material de actuar con una respuesta al huésped adecuada, cuando dicho material se emplea en una aplicación específica. Se denomina biomaterial y se utiliza para interactuar con los sistemas biológicos, induciendo una actividad biológica específica. Se trata de un material que va a ser implantado con el objetivo de sustituir o regenerar tejidos vivos y sus funciones dentro del cuerpo humano.

La biocompatibilidad de un dispositivo médico implantable, a largo plazo, se refiere a la capacidad del dispositivo para llevar a cabo su función prevista, con el grado deseado de incorporación en el huésped y sin provocar efectos locales o sistémicos indeseables. Un material biocompatible no solo debe promover la reparación tisular, sino que también debe ayudar o estimular la reorganización de los tejidos dañados (145).

Podemos decir por tanto, que la biocompatibilidad es la habilidad de un material para funcionar en una aplicación específica y con una respuesta apropiada del huésped. Según la normativa *ISO14971:2012*, un material biocompatible debe estar libre de todo riesgo. Así, la biocompatibilidad de los materiales engloba diversos parámetros, como la *citotoxicidad*, *genotoxicidad*, *carcinogenicidad*, *histocompatibilidad* y la *producción de efectos antimicrobianos*. (146).

Idealmente debe ser un material **bioinerte**, es decir, que tenga la capacidad de adaptarse y aguantar largos periodos de tiempo sin verse afectado por el medioambiente bucal, que se caracteriza por frecuentes cambios de PH, interacción continuada con diversos iones, ácidos, alimentos de diversa consistencia y textura y una microflora característica, así como las cargas funcionales consecuencia de funciones como la masticación, e incluso la presencia de parafunciones como el bruxismo.



No obstante, podemos diferenciar los biomateriales en tres grupos, según su función en boca:

- **Bioinertes:** una vez implantados, deben resistir largos periodos de tiempo, bajo una serie de condiciones especiales como las propias del medioambiente bucal. Aquí nos encontramos con materiales como el titanio usado en cirugía bucal y maxilofacial, los propios composites, el zirconio...etc.
- **Bioabsorbibles:** son materiales diseñados para degradarse de forma gradual, y ser reemplazados por tejidos del huésped. Aquí nos encontramos con las suturas reabsorbibles, las membranas de colágeno o los sustitutos óseos utilizados en las cirugías regenerativas.
- **Bioactivos:** son materiales diseñados para reaccionar e interactuar con los tejidos locales y formar enlaces entre ellos. Encontramos las superficies tratadas de los implantes dentales (*superficies bioactivas*), y materiales que liberan sustancias al medio. Actualmente y cada vez más, se buscan materiales que además de ser inocuos y biocompatibles, sean activos con el medio dónde actúan, favoreciendo o potenciando la respuesta del huésped.

La biocompatibilidad se puede medir a distintos niveles:

- En cuanto a la *interacción de los materiales a estudiar* y los tejidos biológicos.
- En cuanto a las consecuencias de la *degradación del material*.
- En cuanto a *propiedades mecánicas* como la elasticidad, tenacidad, resistencia...etc.

Los estudios de biocompatibilidad siguen generando cierto grado de controversia, debido a las limitaciones que tienen los estudios *in vitro* o en modelo animal, a la hora de extrapolar los resultados a nivel clínico. Por eso los estudios basados en la práctica clínica, así como los basados en bases de datos de los clínicos cada vez son de mayor importancia como complemento a los ensayos clínicos. No obstante, estos por si solos, también son de dudosa utilidad. Podemos decir por tanto, que hoy día debería de encontrarse un equilibrio entre ambos tipos de estudios para poder avalar el uso de materiales nuevos en odontología (147).



## 5.- Evolución de los cultivos celulares

El cultivo celular, es una técnica que se basa en la obtención de células individuales en suspensión, a partir de un tejido, ya sea por métodos mecánicos o enzimáticos y su posterior incubación en un medio líquido o sólido (148). La técnica consiste en la utilización de células animales de diferentes órganos, colocándolas en unas condiciones especiales que sean propicias para su supervivencia y proliferación, manteniendo sus funciones metabólicas de una manera semejante a las que tenían en el huésped.

El cultivo de tejidos se desarrolló a partir de los últimos años del siglo XIX como una continuación de las técnicas usadas en embriología.

En 1866 *Rechlinhausen*, consiguió mantener vivas células sanguíneas de anfibio y en el 1885, *Wilhem Roux* consiguió mantener células de embrión de pollo en solución salina durante varios días.

Sin embargo, no fue hasta 1907, cuando el zoólogo americano *R.G. Harrison*, considerado como el precursor de los cultivos de tejidos animales, utilizó por primera vez técnicas *in vitro* para el estudio de fenómenos *in vivo*. *Harrison* realizó cultivos de médula espinal embrionaria de anfibios, usando una gota de linfa del propio anfibio que colgaba de un cubreobjetos, sobre una cámara sellada.

Cuando empezaron a emplearse estas técnicas, la primera limitación que surgió para establecer los cultivos, era lograr un medio nutritivo adecuado. En 1910, *Burrows* empleó plasma de pollo para nutrir los explantes de tejidos embrionarios del propio animal, resultando ser mejor medio que los anteriormente probados. Gracias a ello, pudo observar el crecimiento del tejido nervioso, corazón y piel.

*Burrows* y *Carrel* fueron los primeros en intentar establecer cultivos de células de mamífero, consiguiendo mantener explantes obtenidos a partir de perros, gatos y conejos de indias, así como el crecimiento de tumores sólidos. Sus estudios demostraron que la vida de un cultivo se puede prolongar mediante la realización de subcultivos.

En 1913, *Carrel* demostró la posibilidad de mantener en cultivo células extraídas de un animal (embrión de pollo) durante un periodo de tiempo superior al de la vida de éste. Así llegó a mantener en cultivo células de pollo durante 34 años. Gran parte de su éxito se debió al desarrollo del denominado *frasco de Carrel* (149). A partir de ese



momento, el estudio celular permitió el análisis de diversos procesos hasta entonces difíciles de observar como la división y el metabolismo celular.

En 1916 *Rous y Jones* emplearon por primera vez extractos enriquecidos en *tripsina* para disociar las células de embriones de pollo. Pronto observaron que uno de los mayores problemas que se encontraban para el establecimiento de los cultivos celulares era la aparición de múltiples contaminaciones, por lo que desarrollaron numerosos métodos de manipulación en condiciones de asepsia que aún hoy día se utilizan.

Entre los años 1920 y 1940 se desarrollaron diferentes estrategias para la obtención de cultivos y el mantenimiento de las condiciones estériles, pero sin grandes avances. Con el aislamiento de los primeros antibióticos, a partir de los años 40, se desarrollaron numerosas aplicaciones entre ellas su empleo en los cultivos celulares.

En 1948 *Earle y col.* demostraron que para que una célula llegue a dividirse necesita ser alimentada con los nutrientes adecuados (150).

En 1952 *Grey y col.* establecieron la primera línea celular continua, las conocidas *células HeLa*. Éstas, deben su nombre a una mujer de 30 años llamada *Henrietta Lacks* enferma de un carcinoma cervical de útero, del que se obtuvieron las células epiteliales. Se empleó un medio de cultivo excesivamente complejo y muy poco definido, que contenía: plasma de pollo, extracto de embrión bovino y suero de cordón umbilical humano (151).

En 1954 *Levi-Montalcini y col.* establecieron que el factor de crecimiento nervioso estimula el crecimiento de los axones en tejidos en cultivo (152). Por este trabajo *Levi-Montalcini* recibieron el Premio Nobel en 1986.

En 1955, *Eagle* realizó la primera investigación sistemática de los requerimientos nutritivos de las células en cultivo. A raíz de sus estudios, creó el primer medio basal de componentes establecidos. El *medio basal de Eagle (Eagle's Basal Medium)* se compone de aminoácidos, proteínas y vitaminas en proporciones conocidas. La introducción de este medio optimizó las condiciones de cultivo, favoreciendo un mejor análisis de la célula. El medio de *Eagle*, se suplementa con suero de origen animal para favorecer la proliferación y supervivencia celular. A partir de este medio basal, se desarrollaron un gran número de cultivos según las necesidades específicas para cada tipo celular estudiado. Para todos ellos la inclusión de suero animal en su composición continuaba siendo imprescindible (153, 154).



La inclusión del suero animal en estos medios más definidos, aceleró el crecimiento de las células, produciendo un aumento de la población total. A su vez, la prolongación del tiempo de cultivo favoreció la adaptación de las células a estas condiciones y algunas de ellas adquirieron la capacidad de proliferar indefinidamente, lográndose el establecimiento de las primeras líneas celulares.

Al mismo tiempo, se presentaba el siguiente problema: el contenido del suero animal, con hormonas, proteínas, factores de estimulación e inhibidores del crecimiento, podría generar un efecto indeseado sobre las células en estudio. Si además, tenemos en cuenta que la concentración de los componentes del suero animal puede variar entre lotes, la respuesta celular no siempre será la misma. Si bien es cierto que la abundancia de nutrientes en el suero favorece el crecimiento celular, también favorece el crecimiento de bacterias, hongos, parásitos y virus, lo que podría llevar a la contaminación y pérdida del cultivo (155).

Para solventar alguno de estos problemas, en 1961, *Hayflick* y *Moorhead* usaron por primera vez antibióticos con la finalidad de prevenir la contaminación de los cultivos de fibroblastos (156).

En 1965 *Ham* introduce el primer medio definido libre de suero capaz de mantener algunas células de mamífero en cultivo indefinidamente (157).

En 1969 *Augusti-Tocco* y *Sato* establecen la primera línea celular estable de neuroblastoma (158). Se empiezan a establecer las primeras líneas celulares diferenciadas.

En 1975 *Koehler* y *Milstein* establecen la primera línea celular productora de anticuerpos monoclonales, creando la tecnología de obtención de anticuerpos monoclonales, lo que les hizo merecedores del Premio Nobel (159).

En 1976 *Sato* y *col.* demostraron que las diferentes líneas celulares pueden ser mantenidas mediante mezclas de distintas hormonas y factores de crecimiento para proliferar en medios libres de suero (MLS) (160). El desarrollo de los MLS trajo grandes ventajas en el estudio de las células pero también presentó algunas desventajas. Las células cultivadas en MLS crecen a menor velocidad y forman líneas celulares más lentamente debido a la carencia de los factores presentes en el suero animal (161). Así mismo, la eliminación del suero en el medio de cultivo precisa el uso de reactivos de mayor pureza, así como de agua de mayor calidad, y un equipo especializado para su preparación. De forma que el proceso para la síntesis de MLS de un tipo celular



específico aumenta mucho los costes. A pesar de estas desventajas, el uso del MLS en el estudio de las células facilita, en gran medida, la comprensión de numerosas funciones biológicas.

Los cultivos celulares tienen una serie de ventajas innegables, pero al mismo tiempo tienen unas desventajas que hay que tener en consideración (148). Como ventajas podemos citar:

- *Permiten un control preciso del medio ambiente.* En un cultivo se pueden controlar todos los factores del medio: físico-químicos (pH, temperatura, presión osmótica, niveles de O<sup>2</sup>, CO<sup>2</sup>, tensión superficial...) y fisiológicos (hormonas, factores de crecimiento, densidad celular...). Esto es absolutamente cierto sólo para algunas líneas celulares, para las que se establecen los denominados medios definidos. Un medio definido es aquel en el que se conocen todos y cada uno de los componentes que lo forman y la concentración exacta en que se encuentran. Para poder establecer un medio definido debemos conocer con precisión las necesidades nutritivas de las células en cuestión, por lo que para muchas líneas celulares no se han conseguido establecer este tipo de medios. En esos casos, los medios se suplementan con soluciones complejas, que contienen factores hormonales y nutritivos necesarios para el mantenimiento del cultivo, pero cuya naturaleza se desconoce.
- *Caracterización y homogeneidad de la muestra.* Las células en cultivo de una línea celular (*cultivo primario propagado*), o de una línea continua son homogéneas, con morfología y composición uniformes. De modo que, se pueden obtener con facilidad un número elevado de réplicas, evitando el grave problema de heterogeneidad de las muestras asociado de forma inherente al uso de animales de experimentación.
- *Economía.* Suponen una economía en el uso de reactivos o drogas a estudiar pues al realizarse en volúmenes reducidos, y con un acceso directo de las células a la droga, las concentraciones requeridas son mucho más bajas que en el animal completo.



- *Motivaciones éticas.* La investigación biomédica supone el sacrificio cada año de miles de animales de experimentación. El cultivo celular no puede reemplazar siempre al ensayo *in vivo* pero es una alternativa válida en muchas situaciones.

En cuanto a las desventajas del cultivo celular:

- *Técnica sensible.* El crecimiento de las células animales es mucho más lento que el de los contaminantes más habituales (hongos, levaduras, bacterias, micoplasmas,...) y además dado que proceden de organismos pluricelulares son incapaces de crecer en ausencia de una compleja mezcla de nutrientes que simula el plasma o el fluido intersticial. Esto supone la necesidad de mantener las condiciones de asepsia en todo momento, lo cual es limitante a nivel tanto del instrumental requerido como de personal cualificado para su manipulación.
- *Cantidad y costo.* El costo de producción de 1 gr de tejido en cultivo es más de 10 veces superior al obtenido en el animal. Asimismo existe una limitación de producción, que es del orden de 10 gr de células en un laboratorio normal, y que para ser superior a 100 gr requiere instalaciones de tipo industrial.
- *Inestabilidad.* Muchas de las líneas celulares continuas son inestables, como consecuencia de la dotación cromosómica aneuploide. La población celular puede variar su composición si alguna de las subpoblaciones celulares es capaz de crecer con una tasa ligeramente superior, es decir podemos encontrar diferencias significativas en la línea celular de una generación a la siguiente. La única manera de evitarlo es emplear líneas estables que se resiembran a partir de un stock congelado cada determinado tiempo, o después de un determinado número de generaciones.
- Validez del modelo *in vitro*.



Para el establecimiento de un cultivo celular, se seleccionan las células que crecerán según diversos criterios. Así solo formarán el cultivo aquellas células que sean por una parte capaces de superar el proceso de disgregación y por otra capaces de adherirse al sustrato y proliferar en forma de monocapa o en suspensión.

Para la comprensión de nuestro estudio, debemos diferenciar entre líneas celulares estandarizadas y cultivos primarios.

Cuando el cultivo proviene de células que han sido disgregadas de un tejido original tomado del órgano de un animal recién sacrificado, reciben el nombre de *cultivo primario*. También es el resultado de la obtención de células directamente de un espécimen humano, por lo que tendremos un alto grado de especificidad (162). La obtención de células provenientes de dientes extraídos también es útil para establecer un cultivo primario, para lo que pueden utilizarse dientes que hayan sido extraídos por indicación facultativa y no en exclusividad para el estudio. Cuando este cultivo primario es sometido a procesos de transformación que confieren a sus células una capacidad ilimitada de multiplicación, recibe el nombre de *líneas celulares*.

Las líneas celulares estandarizadas han sido tratadas para ser inmortalizadas, lo que permite prolongar un ensayo el tiempo necesario. Proviene de *epitelio oral de rata, mono o conejo* y resultan muy prácticas porque partimos de una población elevada de células, con un gran potencial de reproducción, que nos va a permitir repetir y modificar pruebas y garantizar la reproducibilidad de un estudio. Sin embargo, el empleo de estas líneas en estudios de toxicidad presenta el inconveniente de usar un tipo celular que no se corresponde con las verdaderas células diana, lo que hace que el estudio sea menos específico.

Los cultivos primarios conservan la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas, además sus cromosomas tienen un *número diploide* (2n), su crecimiento *in vitro* es limitado y presentan inhibición por contacto.

Las células de cultivos primarios reproducen mejor las condiciones clínicas en que se aplica el material y eso las hace más adecuadas, aunque esto siempre dependerá del tipo de célula utilizado y del tipo de ensayo que se vaya a realizar (163, 164). Las células primarias reaccionan más rápidamente ante los tóxicos que las líneas celulares, por lo que presentan una mayor sensibilidad (165). El estar más cercanas a las células que las



originaron se ve reflejado en una mejor actividad y en una funcionalidad similar a su ambiente natural por lo que, en aislamientos primarios de cepas virales, éstas tienen mayor sensibilidad que una línea celular ya establecida. Igualmente para la producción de vacunas son recomendables los cultivos primarios por tener una baja probabilidad de que se transformen en malignos.

Por contra, presentan varios inconvenientes. Por un lado, obtener una población celular suficientemente amplia es complejo. Además, las células primarias cultivadas experimentan cambios en el fenotipo, es decir, hay variabilidad entre las células de un mismo individuo, éstas tienen un periodo de vida corto, y en unos pocos pases pierden el potencial reproductivo (166). Como dificultad añadida, encontramos que para que el cultivo pueda ser aceptado como modelo de estudio hay que demostrar que el fenotipo celular se corresponde con el del linaje elegido, que la respuesta a los materiales probados es reproducible y que las líneas celulares pueden ser estandarizadas.

Los cultivos primarios más utilizados son los de células pulpares y los de fibroblastos gingivales (162, 167).

El uso de líneas celulares estandarizadas procedentes de depósitos reconocidos, resulta un procedimiento sencillo para controlar las condiciones del ensayo, el uso de cultivos primarios, siempre que se pueda asegurar la reproducibilidad y fiabilidad de los resultados. Se considera que las líneas celulares establecidas son adecuadas para estudios de toxicidad y que aumentan la reproductibilidad respecto a cultivos primarios (165).

Para estudios en relación con la pulpa dental, varios autores recomiendan el fibroblasto de ratón (L929) (168, 169). Para *MacDougall*, el odontoblasto de ratón (*MO6-G3*) es mucho más sensible que el fibroblasto, y además se considera como célula diana en tratamientos pulpares (170, 171).

Otras líneas celulares establecidas muy utilizadas son: *HELA* (165), *fibroblasto V79-4* (166), *fibroblasto gingival humano HGF-1* (172), *línea de pseudo-odontoblastos de ratón MDPC-23* (173, 174), *células pulpares RPCC24* (166).



Los cultivos con líneas celulares son por tanto una muy buena alternativa en la realización de ensayos de citotoxicidad. No obstante preferimos para este estudio utilizar células obtenidas de cultivos primarios por su mayor especificidad y sensibilidad, con el fin de aproximarnos, en la medida de lo posible, a los probables resultados *in vivo*.

## 6.-Células madre derivadas de tejidos orofaciales.

En el interior de la cavidad oral, podemos encontrarnos células madre en:

- *Dientes deciduos (SHED).*
- *Ligamento periodontal (PDLSCs).*
- *Folículo dental (DFSCs).*
- *Papila apical (SCAP).*
- *Tejido gingival (GMSC).*
- *Tejido inflamatorio periapical procedente de infecciones odontógenas (PL-MS).*
- *Lámina propia mucosa oral (OMLP-PCs).*
- *Médula ósea de mandíbula (OMSCs).*
- *Pulpa dental (DPSCs) (175-180).*

### A. Células madre procedentes de dientes deciduos

Las células madre de la pulpa a partir de dientes deciduos (SHED), presentan una mayor plasticidad que las de la pulpa de los dientes permanentes. Son capaces de diferenciarse al linaje osteoblástico, adiposo y neural (176). En un experimento *in vitro* en el que se indujeron al linaje neural, tras ser trasplantadas en ratones inmunodeprimidos, fueron capaces de formar hueso, regenerar dentina y producir tejido pulpar, lo que sugiere que podrían ser un buen recurso para regeneración de hueso orofacial y tejido pulpar (181, 182). Además, en un estudio realizado con células alogénicas de dientes deciduos procedentes de cerdos miniatura, se comprobó la capacidad de estas células para regenerar con eficacia la pérdida de tejido duro y tejido blando provocado por la periodontitis. Los índices clínicos mostraron una restauración de salud periodontal significativa en estudios *in vivo*. La tomografía computarizada mostró que el 75% de las



muestras tuvo éxito en la regeneración de tejido duro-blando y el examen clínico demostró una notable regeneración de los tejidos periodontales (183). Otros estudios también realizados con cerdos demostraron que las SHED fueron capaces de regenerar satisfactoriamente defectos de hueso de mandíbula, producir tejido dentinario y restaurar los defectos del techo de la cámara pulpar (184, 185).

### **B. Células madre procedentes del ligamento periodontal**

En el ligamento periodontal, que rodea la raíz, se encuentran unas células mesenquimales indiferenciadas (PDLSCs) que fueron descritas como: “*células con capacidad clonogénica, con alta proliferación y con capacidad de regenerar tejido periodontal*”. Experimentos *in vivo* demuestran que son capaces tanto de diferenciarse a cementoblastos funcionales, como producir cemento cuando son trasplantados a la superficie dorsal de ratones inmunodeprimidos (177). Se ha comprobado que contribuyen a la reparación del tejido periodontal, gracias a un estudio realizado con PDLSCs trasplantadas en defectos periodontales, que fueron inducidos en el área molar de mandíbulas de ratas inmunodeprimidas (186-188).

### **C. Células madre procedentes del folículo dental**

El saco de tejido conectivo que envuelve el diente no erupcionado, también es otra fuente de células madre (DFSCs). El folículo dental dará lugar al ligamento periodontal y a células con capacidad de diferenciarse a odontoblastos, cementoblastos y osteoblastos. Estudios *in vivo* demuestran que son capaces de expresar la proteína osteocalcina y sialoproteína ósea al mes de ser trasplantadas en un ratón inmunodeprimido, pero no en forma de hueso o cemento. Otros estudios recientes realizados *in vitro* demuestran su diferenciación a osteoblastos, cementoblastos, adipocitos y neuronas (189-198).

### **D. Células madre procedentes de la papila apical**

Existen células madres encontradas en la zona apical de la papila de dientes permanentes inmaduros (SCAP). Son células clonogénicas, capaces de diferenciarse a odontoblastos, osteoblastos y adipocitos (178). Presentan un alto grado de proliferación y duplicación, así como una alta capacidad de regeneración debido a la alta actividad de



la *telomerasa*. Además, presenta una capacidad aumentada de migración, comparado con las células madre procedentes de pulpa dental (DPSCs), aun siendo obtenidas del mismo diente y cultivadas en las mismas condiciones. Se puede concluir, que las SCAP tienen un alto potencial para su utilización en regeneración de pulpa/dentina, así como para aplicaciones en endodoncia (178, 199, 200).

#### **E. Células madre procedentes del tejido gingival**

Denominadas en inglés como *gingival mesenchymal stem cells* (MSCs) presentan capacidad de auto-renovación y pueden diferenciarse en adipocitos, osteoblastos, condrocitos, células endoteliales y neurales (180, 201, 202). Además, diferentes estudios muestran que derivan en un 90% de células procedentes de la cresta neural y en un 10% del mesodermo (203). Son capaces de expresar los marcadores SSEA-4, Oct-4, STRO-1, CD29, CD73, CD90, CD105, pero no expresan CD45 (204).

#### **F. Células madre procedentes del Tejido inflamatorio periapical**

Son células madre mesenquimales de tejido inflamatorio periapical, procedentes de infecciones odontógenas (PL-MSC). Presentan capacidad de diferenciarse en adipocitos, osteoblastos y condrocitos en un experimento *in vitro*. En un estudio *in vivo* formaron tejido mineralizado en ratas inmunocomprometidas (205, 206).

#### **G. Células madre procedentes de la lámina propia de la mucosa oral**

Fueron denominadas OMLP-PCs. Son células capaces de diferenciarse a condrocitos, osteoblastos, células del endodermo y células neurales (neuronas y células de Schwann) (207, 208).

#### **H. Células madre procedentes de la médula ósea mandibular**

Llamadas OMSCs son capaces de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condrocitos en presencia de un medio inductor. Se demostró que expresan los marcadores: CD73, CD105, CD106, SSEA-4 y Oct-4 aunque no expresan los marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45. En un estudio comparativo entre OMSCs y células mesenquimales de médula ósea de huesos largos (BMMSCs), las primeras presentaron una mayor tasa de proliferación y de unidades formadoras de colonias (179).



## I. Células madre procedentes de pulpa dental

Las células madre procedentes de la pulpa dental (DPSCs) son capaces de diferenciarse a osteoblastos, aumentando el porcentaje de suero presente en el medio de cultivo y sin la necesidad de adición de otros componentes (209-213). Estas células trasplantadas *in vivo* forman un complejo dentinario similar al del diente tras cinco semanas. En el año 2000 el grupo de *Songtao Shi* consiguió aislar células madre de la pulpa dental, extraídas de terceros molares de humanos. Demostraron capacidad clonogénica y las diferenciaron hacia odontoblastos, capaces de formar el complejo dentinopulpar tras ser implantadas en ratas inmunocomprometidas. Con este estudio se comprobó que tenían un porcentaje de proliferación mayor que las CMM (176). Las células madre de la pulpa dental son:

- *Capaces de producir reparación cardiomiogénica* de forma similar a las células madre procedentes de la médula ósea y el tejido adiposo (214, 215). Células DPSCs cocultivadas junto a células cardiomiogénicas procedentes del corazón de ratas neonatales, fueron capaces de expresar altos niveles de marcadores cardíacos como *Troponina I*,  $\beta$ -MHC y *ANP* tras cuatro semanas de cultivo. Cuando se realizó el trasplante de DPSCs en ratas inmunodeprimidas a las que se les había provocado un infarto de miocardio, éstas mejoraron la función cardíaca, aumentaron el número de vesículas cardíacas y redujeron la zona infartada (216).
- *Favorecen la respuesta endógena neural*. Esta evidencia quedó demostrada en un estudio en el que se inyectaron células de la pulpa dental procedentes de monos en el hipocampo de ratones inmunodeprimidos. La *bromodeuxiuridina* (que se utiliza para evaluar la respuesta endógena neural) aumentó al quinto día en el hemisferio de la inyección. Entre el día 7-30 se observó un aumento de *Nestina*,  $\beta$ -III *tubulina*, *GFAP* e *Iba 1* en la zona de inyección. A su vez se produjo un aumento de factores neutróficos como CNTF, VEGF, FGF-2 y NGF (214). Además, debido a su origen embrionario, las DPSCs tienen la capacidad de diferenciarse a neuronas, células de la glía y oligodendrocitos (217, 218). Cuando son cultivadas en un medio de inducción neural adecuado para



neuronas, se provoca un cambio de morfología y aumenta la expresión de marcadores neurales como  $\beta$ -III tubulina, GAD y NeuN, además de ser capaces de sobrevivir en el hipocampo de un ratón durante más de 10 días y seguir expresando marcadores neurales (175).

- *Son capaces de regenerar el complejo dentino-pulpar.* Cuando existe agresión al diente estas células son capaces de diferenciarse a odontoblastos para formar dentina terciaria. Estudios *in vivo* demuestran que tras cinco semanas trasplantadas, podemos observar un complejo dentinario similar al del diente. No están claros los factores implicados en la diferenciación odontoblástica, aunque se cree que BMP-2 favorece la aparición de marcadores como la sialoproteína destinaria, clave en la formación de dentina (219).



# OBJETIVOS



# OBJETIVOS

## ✓ OBJETIVOS GENERALES

- El objetivo de esta Tesis Doctoral es comprobar los efectos citotóxicos de dos composites de baja contracción como son SDR (Dentsply) y Venus Bulk Fill (Heraeus Kulzer) en células madre procedentes de pulpa dental (DPSCs) y ligamento periodontal (PDLSCs).

## ✓ OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer un *cultivo primario de células madre* procedentes de la *pulpa dental* y *ligamento periodontal*.
- *Determinar el perfil inmunofenotípico de las células obtenidas* del cultivo de la pulpa dentaria y ligamento periodontal.
- *Medir la viabilidad y proliferación* de DPSCs y PDLSCs sometidas a diferentes concentraciones de SDR" (Dentsply) y Venus" Bulk Fill (Kulzer) mediante elución.
- *Determinar la apoptosis o muerte celular* de DPSCs y PDLSCs sometidas a diferentes concentraciones de SDR" (Dentsply) y Venus" Bulk Fill (Heraeus Kulzer).
- *Comprobar si existen cambios fenotípicos* en DPSCs y PDLSCs tras su exposición a SDR" (Dentsply) y Venus" Bulk Fill (Heraeus Kulzer).



# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## MATERIAL Y MÉTODOS

**D**urante la fase experimental de este estudio, se utilizaron cultivos celulares de células de ligamento periodontal (LPO) y células de pulpa dental, y posteriormente se sometió su proliferación, al contacto con los materiales de nueva generación SDR (*Dentsply*) y Venus bulkfill (*Heraeus Kulzer*).

Se midieron los resultados, a diversas horas (desde las 24-168h) para evaluar la citotoxicidad de los materiales mencionados, así como la biocompatibilidad de los mismos, en contacto con los linajes celulares con los que es más probable que interactúen en el desarrollo de la práctica clínica diaria. Tanto en restauraciones en la cercanía de la cámara pulpar, como en la resolución de cavidades que precisen la restauración de paredes proximales o en contacto directo con el periodonto.

### 7.--Composites:

- A. **SDR™**: es un composite fotopolimerizable de baja viscosidad, de la compañía *Dentsply*. Las siglas corresponden al concepto “*Smart dentin replacement*”, o reemplazo inteligente de la dentina. Tiene una consistencia fluida y se aplica mediante compules y una pistola dosificadora. Además se presenta en un solo tono translúcido, lo que implica que la estética final de la restauración depende del uso de otros composites por encima del SDR. De este modo, para un correcto pulido de la restauración, se hace imprescindible acabar la restauración con una capa de composite de nanopartículas o un composite microhíbrido, con buenas propiedades mecánicas y de pulido. Según los datos del fabricante, es posible aplicar incrementos de hasta 4 mm sin afectar la capacidad de polimerización del material. Su consistencia fluida le permite repartirse y autonivelarse dentro de la cavidad y contiene un modulador de la polimerización, patentado que disminuye hasta en un 60% la tensión de contracción tras la fase de polimerización del material.



Fig. 20 y 21 Jeringa para compules del sistema SDR y caja de compules.

B. **Venus Bulkfill:** también se trata de un composite fotopolimerizable y de consistencia fluida, en este caso de la casa Heraeus Kulzer. Puede encontrarse en compules o en jeringas de aplicación directa. Similar a lo que sabemos de SDR, permite incrementos de hasta 4 mm de composite debido a su bajo estrés de contracción.



Fig. 22. Jeringas de aplicación directa de Venus Bulkfill.



## 8.- Aislamiento celular.

Para poder realizar los cultivos celulares, precisos para la fase experimental, inicialmente fue necesaria la obtención de los linajes celulares que precisamos para realizar los cultivos. Dichas células se obtuvieron de piezas dentales extraídas. En este caso, las extracciones dentales se realizaron en la Unidad de Cirugía Oral y Maxilofacial del *Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca* (Murcia). Se recogieron dientes definitivos (n=200) de pacientes mayores de 14 años con enfermedad periodontal avanzada o afectación por caries, por lo que en todo caso, la extracción estaba indicada. Para asegurar el anonimato de los donantes no se llevó a cabo la identificación de los dientes recogidos.

Inmediatamente tras la extracción, los dientes recogidos se depositaron en tubos (*Falcon*) con medio de cultivo celular, que constaba de: *Minimum Essential Medium Eagle (MEM, Sigma)*, mezcla de antibióticos (*100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina; SIGMA*) y antifúngicos (*250 unidades/ml de anfotericina; SIGMA*).

Las muestras se conservaron entre 4°C y 8°C hasta poder ser procesadas.

### 8.1-Extracción del Ligamento Periodontal Humano (hPDL) y Pulpa Dental Humana (hDP):

Para la extracción de las células de ligamento periodontal y pulpa dental se trabajó en condiciones de esterilidad en una *cabina de seguridad biológica vertical tipo II con filtro HEPA (Telstar)*. Se trata de un filtro de aire, que evita la propagación de virus y bacterias, lo que se hace indispensable para trabajar en condiciones estériles y evitar la contaminación de los cultivos celulares. Generalmente son filtros utilizados en cabinas de esterilidad para usos médicos o bioquímicos aunque se utilizan con otros fines como por ejemplo en los aviones.

- Los dientes recogidos se colocaron en una *placa de Petri* que contenía PBS estéril (tampón fosfato salino 0.1 M, pH 7.4) y una mezcla de antibióticos (100



unidades/ml de *penicilina* y 100  $\mu\text{g/ml}$  de *estreptomicina*; SIGMA) y antifúngicos (250 unidades/ml de *anfotericina*; SIGMA).

- A continuación, el ligamento periodontal se retiró cuidadosamente de la superficie de la raíz de los dientes, fundamentalmente del tercio medio, con la ayuda de unas pinzas y un bisturí (hoja nº15). Para obtener el tejido pulpar, el diente se seccionó transversalmente y se utilizó material de endodoncia como limas manuales y tiranervios.
- El ligamento periodontal y la pulpa dental obtenidos (junto con el PBS) se traspasaron por separado a un tubo (Falcon) que se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se procedió a realizar la disgregación enzimática y mecánica.

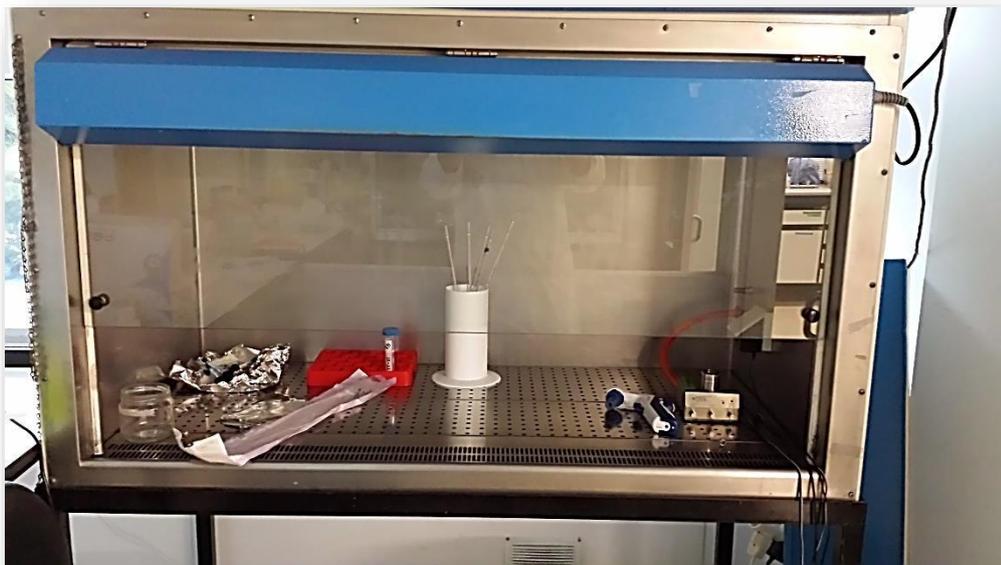


Fig.23 Cámara de flujo laminar, necesaria para trabajar en condiciones de esterilidad.

### 8.2.-Disgregación enzimática:

1. El precipitado celular fue sometido a una disgregación enzimática utilizando una solución de proteasas: *Colagenasa tipo I* (3mg/ml; Worthington Biochem) y *dispasa* (4mg/ml; GIBCO) durante 1 hora a 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 1000 rpm.
4. Tras desechar el sobrenadante, se resuspendió el precipitado celular en medio de cultivo celular MEM con *anfotericina* (250 unidades/ml).
5. Se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm.
6. Tras desechar el sobrenadante, se añadió medio de cultivo celular MEM con *anfotericina* (250 unidades/ml).

### 8.3.-Disgregación mecánica:

1. Con el fin de quitar los fragmentos más grandes de tejido remanente, se recogieron las células del tubo con una *pipeta Pasteur* y se depositaron sobre una malla estéril de 70 $\mu$ m (Falcon, BD), donde se tamizaron a través de la malla añadiéndose medio de cultivo MEM.
2. La solución resultante se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm.
3. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y se añadió medio de cultivo celular MEM.

### 9.-Recuento y estimación de la viabilidad celular.

Antes de proceder al cultivo de las células obtenidas, se hizo un recuento y estimación de la viabilidad celular mediante la utilización de la cámara de *Neubauer* o *hemocitómetro* y colorante *azul tripán*. La cámara de *Neubauer* es un instrumento utilizado para el recuento celular en un medio líquido. Esta cámara, está adaptada al microscopio de campo claro o al microscopio de contraste de fases. La cámara presenta una cuadrícula de dimensiones conocidas, de manera que la observación al microscopio permite realizar un conteo de las células suspendidas en el medio líquido.

El método utilizado, se basa en que las células vivas (viables) cuya membrana citoplasmática está intacta, no permiten la entrada del colorante (*azul tripán*), permaneciendo refringentes. Las células muertas (no viables), sin embargo, permiten el



paso de colorante tiñéndolas de azul debido a que su membrana citoplasmática se encuentra rota. De este modo podemos realizar un conteo celular adecuado.

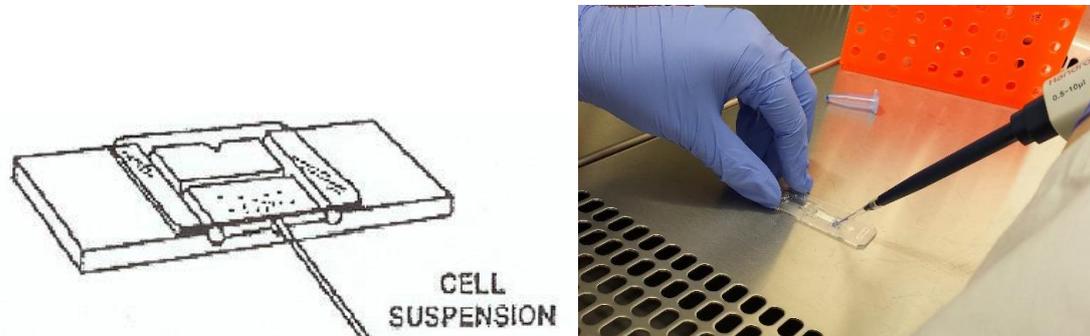


Fig. 24 y 25 Cámara de Neubauer o hemocitómetro. Tras teñir con azul tripán, se diferencian las células muertas, con el fin de sembrar las células vivas.

Los pasos a seguir fueron los siguientes:

La suspensión celular se agitó y se depositaron 10 $\mu$ l de la misma en un tubo (Eppendorf), se añadieron 10 $\mu$ l de la solución de azul tripán a la muestra anterior y se agitó la mezcla con la misma micropipeta y procurando no hacer burbujas. Se pegó el cubrecámara en el hemocitómetro humedeciendo los bordes del mismo, y se llenó con la mezcla anterior la cámara de aire que existe entre el cubreobjetos y el hemocitómetro (0.1mm<sup>3</sup>), por uno de los lados del mismo. Contamos en el microscopio de contraste de fase las células teñidas y no teñidas en una de las regiones de la cámara (fig. 25 y 26).

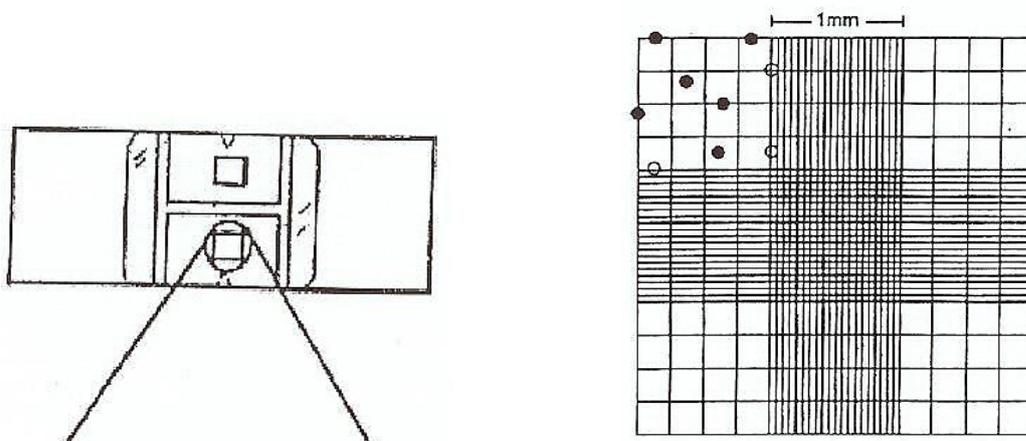


Fig. 26 Cuadrícula de dimensiones conocidas, para facilitar el recuento celular.



Para un recuento más exacto pueden contarse las cuatro regiones de la cámara y obtener la media aritmética de los recuentos. Se calculó el número de células totales y viables de la muestra según las siguientes fórmulas:

$$\text{N}^\circ \text{ células viables/ml} = \text{n}^\circ \text{ células vivas contadas} \times 10000 \times \text{factor de dilución}$$

$$\text{N}^\circ \text{ células totales/ml} = (\text{n}^\circ \text{ células vivas contadas} + \text{muertas contadas}) \times 10000 \times \text{factor de dilución.}$$

$$\% \text{ Viabilidad} = \text{n}^\circ \text{ de células viables} \times 100 / \text{n}^\circ \text{ de células totales}$$

Se multiplica el número de células por 10000, ya que el volumen correspondiente a la región contada en la cámara Neubauer es de  $0.1 \text{ mm}^3$

Tras hacer el recuento y la estimación de la viabilidad, se ajustó la solución celular a  $1 \times 10^5$  células/ml y se sembraron 3 ml de la misma por frasco de cultivo de  $25 \text{ cm}^2$  (Sarstedt). Las células se cultivaron en una cámara de incubación a  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de humedad.

### **10.-Cultivo de células del ligamento periodontal y la pulpa dental.**

Las células aisladas del ligamento periodontal crecen adheridas al plástico de la placa de cultivo. Para el cultivo primario de PDLSCs Y DPSCS, su expansión y mantenimiento, se utilizó un medio de cultivo celular que fue denominado medio basal (MB). El medio basal estaba compuesto por  $\alpha$ -MEM (*Minimum Essential Medium Eagle, Alpha Modification, SIGMA*) al que se le añadieron los componentes de la tabla 4.



COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
<b>FBS (Gibco)</b>	15%
<b>P/S (Sigma)</b>	100µg/ml
<b>Glutamina (Sigma)</b>	2 mmol/l
<b>Ácido ascórbico 2 fosfato (Sigma)</b>	100µg/ml
<b>Anfotericina (Sigma)</b>	2,5µg/ml

Tabla 5. Componentes añadidos al medio de cultivo celular, denominado basal (MB).

Con el objetivo de conseguir un número de células suficientes para llevar a cabo la investigación, semanalmente, cuando las células estaban cerca de llegar al *estadio de confluencia*, ocupando aproximadamente el 85% de la base del frasco de cultivo, se realiza el siguiente proceso:

- Se retira el medio de cultivo del frasco que contenía las células, se añade Tripsina 0.25% + EDTA 1mM (disgregación enzimática) en cantidad suficiente para cubrir la superficie del mismo y se incubaba a 37°C, 5% de CO<sup>2</sup> y 95% de humedad durante 5 minutos.
- Posteriormente, se procede a la neutralización de la actividad enzimática con igual o mayor cantidad de medio de cultivo frío. La mezcla se centrifuga durante 10 minutos a 1000 rpm, se desecha el sobrenadante y se resuspenden las células en 1 ml de medio de cultivo basal. Tras estimar la viabilidad, se ajusta el número de células de la suspensión anterior, normalmente a 1x10<sup>5</sup> células/ml, y se siembran en un frasco de cultivos de mayor superficie que el anterior. Las células se incuban en una estufa para cultivos celulares a las condiciones anteriormente descritas (37°C, 5% de CO<sup>2</sup> y 95% de humedad) y el medio de cultivo celular basal se cambia con una frecuencia de 3 veces por semana aproximadamente.



## 11.-Caracterización inmunofenotípica de las DPSCs y PDLSCs.

Los antígenos de superficie de las PDLSCs y DPSCs se evaluaron por *citometría de flujo* utilizando el panel de anticuerpos monoclonales recomendado por el *Committee of the International Society for Cellular Therapy* (Tabla 5). En cada tubo se colocó una suspensión de  $1.5 \times 10^5$  células en 100  $\mu$ L más 20  $\mu$ L del anticuerpo conjugado con el fluorocromo correspondiente:

- *Fluorescein isothiocyanate* (FITC) para los anticuerpos CD105, CD14 y CD45
- *Phycoerythrin* (PE) para los anticuerpos CD73, CD90 y CD19.
- *Phycoerythrin cyanide 5* (PerCPCy5.5) para el CD34.

### *Inmunocitofluorescencia.*

Los cultivos se analizaron con un *fotomicroscopio de epifluorescencia LEICA* modelo DMR y las imágenes se capturaron y trataron con un equipo COOLSNAP.

1. Lavado inicial con PBS (5 minutos).
2. Las células se fijaron con *paraformaldehído* al 4% (8 minutos).
3. Se volvió a lavar con PBS 30 minutos (3-6 lavados de 5-10 minutos)
4. Se permeabilizó con *Tritón* al 0.05% (15 minutos), para los casos en que se vaya a utilizar un anticuerpo citoplasmático.
5. Se lavó con PBS 30 minutos (3-6 lavados de 5-10 minutos).
6. Se bloqueó con solución de bloqueo: *Lisina 10%*, *BSA 5%* (no con tejidos) y PBS, mínimo 1 hora.
7. Anticuerpo primario en solución de bloqueo toda la noche a 4°C.
8. Al día siguiente, se lavó con solución de bloqueo durante 30 minutos (cambiándola cada 5-10 minutos)
9. Si fuera necesario, *Biotina* (1:200 en solución de bloqueo) mínimo 2 horas.
10. Anticuerpo secundario (*texas red* para rojo, *fluoresceína* para verde), dilución 1:500, 45 minutos.
11. Se lavó tres veces con PBS durante 10 minutos.



12. Para marcar núcleos, se empleó *DAPI* (20  $\mu$ L en 10 ml de PBS), 5 minutos, luego se lavó 2 veces con PBS.
13. Se montaron los portaobjetos con *Moviol*, *Eukitt* o *Glicerol*.

Anticuerpo	Volumen	Concentración/ 100 $\mu$ L	Fluorocromo	Suplidor	Clon
CD105	20 $\mu$ L	1.5x10 <sup>5</sup> células	FITC	BD Pharmigen™	266
CD73	20 $\mu$ L	1.5x10 <sup>5</sup> células	PE	BD Pharmigen™	AD2
CD90	20 $\mu$ L	1.5x10 <sup>5</sup> células	PE	BD Pharmigen™	5E10
CD34	20 $\mu$ L	1.5x10 <sup>5</sup> células	PerCP-Cy5.5	BD Pharmigen™	581
CD45	20 $\mu$ L	1.5x10 <sup>5</sup> células	FITC	BD Pharmigen™	HE30
CD14	20 $\mu$ L	1.5x10 <sup>5</sup> células	FITC	BD Pharmigen™	M5E2
CD19	20 $\mu$ L	1.5x10 <sup>5</sup> células	PE	BioLegend™	HIB19
HLADR	20 $\mu$ L	1.5x10 <sup>5</sup> células	FITC	BD Pharmigen™	G46-6

Tabla 6. Anticuerpos usados para la evaluación de antígenos de superficie de las DPSCs



En la tabla 6, se resumen los anticuerpos utilizados con fluorescencia.

Anticuerpo	Especie	Dilución
CD90	Mouse	1:500
CD73	Mouse	1:1000
CD105	Rat	1:500
CD34	Mouse	1:100
CD45	Mouse	1:100
CD90	Mouse	1:500

Tabla 7 Anticuerpos usados con fluorescencia.

## 12.-Preparación de las muestras.

La preparación de los extractos de los distintos materiales se realiza siguiendo el protocolo estándar establecido por la normativa *ISO 10993-5* para test de citotoxicidad *in vitro*. De esta forma, se mezclaron los materiales y se prepararon según las instrucciones del fabricante en condiciones de esterilidad. Una vez mezclados, se colocaron fragmentos de los materiales de 2-3 mm de alto y 35 mm de diámetro en placas estériles de 6 mm de alto y 35 mm de diámetro y se fotopolimerizaron en condiciones de esterilidad. Una vez fraguados todos los materiales, se cubrieron con medio de cultivo, (MEM; Sigma-Aldrich, Madrid, España), suplementado con 10% de *suero bovino fetal* (Gibco Invitrogen, Paisley, Scotland), *L-glutamine* (PAA Laboratories, Pasching, Austria) y *penicilina /estreptomicina* (PAA Laboratories), en una relación de 3 cm<sup>2</sup> de material en la placa por cada mililitro de medio de cultivo según la norma *ISO 10993-5*, y se dejaron 24h en la incubadora de CO<sup>2</sup>.



Posteriormente, se recogió con una jeringa estéril el medio de cultivo que se había incubado con los materiales de estudio y se filtró para eliminar residuos, con un filtro para tamaño de partícula 0,22  $\mu\text{m}$  (Merck Millipore, Billerica, EE.UU.) y con capacidad para un volumen de 1-10 ml de volumen filtrado.

A partir de aquí se obtuvo un resultante, que fue la concentración total, a partir de la cual se fueron preparando las diluciones  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$  y  $\frac{1}{8}$ .

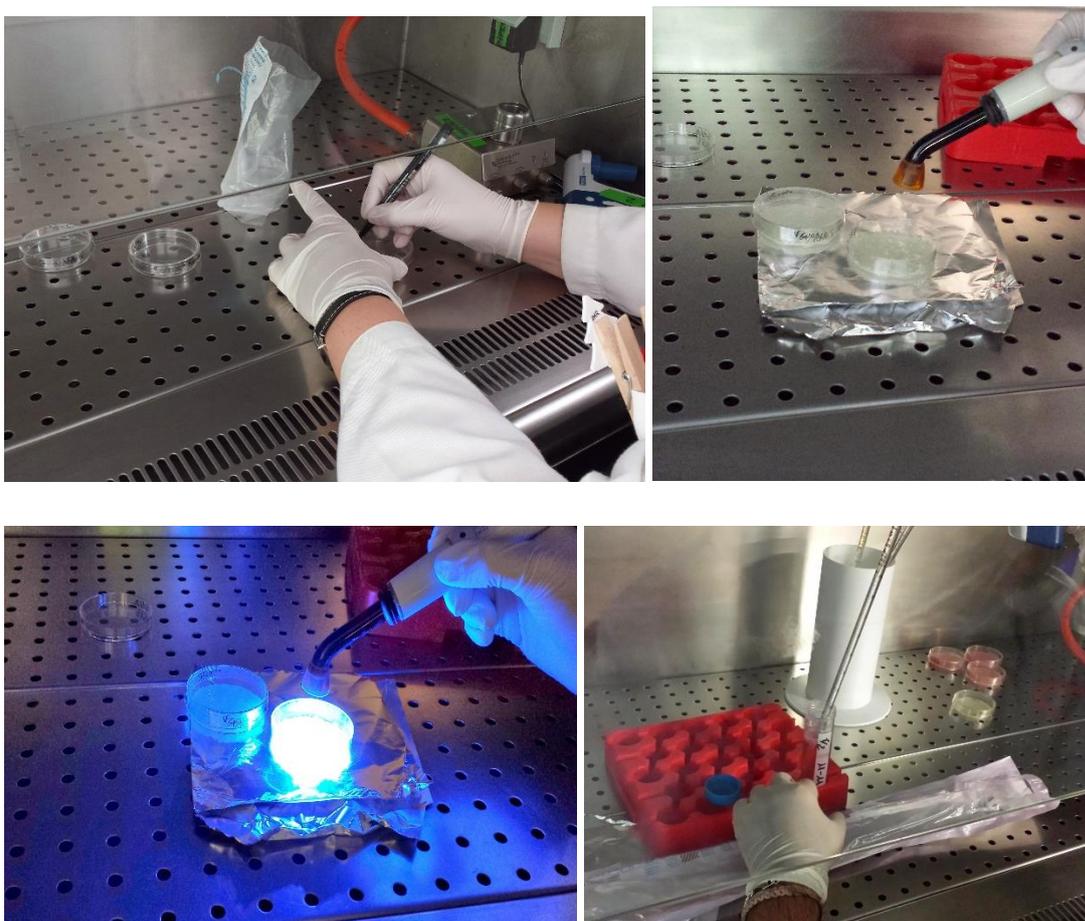


Fig. 27, 28, 29 y 30. Preparación de las muestras de SDR y Venus Bulkfill, fotopolimerización con lámpara LED y aplicación del medio de cultivo.



### 13.- Ensayo MTT.

**MTT:** La proliferación celular se midió usando el ensayo de viabilidad del MTT. Este ensayo es un método colorimétrico sensible, cuantitativo y fiable para la determinación de la proliferación y viabilidad celular. El ensayo es capaz de medir el número de células presentes en el cultivo mediante la transformación de un compuesto coloreado debido a una reacción que únicamente tiene lugar en las mitocondrias de las células viables. El MTT (amarillo) es captado por las células y reducido por la enzima *succinato deshidrogenasa* mitocondrial a su forma insoluble *formazano* (azul-morado), que queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas (220).

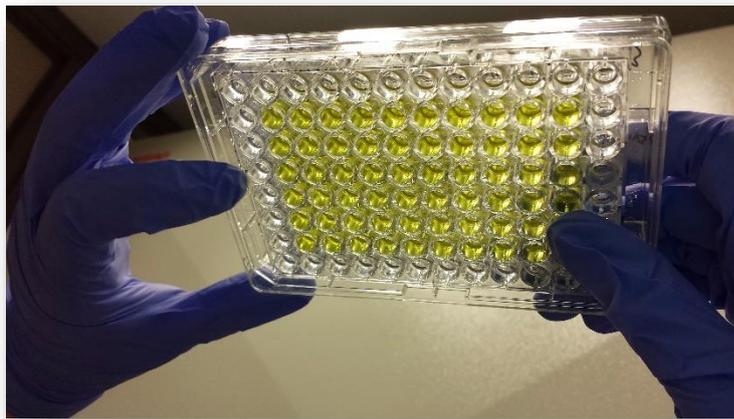


Fig. 31 Placa de 96 pocillos con el cultivo celular con MTT.

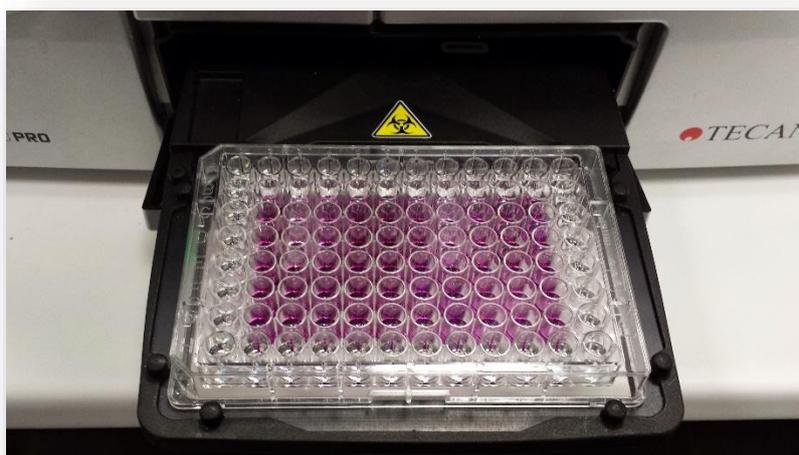
De esta forma se puede cuantificar la cantidad de MTT reducido mediante un método colorimétrico, ya que se produce un cambio de color de amarillo a azul-morado. La capacidad de las células para reducir el MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. Solamente aquellas células que presenten mitocondrias integra y funcionales van a producir el *formazano*. La determinación de la capacidad de las células de reducir el MTT a *formazano* después de su exposición a un compuesto, en este caso nuestros composites en estudio, permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa. Tras un período de incubación con el MTT para



permitir que la reacción tenga lugar, aplicamos un disolvente orgánico como el DMSO que va a degradar las membranas celulares permitiendo la salida y solubilización de los formazanos, que son insolubles en agua. Existen otras alternativas al DMSO para realizar la solubilización, como el *isopropanol-HCL*, etanol o detergentes tipo NP40, pero no son más adecuados.

Tras la solubilización, se mide la absorbancia a 570 nm para obtener la absorbancia del formazano. Utilizamos la absorbancia a 670 como referencia del plástico donde está sembrado el cultivo celular.

La lectura de absorbancia se llevó a cabo en un lector de placas *Multiscan MCC/340* (Titertek, Huntville, AL). Las gráficas obtenidas pueden verse en el Anexo I.



*Fig. 32 Placa de 96 pocillos tras aplicar DMSO, se observa el color morado característico de este ensayo. La placa se encuentra en el lector de placas.*



Fig. 33, 34 y 35. DMSO utilizado como disolvente orgánico que destruye las membranas celulares, traslado de las células extraídas al laboratorio antes de la siembra, colorante azul tripan.

#### 14.- Ensayo de apoptosis o muerte celular.

Para valorar morfológicamente la apoptosis celular, se usó *Hoechst 33342*, un derivado del *benzimidazol*, que emite una fluorescencia azul cuando es excitado por luz ultravioleta. Este compuesto no es un intercalante del ADN, pero se une específicamente al ADN preferentemente a regiones ricas en bases *adenina-timidina* (A-T) y marca fuertemente los núcleos celulares de las células alteradas. Las células viables mostraron una morfología normal y una fluorescencia azul baja y homogénea, mientras que las células muertas exhibían una morfología alterada y una fluorescencia azul intensa. De esta manera, los núcleos picnóticos y apoptóticos fueron fácilmente identificables.

El procedimiento fue el siguiente:

- a) Se sembraron DPSCs y PDLSCs en placas de 96 pocillos, con una densidad de siembra de 3000 células /pocillo.
- b) Tras 24 horas de incubación a 37°C, 5% de CO<sup>2</sup> y 90% de humedad, se aplicó 100µl/ pocillo de diluciones ½, ¼, 1/8 y se incubaron las placas a 24h a 37°C, 5% de CO<sup>2</sup> y 90% de humedad. Como control positivo se usó *Estaurosporina* (Sigma Aldrich) 250 nm en las mismas condiciones.



c) Una vez retirado el medio de cultivo, la placa se incubó durante 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente con una solución *Hoechst 33342* en PBS con una concentración final de 1 mg/ml.

d) Tras retirar la solución y añadir PBS se valoró la muerte contando al menos 200 células y calculando % de células vivas para cada condición usando un microscopio de fluorescencia (Leica DMI 4000B, Wetzlar, Germany).

El resultado obtenido de la medida de reducción de MTT es proporcional al número de células, ya que sólo las células que presenten mitocondrias intactas van a conseguir la reducción de la sal.

Se realizó el experimento por triplicado, realizando la observación de los cultivos celulares a las 24, 48, 72, 96 y 168 horas.

	CN	0	1/2	1/4	1/8	CN	0	1/2	1/4	1/8	
	CN	0	1/2	1/4	1/8	CN	0	1/2	1/4	1/8	
	CN	0	1/2	1/4	1/8	CN	0	1/2	1/4	1/8	
	CN	0	1/2	1/4	1/8	CN	0	1/2	1/4	1/8	
	CN	0	1/2	1/4	1/8	CN	0	1/2	1/4	1/8	
	CN	0	1/2	1/4	1/8	CN	0	1/2	1/4	1/8	

Fig.36 Distribución de las placas de 96 pocillos. Diluciones para *SDR ligamento*, *SDR pulpa*, *Venus ligamento*, *Venus pulpa*. CN (control). 0, equivale al medio sin tratar.



## 15- Método estadístico.

Analizamos los datos estadísticos con el paquete de software SPSS® (versión 15.0) para Windows, en el cual hemos efectuado los siguientes procedimientos estadísticos:

Para el análisis de la viabilidad celular en presencia de las diferentes diluciones se usó el *Test de Kruskal-Wallis*. Para el estudio de apoptosis o muerte celular se usó la *chí-cuadrado*. Para el análisis comparativo de las variables se consideró que la hipótesis nula (existencia de una relación de independencia entre las variables), se debería rechazar (cuando esta se rechaza, se considera que la relación entre las variables es de dependencia), cuando la probabilidad mínima de rechazo (el llamado “p-valor”) no sea superior al nivel crítico estándar de 0,05.

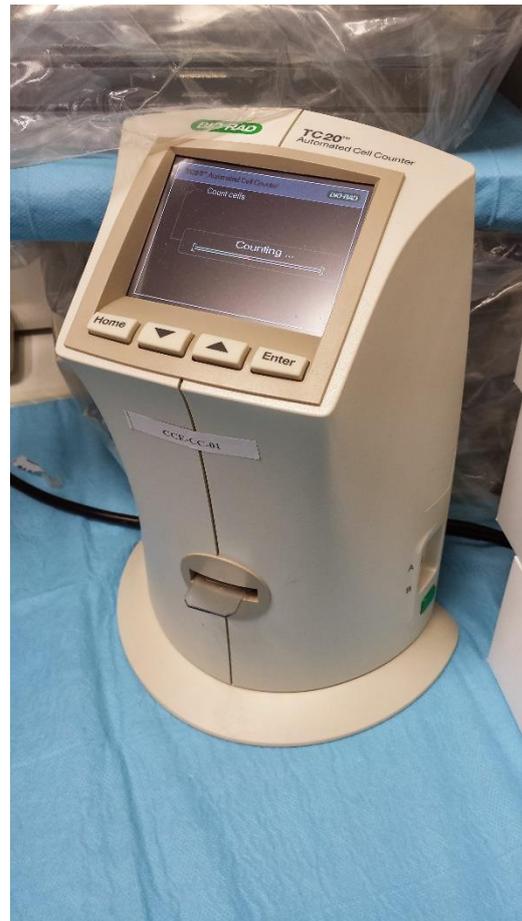
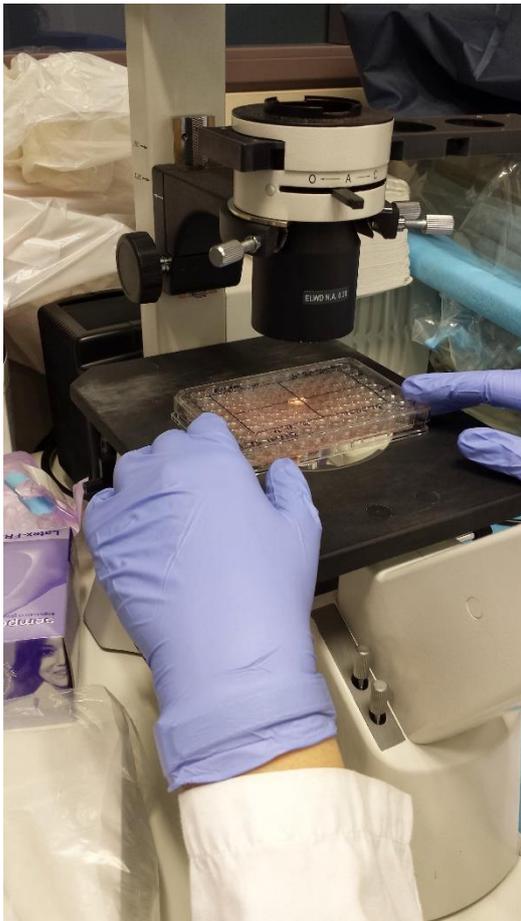


Fig.37 y 38. Observación de las muestras a microscopio. Contador de células automático, es una alternativa al conteo manual de la cámara de Neubauer.



# RESULTADOS



## RESULTADOS

### 16.- Aislamiento celular de DPSCs y PDLSCs.

Las células se extrajeron de la pulpa dental y del ligamento periodontal y se cultivaron según las técnicas expuestas en *Material y Métodos*. A las 24 horas de cultivo, ya se observaron DPSCs y PDLSCs adheridas a la superficie del frasco de cultivo (Fig. 39). A las 48 horas, pequeñas colonias de células de tipo fibroblástico proliferaban y se expandían por todo el frasco. Al cabo de una semana, estas células se mostraban confluentes en un 80% de la totalidad del frasco. Morfológicamente no observamos diferencias entre células procedentes de pulpa dental o de ligamento periodontal (Fig. 39 Ay B).

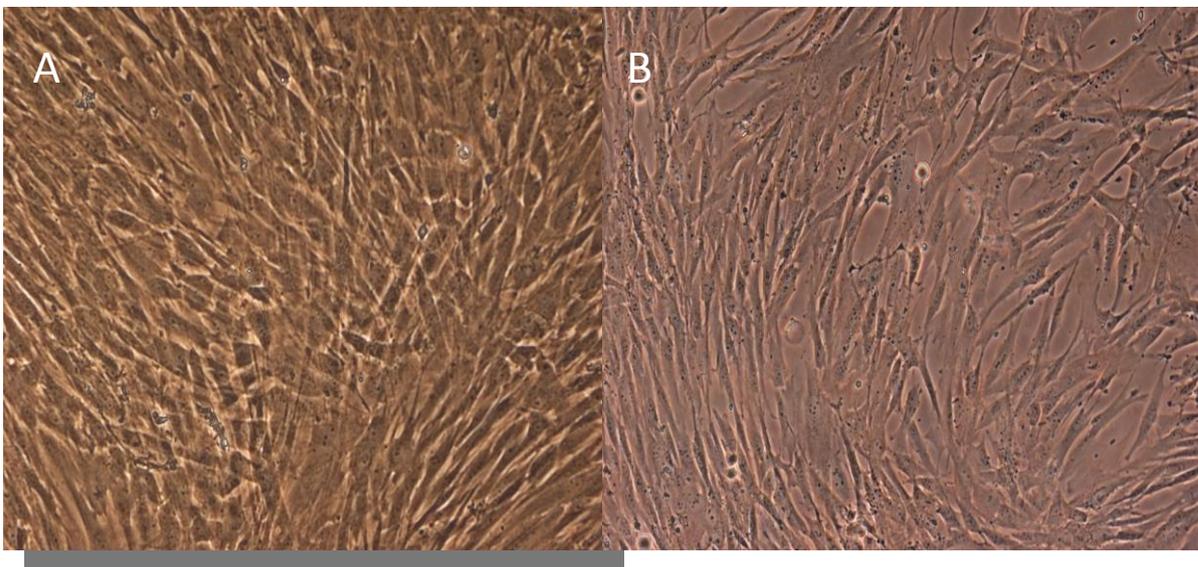


Figura 39. Imagen donde observamos la gran confluencia celular a los 7 días de cultivo. A) DPSCs; B) PDLSCs.



### 17.-Caracterización inmunofenotípica de las DPSCs y PDLSCs.

Las DPSCs y PDLSCs expresaron positividad para los antígenos de membrana celular CD105, CD90, CD73 y negatividad para los antígenos CD45, CD34, CD14, CD19 y HLA-DR, todos incluidos en las recomendaciones de la *Sociedad de Terapia Celular Internacional (International Society of Cellular Therapy)* para la tipificación de estas células (Figura 40). Estos resultados aunados a su carácter de células adherentes constituyen dos de los 3 criterios exigidos para su definición como células MSC.

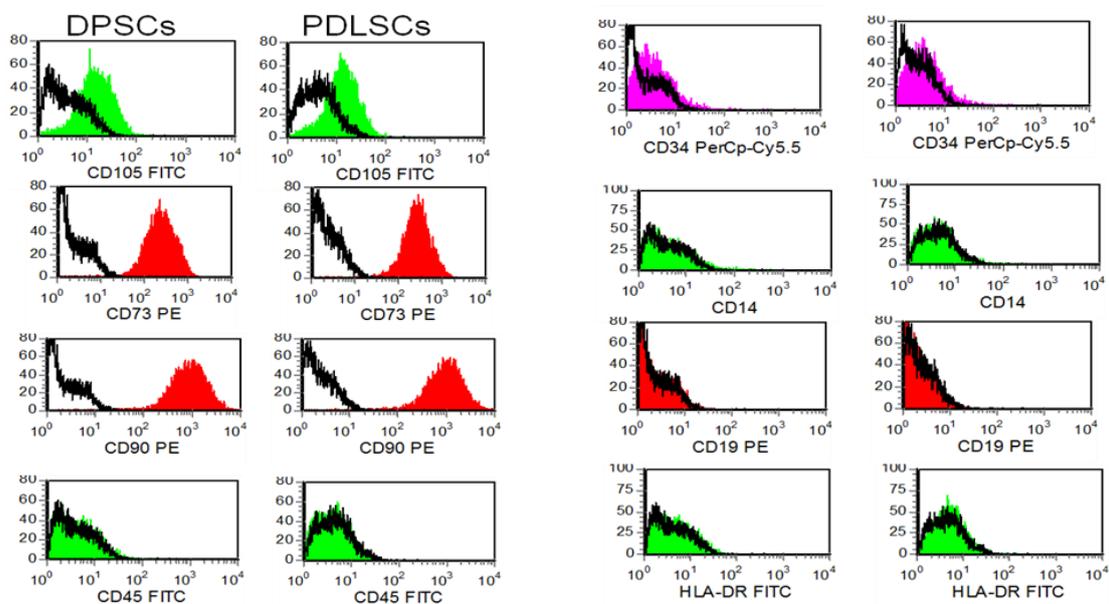


Figura 40. Respuesta a los antígenos de membrana celular que expresaron las DPSCs y PDLSCs.

### 18.-Análisis de viabilidad celular.

Analizamos si para cada condición experimental *material x línea celular* los diferentes niveles de la variable dilución no son un efecto significativo, es decir, si podemos o no considerar que todas las diluciones, para cada material y línea celular, sean estadísticamente equivalentes.



### SDR Pulpa.

Hemos rechazado la hipótesis de que las diluciones no son estadísticamente equivalentes. Al realizar el *test de Kruskal Wallis*, encontramos que existe una diferencia estadísticamente significativa  $p=0.045$  ( $p<0.05$ ). De hecho, podemos observar que la dilución 1/8 (0.125) presenta un mayor grado de absorbancia, que al ser comparado con las otras diluciones es estadísticamente significativo con respecto a la dilución 1/2 ( $p= 0.01795$ ) (Figura 41).

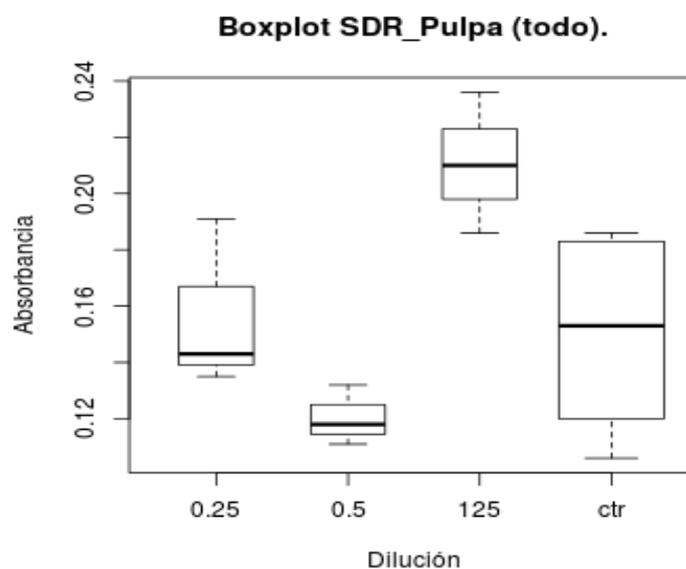


Fig. 41 Plot de Kruskal-Wallis para SDR Pulpa.

### SDR LPO.

De la misma manera que en células de pulpa, la presencia del composite SDR, tuvo diferentes efectos sobre células de ligamento periodontal (LPO) en función del grado de dilución. Hemos rechazado la hipótesis, de que las diluciones no son estadísticamente equivalentes. Al realizar el *test de Kruskal Wallis*, encontramos que existe una diferencia estadísticamente significativa  $p=0.045$  ( $p<0.05$ ). La figura 42 muestra que la dilución 1/8 (0.125) presenta un mayor grado de absorbancia, que al ser comparado con



las otras diluciones es estadísticamente significativo con respecto a la dilución 1/2 ( $p=0.02537$ ).

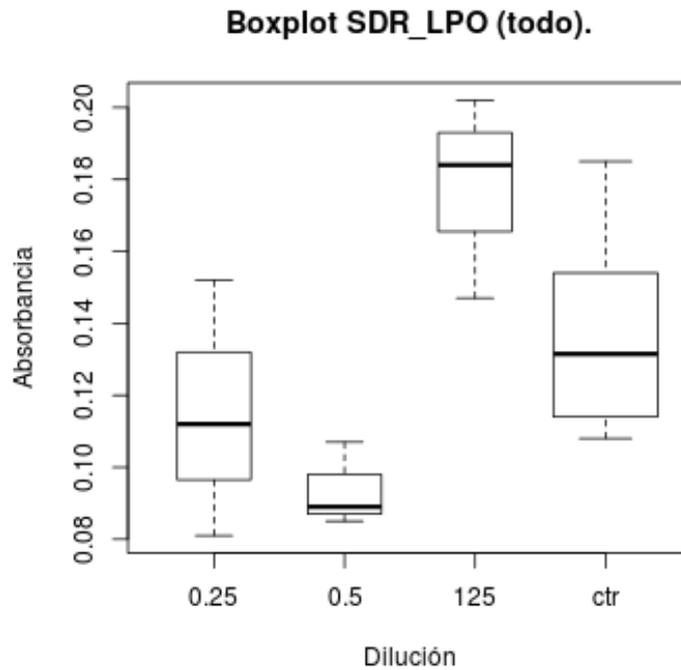


Fig.42 Plot de Kruskal-Wallis para SDR Ligamento Periodontal.

### Venus Pulpa.

Hemos aceptado la hipótesis de que las diluciones no son estadísticamente equivalentes. Al realizar el *test de Kruskal Wallis*, encontramos que no existe una diferencia estadísticamente significativa  $p=0.307$  ( $p>0.05$ ). La Figura 43 muestra que la dilución 0.5, presenta un mayor grado de absorbancia, que al ser comparado con las otras diluciones no es estadísticamente significativo ( $p>0.05$ ).

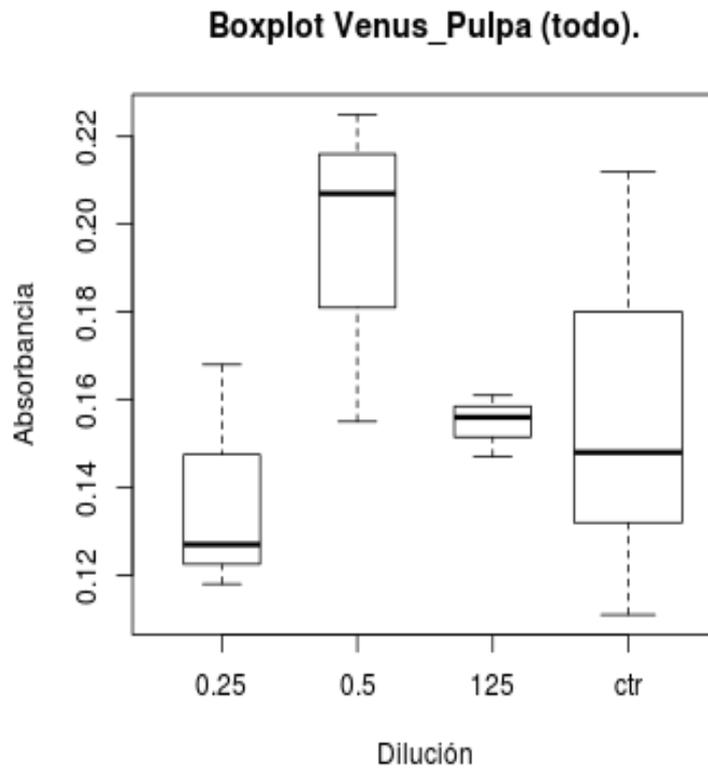


Fig. 43 Plot de Kruskal-Wallis para Venus Pulpa.

### Venus LPO.

Hemos rechazado la hipótesis de que las diluciones no son estadísticamente equivalentes. Al realizar el test de Kruskal Wallis, encontramos que existe una diferencia estadísticamente significativa  $p=0.043$  ( $p<0.05$ ). La figura 44 muestra que la dilución 1/8 (0.125) presenta un mayor grado de absorbancia, que al ser comparado con las otras diluciones es estadísticamente significativo con respecto a la dilución 1/2 ( $p=0.02537$ ).

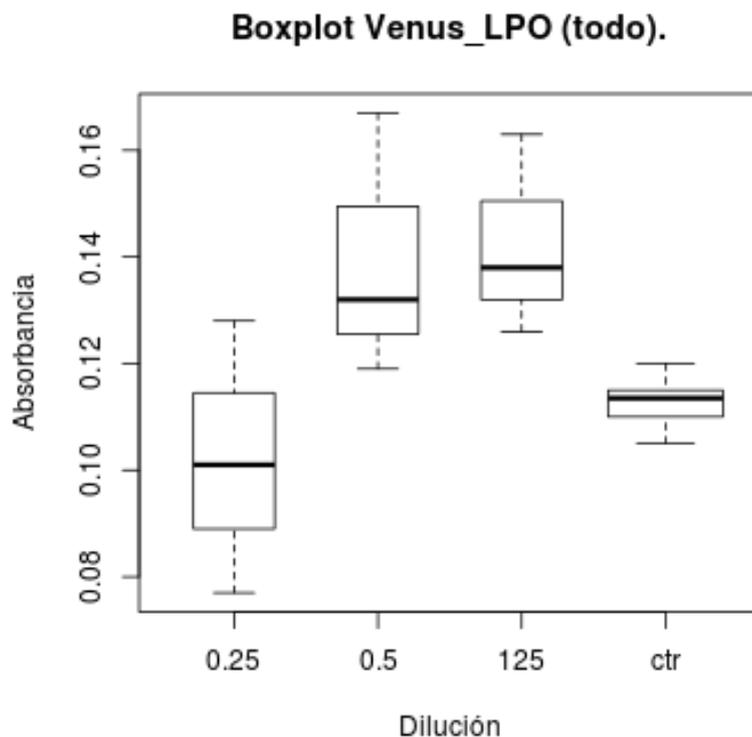


Fig. 44 Plot de Kruskal-Wallis para Venus LPO.

Hemos obtenido que para todos los grupos, excepto para el grupo 'Venus Pulpa', las diluciones son un efecto significativo. Por ello, se decide filtrar el fichero quitando la dilución 1/2 y realizar una nueva comprobación para determinar si ahora, se cumplen las hipótesis.

Una vez eliminada la dilución 1/2, encontramos que ya se cumple la hipótesis de que las diluciones son estadísticamente equivalentes. No obstante, el tamaño de la muestra (tres observaciones por condición) son insuficientes para determinar el efecto de las diluciones sobre la proliferación celular durante los cuatro tiempos (24, 48, 72 y 168h). Por lo que asumimos que la dilución 0.25, es la que más se parece a la condición fisiológica humana, donde los materiales dentales no están directamente en contacto con las células y además el efecto del pH de la saliva, la aplicación de adhesivo dentinario y el sistema inmunológico influyen para que exista una buena respuesta de ser humano a una resina epoxy.



### 1.- SDR-Pulpa

El tratamiento de la línea celular DPSCs con SDR durante 24, 48, 72 y 168 horas, provocó diferencias significativas en la viabilidad celular. Estas diferencias, resultaron dependientes de la duración de la incubación (ver tabla 7 y figura 45). El efecto del material fue menor en cuanto a la proliferación celular conforme pasaron las horas. De este modo, a las 168 horas, las DPSCs recuperaron su capacidad proliferativa.

Tiempo	Diferencia	P valor sig.	LCL	UCL
<b>168 – 24h</b>	36.000	0.0000 ***	29.954	42.0462
<b>168 – 48h</b>	20.667	0.0000 ***	14.620	267.128
<b>168 – 72h</b>	15.333	0.0000***	9.287	213.795
<b>24 – 48h</b>	-15.333	0.0000***	-21.380	-92.872
<b>24 – 72h</b>	-20.667	0.0000***	-26.713	-146.205
<b>48 – 72h</b>	-5.333	0.1135	-11.380	0.7128

Tabla 8.-Efecto del tiempo en la proliferación celular. Kruskal Wallis- test. \*\*\* $p < 0.0001$

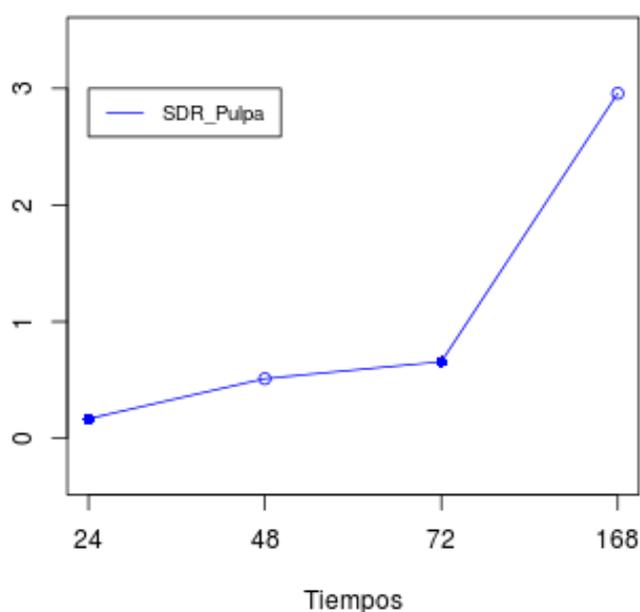


Fig.45 Gráfico de perfil SDR Pulpa distribuido por tiempos.



## 2.- SDR\_LPO

Similar a lo sucedido con la línea celular de la pulpa, el tratamiento de la línea celular PDLSCs con SDR durante 24, 48, 72 y 168 horas provocó diferencias significativas de la viabilidad celular. Estas diferencias, resultaron dependientes de la duración de la incubación (ver tabla 8 y figura 46). No obstante, se ha realizado además un gráfico entre las 24 y las 72h para poder observar las diferencias entre estos tiempos (figura 47). Se observa que durante las primeras 72 horas, no hay casi proliferación, en relación a las 168 horas, aunque entre ellas si resultan estadísticamente significativas ( $p < 0.0001$ ).

Tiempo	Diferencia	P valor sig.	LCL	UCL
<b>168 – 24h</b>	36.000	0.0000 ***	31.334	40.666
<b>168 – 48h</b>	23.33	0.0000 ***	18.668	27.999
<b>168 – 72h</b>	12.67	0.0000***	8.001	17.332
<b>24 – 48h</b>	-12.67	0.0000***	-17.332	-8.001
<b>24 – 72h</b>	-23.33	0.0000***	-27.999	-18.668
<b>48 – 72h</b>	-10.67	0.0000***	-15.332	-6.001

Tabla 9.- Efecto del tiempo en la proliferación celular. Kruskal Wallis- test. \*\*\* $p < 0.0001$

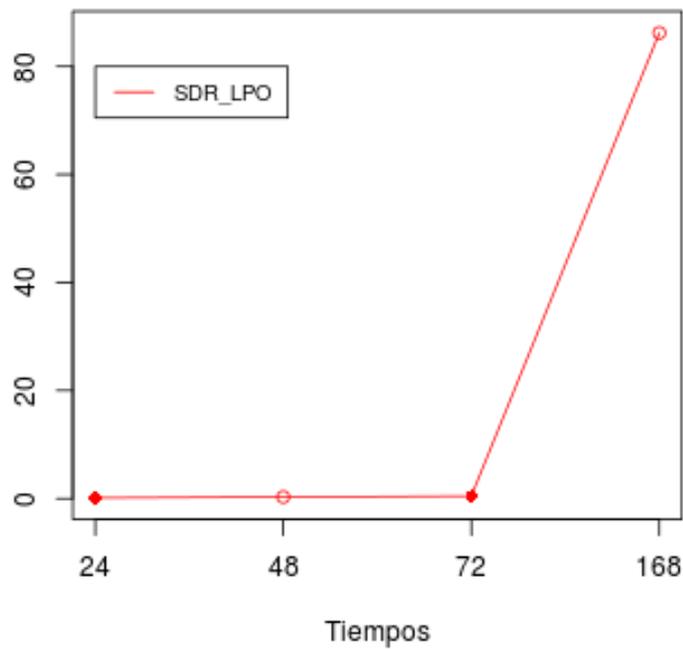


Fig.46 Gráfico de perfil SDR LPO distribuido por tiempos.

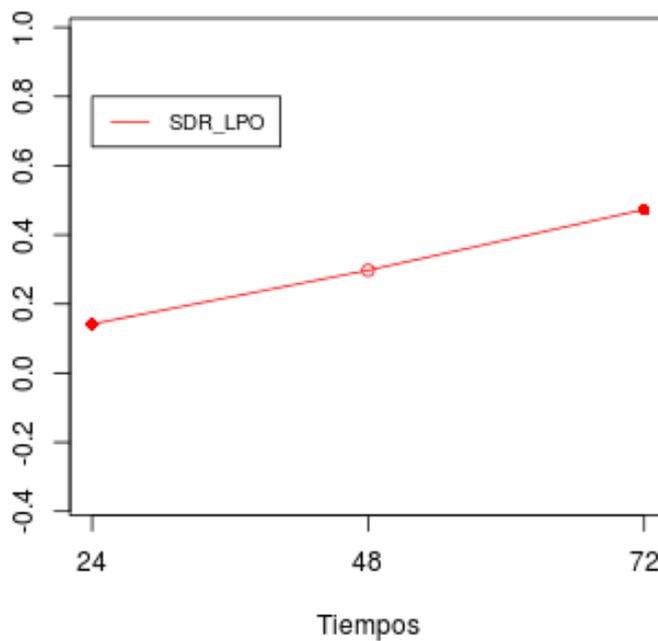


Fig.47 Gráfico de perfil SDR LPO distribuido por tiempos.



### 3. - Venus -Pulpa

El tratamiento de la línea celular DPSCs con Venus durante 24, 48, 72 y 168 horas provocó diferencias significativas de la viabilidad celular. Estas diferencias resultaron dependientes de la duración de la incubación (ver tabla 9 y Figura 48). Se pudieron observar diferencias estadísticamente significativas entre todos los tiempos ( $p < 0.0001$ ).

Tiempo	Diferencia	P valor sig.	LCL	UCL
<b>168 – 24h</b>	36.000	0.0000 ***	31.937	40.063
<b>168 – 48h</b>	24.000	0.0000 ***	19.937	28.063
<b>168 – 72h</b>	12.000	0.0000***	7.937	16.063
<b>24 – 48h</b>	-12.000	0.0000***	-16.063	-7.937
<b>24 – 72h</b>	-24.000	0.0000***	-28.063	-19.937
<b>48 – 72h</b>	-12.000	0.0000***	-16.063	-7.937

Tabla 10. Efecto del tiempo en la proliferación celular. Kruskal Wallis- test. \*\*\* $p < 0.0001$

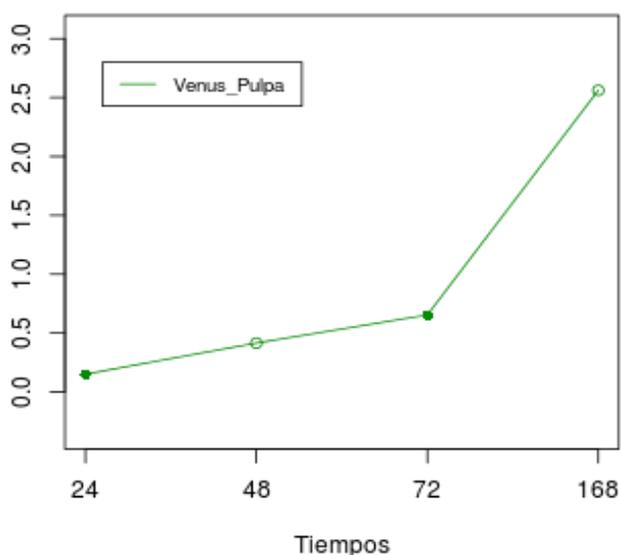


Fig.48 Gráfico de perfil Venus pulpa distribuido por tiempos.



#### 4. - Venus LPO

El tratamiento de la línea celular PDLSCs con Venus durante 24, 48, 72 y 168 horas provocó diferencias significativas de la viabilidad celular. Dichas diferencias resultaron ser dependientes de la duración de la incubación (tabla 10 y figura 49). Se pudieron observar diferencias estadísticamente significativas entre todos los tiempos ( $p < 0.0001$ ).

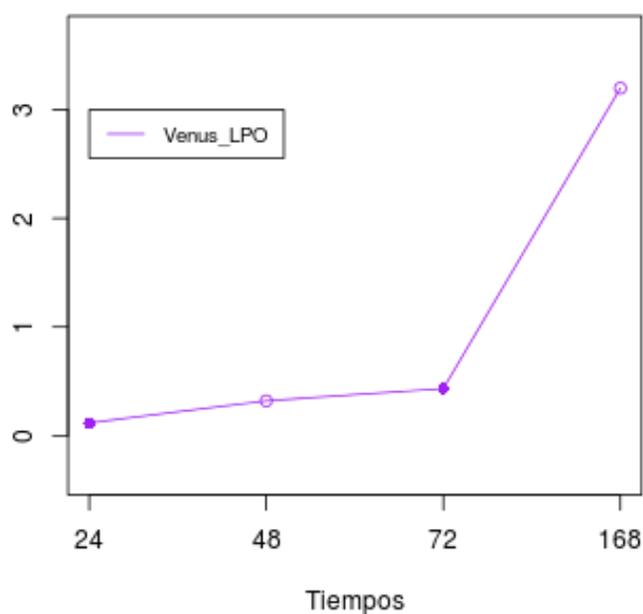


Fig.49 Gráfico de perfil Venus LPO distribuido por tiempos.

Tiempo	Diferencia	P valor sig.	LCL	UCL
<b>168 – 24h</b>	36.000	0.0000 ***	30.809	41.191
<b>168 – 48h</b>	22.583	0.0000 ***	17.393	27.774
<b>168 – 72h</b>	13.417	0.0000***	8.226	18.607
<b>24 – 48h</b>	-13.417	0.0000***	-18.607	-8.226
<b>24 – 72h</b>	-22.583	0.0000***	-27.774	-17.393
<b>48 – 72h</b>	--9.167	0.0000***	-14.357	-3.976

Tabla 11. Efecto del tiempo en la proliferación celular. Kruskal Wallis- test. \*\*\* $p < 0.0001$ .



En el gráfico que puede verse a continuación, durante los tres primeros tiempos (24, 48 y 72h), la línea celular referente a la pulpa dental, resulta obtener mejor rendimiento en cuanto a proliferación celular que la del ligamento periodontal.

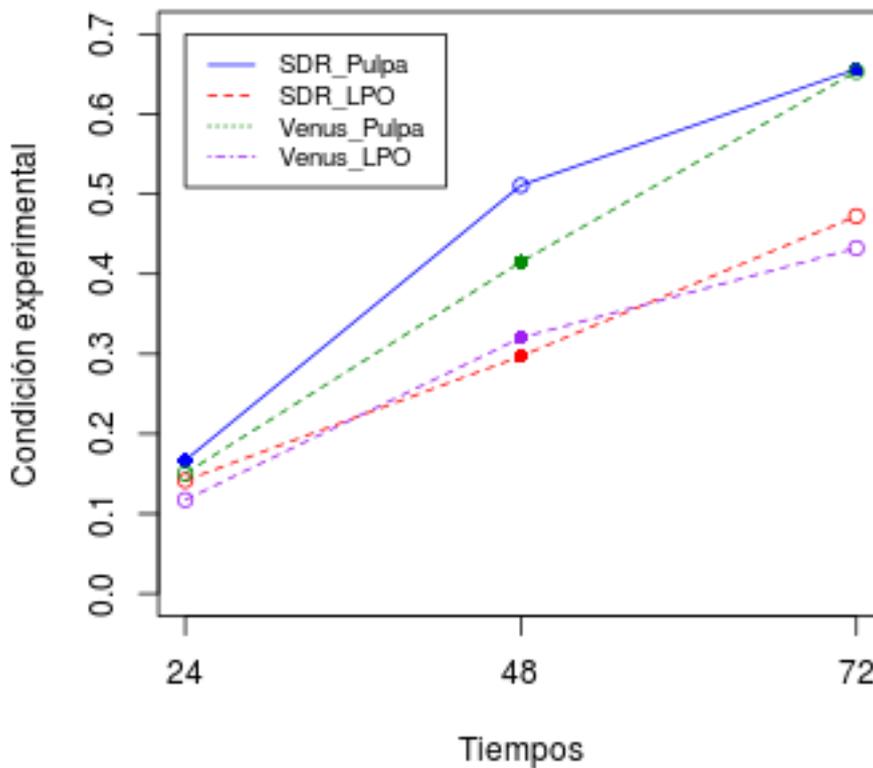


Fig. 50 Gráfico de perfil que muestra las cuatro condiciones distribuidas por tiempos hasta los 72 h

Sin embargo incorporando el último tiempo (168h), podemos observar un aumento de la proliferación en la relación entre el composite SDR y la línea celular de LPO. La proliferación a las 168h resulta estadísticamente significativa, en relación a los otros tiempos. ( $p < 0.0001$ ).

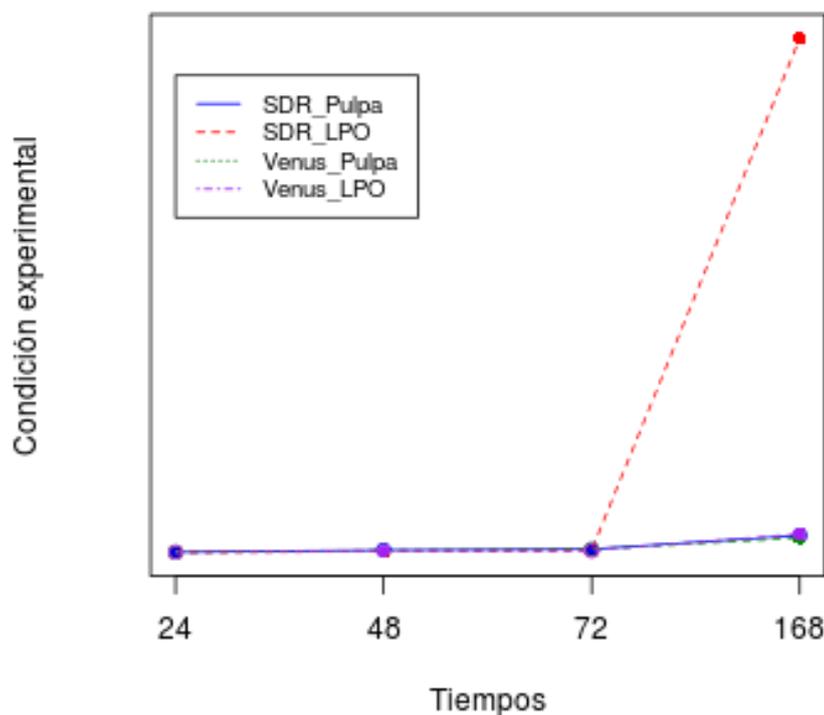


Fig. 51 Gráfico de perfil que muestra las cuatro condiciones distribuidas por tiempos hasta los 168 h

### 19.-Apoptosis o muerte celular.

Teniendo en cuenta que la mayor influencia del material tuvo lugar a las 24 horas, debido a la escasa proliferación de los cultivos, se ha realizado una comparación con respecto al grupo control (sin tratamiento) y a un grupo control positivo (*estaurosporina*). En la figura 52, se muestran imágenes del cultivo de los grupos SDR, Venus, control positivo y control negativo. Las imágenes azul poco intenso y más desestructuradas corresponden a células muertas, mientras que las más brillantes y uniformes corresponden a células vivas. Los resultados muestran un 7% de células apoptóticas tanto en el grupo SDR como Venus, siendo un resultado bastante parecido al grupo control negativo (4%). Sin embargo en el grupo control positivo el porcentaje de células apoptóticas fue en torno al 65% a las 24 horas.

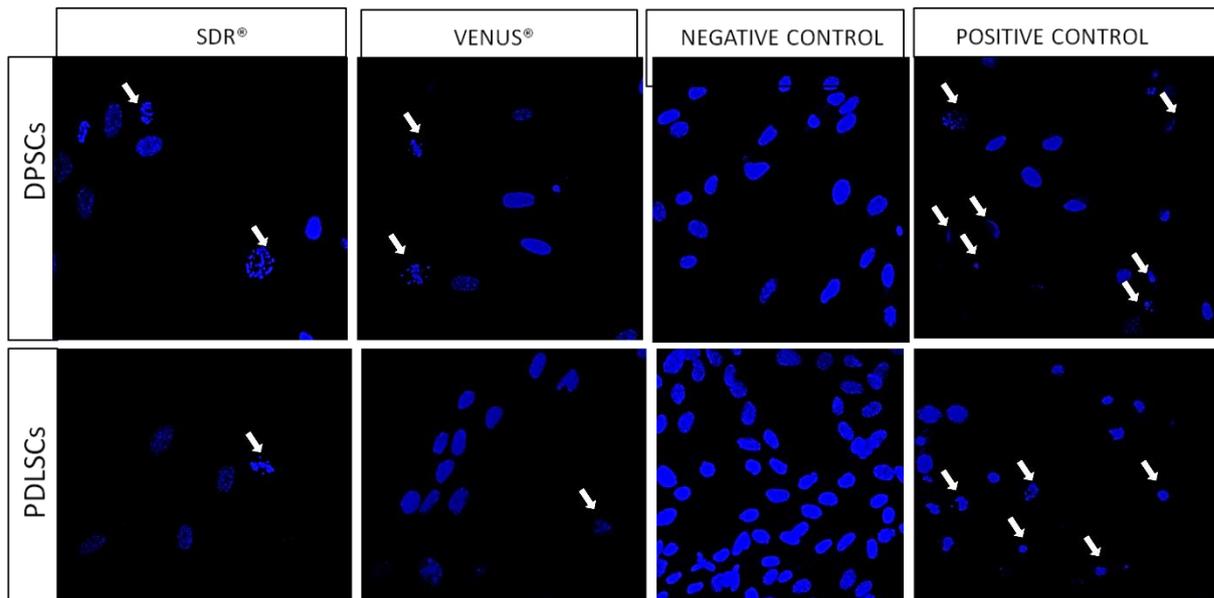


Fig.52 Análisis microscópico de la prueba de apoptosis celular. Las flechas blancas señalan núcleos apoptóticos. Escala 50  $\mu$ m.

Para evaluar la apoptosis comparamos cada línea celular con ambos materiales, y así obtuvimos cuatro combinaciones para analizar.

- A. *Análisis de la apoptosis para SDR LPO*: No hubo diferencias estadísticamente significativas entre todas las diluciones del material, analizadas de modo conjunto y al ser comparadas con el grupo control. El efecto del material en la línea LPO no fue significativa ( $0 < v < 1$ ) = 0.141.
- B. *Análisis de la apoptosis para Venus LPO*: Cuando se estudiaron las diferentes diluciones de Venus, encontramos diferencias entre diluciones analizadas de forma no agrupada; así que los analizamos 2 a 2 encontrando diferencias estadísticamente significativas entre grupo 1/2 y 1/4; en el segundo grupo compuesto por las diluciones 1/4 y 1/8, no hubo diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, en comparación con el grupo control, el primer grupo (1/2, 1/4) tuvo un valor de  $0 < v < 1$  ( $v = 0.106$ ), mientras que el segundo grupo (1/4, 1/8) presentó un valor de  $v = 0.187$ . Agrupándolos, el resultado es  $v = 0.142$ , por lo que no hubo diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control de forma agrupada.



- C. *Análisis de la apoptosis para SDR Pulpa:* después de estudiar las diluciones por separado, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas, por lo que se utilizó la *prueba de Kramer* y obtuvimos un valor  $v = 0.090$ , que no era estadísticamente significativo en comparación con el grupo control.
- D. *Análisis de la apoptosis para Venus Pulpa:* después de estudiar el efecto de la dilución, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Posteriormente se compararon los resultados combinados con el grupo de control, y el resultado fue  $v = 0.104$ , sin diferencias estadísticamente significativas.

## **20.- Estabilidad del fenotipo tras la exposición a SDR y VENUS.**

Para el análisis del fenotipo, que fue realizado mediante inmunofluorescencia, sólo hemos valorado la exposición a la dilución más alta (1/2). La figura 53 muestra la expresión de los marcadores mesenquimales CD73, CD90 y CD105 para las células de pulpa dental, donde se puede observar que no hay diferencias con el control tras la exposición. La misma circunstancia sucede para la línea celular PDLSCs (figura 54).

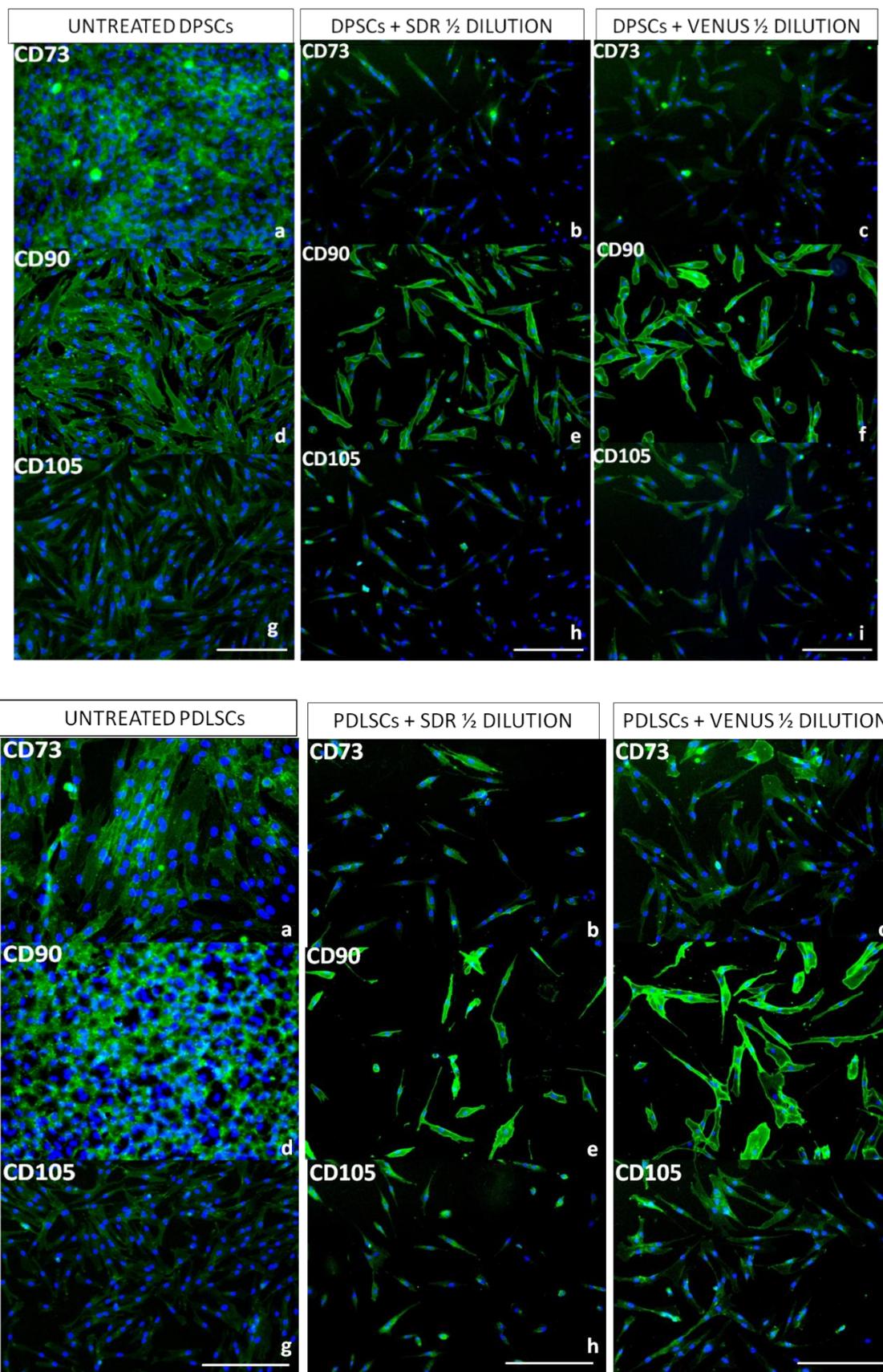


Fig. 53 y 54 Expresión de los marcadores mesenquimales mediante inmunofluorescencia.



# DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN.

**E**l propósito de este estudio, ha sido comprobar el efecto de dos composites de bajo peso (Venus bulkfill y SDR), cuando se ponen en contacto con dos de las líneas celulares más importantes con las que se verán relacionados durante su vida funcional.

### **A) Idoneidad del ensayo in vitro:**

Como se ha visto anteriormente, entendemos por biomaterial a aquel elemento, que se integra de forma armónica con los tejidos naturales del organismo, sin causarles daño alguno y sin que el cuerpo humano lo rechace, estableciéndose por tanto un equilibrio de compatibilidad biológica entre ambos (145, 146). Dentro de esta relación biomaterial/huésped, también podemos referirnos al término toxicidad, el cual se entiende como el potencial relacionado con la dosis de un material que puede causar la muerte celular o tisular (144). Durante la práctica clínica de la odontología, se han cometido errores ante la escasa evidencia científica, por una carencia de investigaciones sobre la biocompatibilidad de los materiales de uso odontológico, antes de su uso clínico. Existen pocas investigaciones científicas que avalan la biocompatibilidad de estos materiales ya que desde su aparición los investigadores se han enfocado más en estudiar sus propiedades químico-mecánicas, que su compatibilidad biológica, a pesar de la mayor importancia de esta última, ya que dichos materiales estarán en contacto directo con el complejo dentino-pulpar y con los tejidos periapicales adyacentes por un tiempo prolongado, pudiendo ser capaces de producir diferentes tipos de reacciones tanto locales como sistémicas.

Para muchos autores, la ausencia de dolor y la falta de alteraciones periapicales detectadas a través de exámenes radiográficos han sido parámetros suficientes para definir la compatibilidad biológica de un material determinado. Hoy se sabe que esto es insuficiente.



Los diferentes procedimientos, métodos y técnicas de investigación de la biocompatibilidad de los materiales de uso odontológico, se encuentran regulados de acuerdo con los protocolos descritos en la literatura y con la normativa universal regida por la ANSI/ADA (*Instituto Estadounidense de estándares de la Asociación Dental Americana*), y las normas ISO 10993 (Organización Internacional para la Estandarización). La normativa que regula los estudios de *citotoxicidad in vitro* es la ISO 10993-5:2009 (221, 222).

Para saber si un material es biocompatible o no se debe seguir una secuencia de pruebas que van desde los ensayos *in vitro* hasta las pruebas de experimentación en animales y finalmente las pruebas de su utilización en humanos (223).

Las pruebas de biocompatibilidad se han identificado como:

- *Pruebas iniciales o primarias* que incluyen pruebas de citotoxicidad (evaluación del efecto de los materiales sobre poblaciones celulares para determinar la respuesta inflamatoria o inmunológica) y pruebas de mutagenicidad o carcinogénesis que valoran los efectos de los materiales sobre el material genético celular.
- *Pruebas intermedias o secundarias* que permiten medir los niveles de reacciones inflamatorias o de respuestas inmunitarias frente a un material (pruebas de irritación de mucosas, sensibilidad cutánea e implantación).
- *Pruebas de uso o terciarias* las cuales se realizan en animales y humanos, una vez se hayan realizado las pruebas primarias, las pruebas secundarias y tras la pertinente aprobación por un Comité de Ética certificado.

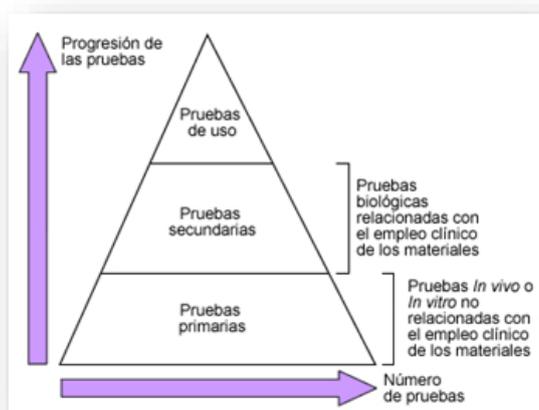


Fig. 55 Necesidad de realizar diferentes tipos de pruebas de biocompatibilidad. De Villegas (2008)(223)



La biocompatibilidad de los materiales dentales y médicos es evaluada de forma rutinaria mediante estudios *in vitro* (224-227). En las pruebas *in vitro* se puede determinar: la muerte o el crecimiento celular, la función celular y, en algunos casos, se puede evaluar la integridad del material genético de la célula (228).

Los ensayos *in vitro* se han mostrado como sistemas muy útiles para la evaluación de los efectos biológicos de los biomateriales y presentan la ventaja de no requerir el uso de animales de experimentación. Además son ensayos rápidos de realizar y presentan una buena relación coste/efectividad (221).

In Vitro	In Vivo	Pruebas de Uso
<b>1.-Citotoxicidad:</b>	<b>1.-Irritación de mucosas.</b>	<b>1.-En animales.</b>
-Crecimiento celular.		
-Permeabilidad de la membrana.		
-Biosíntesis enzimática.		
-Pruebas indirectas (barreras).		
-Pruebas de barrera dentinal.		
<b>2.- Carcinogénesis.</b>	<b>2.- Sensibilidad cutánea.</b>	<b>2.-En humanos.</b>
<b>3.- Mutagénesis.</b>	<b>3.-Implantación.</b>	

Tabla 12. Pruebas de biocompatibilidad de materiales de uso odontológico.



Los ensayos *in vitro*, se ajustan al llamado “Principio de las tres R”. Fue descrito en 1959 por Rusell, en el libro “*The Principles of Humane Experimental Technique*” (229). Este principio se basa en:

- *Reemplazar* la experimentación con animales por otros métodos que no impliquen su uso.
- *Reducir* su número cuando sea necesario utilizarlos.
- *Refinar* las técnicas para aminorar su sufrimiento.

Se parte de la idea de reemplazar los animales por otros métodos, aunque, en muchos casos, existe la necesidad de experimentar con ellos y sólo se pueda aspirar a la reducción de la muestra y al refinamiento de la técnica.

Diferentes autores han desarrollado gran cantidad de pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de drogas y compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales cultivos primarios y órganos aislados como líneas celulares establecidas (220).

Dentro de esta batería de ensayos *in vitro*, como métodos de toxicología alternativa útiles y necesarios para la solicitud de ensayos clínicos de una sustancia determinada, se encuentran los llamados ensayos de citotoxicidad, capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares conocidos, la aparición de posibles efectos adversos. Dichos efectos se basan en la interferencia con la estructura y/o las propiedades esenciales para la supervivencia celular, la proliferación celular o el desarrollo normal de sus funciones, tales como: la integridad de la membrana y del citoesqueleto, los procesos metabólicos, los procesos de síntesis y degradación, la liberación de constituyentes celulares o productos al medio, la regulación iónica y la división celular (230).

El ensayo de citotoxicidad permite estudiar el efecto tóxico de un biomaterial sobre un tipo determinado de células.

El comportamiento de una célula viva en contacto con un material extraño es un problema esencial en las aplicaciones biomédicas de polímeros sintéticos. Este tipo de estudios toxicológicos constituye una herramienta eficaz y su resultado puede servir de



base para hacer predicciones y proyecciones razonables acerca de las condiciones en que el producto ofrece seguridad.

Para este fin, se utilizan diversas líneas celulares que son cultivadas en contacto con los materiales en estudio y tras un periodo variable de tiempo, se miden las tasas de proliferación (estrogenicidad) y muerte celular (toxicidad).

Los cultivos de células son modelos toxicológicos alternativos de gran sensibilidad, lo que es una ventaja importante para el estudio de toxicidad de rutina de los biomateriales, aunque no siempre las respuestas *in vitro* son indicadoras de reacciones *in vivo* ya que las condiciones que pueden reproducirse *in vitro* son solo una parte de las que pueden presentarse *in vivo*. Uno de los principales atractivos del uso del cultivo de tejidos es la posibilidad de observar el comportamiento de tipos específicos de células vivas en un ambiente controlado (231-234).

Con el desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos, los estudios *in vitro* se han convertido en uno de los métodos más importantes para la evaluación biológica de los materiales dentales, constituyendo una referencia obligada antes de profundizar en los estudios *in vivo*. Estos sistemas no presentan la complejidad que un sistema *in vivo* conlleva, debido al gran número de variables que interaccionan. Se han realizado estudios de validación que han demostrado que existe una alta correlación entre los ensayos de toxicidad local *in vitro* e *in vivo*, presumiblemente debido a que los mecanismos de acción son generalmente los mismos.

Para algunos autores el ensayo de contacto material/célula, también llamado test directo, es el tipo de estudio que más se aproxima a las condiciones que se dan *in vivo* (235).

### **B) Uso de los materiales dentales:**

Una gran parte de las resinas compuestas que se utilizan en la actualidad siguen basando su composición en monómeros de metacrilato. Tales monómeros han mostrado evidente potencial citotóxico por lo que el manejo y el comportamiento posterior de estos materiales deben ser correctamente evaluados (83, 164, 169, 221, 236-242).

Existen una gran cantidad de estudios, que muestran que los materiales dentales utilizados en odontología restauradora, y basados en resinas compuestas se han



mostrado susceptibles a los efectos higroscópicos e hidrolíticos, dependiendo de su composición química y estructural. Estos efectos no solo afectan a las propiedades físicas y mecánicas de dichos materiales, sino que además suponen la liberación a corto plazo de monómeros residuales así como la elución a largo plazo de compuestos degradados hacia el medio oral (236, 243).

Para la mayor parte de composites, el grado de conversión durante el curado, se ha mostrado en porcentajes que van desde el 55 al 75%, cuando se realiza la fotopolimerización con lámparas halógenas o de luz LED (244, 245) pudiendo obtenerse hasta un 80% en laboratorio bajo unas condiciones especiales de luz, calor, presión o bajo una combinación de ellas.

Por otro lado, el grado de conversión puede verse disminuido hasta el 25-35%, si existe contacto entre el oxígeno y la capa superficial de la resina, durante la reacción (capa de inhibición por oxígeno), lo que se traduce en más componentes residuales liberados al medio, con el consecuente riesgo biológico (244-246). A nivel clínico, la existencia de más monómeros sin reaccionar supone una mayor aparición de tinciones, mayor acúmulo de placa, y menor resistencia al desgaste. Este problema sin embargo es de fácil solución y ya desde los años 90 del pasado siglo, *Bergmann y cols*, describieron el uso de un gel de glicerina para bloquear los radicales libres de dicha capa inhibida y facilitar la conversión durante la fotopolimerización (247).

Así mismo, los diferentes estudios han demostrado que el modo de polimerización del material también es un factor relevante y, por tanto, puede influir en la citotoxicidad. De este modo el *tipo de fotocurado, la unidad de fotopolimerización (luz halógena o LED), la energía empleada o incluso el modo de curado (continuo, incremental, pulsátil...)*, influyen en el grado de conversión de los monómeros y por tanto en la toxicidad de los composites (244, 248).

Finalizado el proceso clínico, los materiales comienzan a verse afectados por otros procesos independientes del manejo clínico, pero que igualmente se derivan en la liberación de monómeros con potencial citotóxico. De este modo, los composites se verán afectados por procesos de erosión y degradación. Estos procesos degradativos pueden ocurrir debido a diversos factores: *térmicos, mecánicos y químicos*. De hecho, los estudios han mostrado que enzimas como la *pseudocolinesterasa* y la *colecilol esterasa* (249), pueden degradar los monómeros de las resinas, liberando al medio



sustancias de metacrilato. Así mismo, existe una tendencia de estas enzimas, a actuar sobre monómeros específicos por los que presentan mayor afinidad. De esta forma, la degradación de la matriz resinosa causada por diversos mecanismos dependerá tanto de la composición química de los monómeros como de la actividad enzimática individual (250). Es decir, los materiales que usamos se verán ineludiblemente sometidos al medio oral donde deben ejercer su función de biocompatibilidad y donde serán afectados por los factores propios de la funcionalidad del sistema masticatorio y del medio oral.

La liberación de componentes, consecuencia de la degradación, por otro lado inevitable, del material, conlleva por tanto, la posibilidad de aparición de efectos toxicológicos a diversos niveles, dependiendo de la composición de los materiales empleados, de su manejo clínico y de la propia idiosincrasia del huésped (la composición de su saliva, sus hábitos, la presencia de parafunciones o de otras alteraciones sistémicas...).

La mayoría de estudios han mostrado la siguiente clasificación de mayor a menor citotoxicidad de los principales monómeros que se utilizan en las resinas: BisGMA, UDMA, TEGDMA, HEMA (251-253).

Además otros componentes de los composites, tales como los fotoiniciadores, como la *canforoquinona*, se han mostrado potencialmente citotóxicos.

Las resinas compuestas se han relacionado con reacciones pulpares, por lo general moderadas y generalmente reversibles, tales como: dilatación y congestión de los vasos sanguíneos, respuestas inflamatorias, producción de dentina irregular, así como desplazamiento de los odontoblastos, y aparición de sensibilidad post-operatoria.

Estudios como los de *Hanks*, relacionan los monómeros de BisGMA, UDMA y TEGDMA con la capacidad de reducir la síntesis de ADN y la síntesis proteica, inhibiendo la función metabólica de la célula, lo que llevaría a una toxicidad crónica produciendo una mayor vulnerabilidad de la célula o tejido ante agresiones provenientes de otras fuentes, pudiendo incluso producir necrosis pulpar (254).

La mayoría de los materiales dentales compuestos de sistemas poliméricos han presentado efectos tóxicos cuando se ensayan en animales de experimentación.

Algunos experimentos *in vivo* han demostrado que las resinas de restauración y los cementos a base de acrílicos son irritantes para la pulpa, relacionándolos con el hecho



de la difusión de algunos monómeros a través de la dentina, lo cual se ha evidenciado con el metacrilato de metilo y otros componentes (255).

A pesar de todo lo mencionado, muy pocas investigaciones han mostrado que existan efectos sistémicos adversos. Se ha observado que resinas dentales colocadas en cavidades dentales profundas, con fondo cercano a la pulpa, e incluso con la pulpa expuesta, solo producen una respuesta tóxica muy ligera a pesar de manifestar elevada toxicidad *in vitro*. Las resinas de restauración dental, ya sean selladores de fosas y fisuras o composites, se aplican habitualmente en pequeñas cantidades en sitios donde no hay contacto directo con el tejido pulpar o gingival, siendo además poco probable su ingestión, por lo que se minimiza el riesgo sistémico de toxicidad por vía oral (256).

Principalmente se han observado las alteraciones que a nivel clínico pueden producirse como consecuencia de una mala polimerización del material (degradación del compuesto, mayor probabilidad de fractura del mismo o de los tejidos dentales remanentes, mayor filtración marginal o mayor desgaste), un uso inadecuado de los agentes grabadores, un mal proceso de adhesión, una inadecuada preparación y aislamiento del campo (con aparición de caries recidivante, sensibilidad postoperatoria, dolor) e incluso un mal pulido de las restauraciones (con mayor acúmulo de placa y alteraciones gingivales localizadas, mayor probabilidad de tinciones...).

El potencial tóxico se puede incrementar por la polimerización incompleta del material, sobre todo en el caso de resinas fotocuradas por la inhibición del proceso de polimerización por parte del oxígeno y por la contaminación con humedad durante la colocación del material, ya que se inhibe la polimerización de las cadenas de monómeros, disminuyendo el grado de conversión de monómeros a polímeros. Esto induce a pensar que los compuestos polimerizados adecuadamente son relativamente biocompatibles porque muestran solubilidad mínima (238).

En otro tipo de estudios *in vitro* se han usado para evaluar la toxicidad celular en diferentes células como: *fibroblastos de ratones L-929 y 3T3*, *ligamento periodontal humano*, *líneas celulares permanentes de hámster chino V-79* a las que se les aplicó ensayos biológicos como el MTT o el ensayo de reducción de bromuro de tetrazolium, han demostrado que los materiales dentales a base de resina independientemente del tipo, producen citotoxicidad de moderada a severa en una mezcla recién polimerizada o no curada, e incluso pueden llegar a producir efectos mutagénicos.



Es decir, lo que más afecta al huésped en el uso de este tipo de materiales, es el inadecuado manejo clínico y no tanto la composición de los materiales restauradores en este caso. Las reacciones observadas en el tejido pulpar o gingival con la aplicación de los materiales de restauración raramente son debidas a efectos tóxicos del material. Si las resinas se aplican apropiadamente, se espera que sean bien toleradas por el tejido pulpar y gingival. Se considera que las reacciones pulpares son debidas fundamentalmente al efecto de bacterias en la interfase diente–recubrimiento (256).

Si el tejido no está expuesto y si se evita la penetración bacteriana, entonces las reacciones gingivales son principalmente atribuibles a la placa bacteriana

Sabemos, por tanto, que el éxito clínico en odontología restauradora se basa en seguir una serie de *principios biológicos* y *mecánicos* y hoy día sin duda, unos *principios estéticos* (armonía con el medio). Dentro de esos principios biológicos, se deberá velar por la preservación del espacio biológico periodontal, conservación óptima de la estructura dental y protección del complejo dentino-pulpar (257, 258).

Porque a pesar de los numerosos estudios que muestran el potencial citotóxico de los componentes habituales de los materiales restauradores, no se producen los, como cabría pensar, consecuentes efectos sistémicos, es debido a la complejidad del sistema que forma parte del propio huésped.

Casi todos los materiales usados en odontología son citotóxicos, pero como la liberación de sus componentes se produce de forma lenta y gradual pocos producen efectos adversos reales. Los efectos biológicos dependen de la vía de administración y la oral es la menos lesiva. La vía oral se considera como la menos peligrosa debido a que la absorción de los compuestos es la más lenta (236, 259).

Además, el material restaurador se utiliza en la cavidad oral de pacientes que presentan un sistema inmune y una serie de barreras biológicas que le sirven de protección y son capaces de limitar e incluso anular los efectos de los monómeros liberados por un incorrecto manejo o por el desgaste funcional de los composites. Sabemos que en la cavidad oral entran en juego componentes como la saliva, el fluido crevicular, mecanismos como la obliteración de los túbulos dentinarios o la formación de dentina secundaria...cuya función es proteger las estructuras bucales y preservar la salud del individuo. En el medio intraoral la biodegradación incluye el proceso de destrucción y



disolución en la saliva, pero también existe una destrucción fisicoquímica, desgaste y erosión causados por la comida, la masticación y la propia actividad bacteriana (237).

Este hecho puede atribuirse a que en las técnicas *in vitro* la acción de los migrantes tóxicos sobre las células es constante, mientras que *in vivo* la acción es aguda (temporal), debido a la rápida migración de todo el monómero residual gracias a la acción de la saliva como agente lixivante y diluyente. De esta forma, los estudios de *Pham y Ferracane*, encontraron que aproximadamente el 60% de los componentes migrables de una resina dental eran eluidos en solución salina durante las 8 horas posteriores al fraguado (255, 260, 261).

La reacción adversa intraoral más común a los materiales dentales es la *reacción liquenoide* en la mucosa oral. Es una reacción de tipo alérgico, comúnmente asociada a restauraciones de amalgama y oro, aunque cada vez más, se relacionan también con las resinas por la universalización de su uso (262, 263).

### **C) Investigaciones previas con materiales bulk fill:**

Los materiales que se han analizado en este estudio, surgen con la finalidad de mejorar el trabajo clínico diario, ofreciendo una disminución de los tiempos de trabajo y un comportamiento mecánico similar al de otros tipos de materiales compuestos (242, 264-266).

Los estudios de *Ilie*, probaron estos materiales valorando su comportamiento clínico con respecto a las estructuras dentales de dientes temporales y permanentes y encontraron que los materiales tipo *bulk-fill*, se muestran como una opción para realizar restauraciones más rápidas tanto en dentición temporal como en dentición permanente y tienen un comportamiento similar o ligeramente mejor que un *composite nanohíbrido* que usaron como control (267). Estos estudios concluyeron que el uso de composites fluidos *bulkfill* presentaba ventajas en la realización de restauraciones profundas, cavidades estrechas o con difícil acceso, a la vez que las cavidades más grandes podrían restaurarse más fácilmente y más rápido (267, 268). En esta línea se encuentran estudios similares, que muestran la utilidad de estos materiales en la restauración de cavidades profundas, y en restauraciones de clase I y II (265, 269-271). *Rosatto y col.* además compararon el tratamiento de grandes restauraciones MOD (3 paredes) usando



composites *bulkfill*, respecto a otros materiales restauradores. Encontraron que los *bulkfill*, presentaban un menor estrés de contracción y mayor resistencia a la fractura (272). Se considera un material adecuado para grandes restauraciones MOD.

Sus buenas propiedades han servido para probar su utilidad en otros procedimientos dentales como la cementación de bracketts o la restauración con pernos de fibra (273).

Los estudios también nos muestran sus limitaciones, generalmente en términos de estética. Los *bulkfill*, presentan una menor habilidad de enmascaramiento que los composites convencionales dada su translucidez, lo que obliga a finalizar las restauraciones con otros composites (274). *Leprince y col.* advierten sin embargo, que la necesidad de finalizar la restauración con otro tipo de composites, no se debe solo a las propiedades estéticas, sino también, a una menor capacidad de resistir las fuerzas oclusales, lo que hace que los materiales *bulkfill* se degraden con mayor facilidad (275).

Como sabemos, una mayor degradación implica un mayor desprendimiento de monómeros en el medio oral, lo que aumenta la capacidad citotóxica del material. En esta línea, los materiales *bulkfill* presentan una composición bastante similar al resto de materiales compuestos (239-242, 276), por lo que podemos esperar un comportamiento similar en términos de citotoxicidad. Los estudios con pruebas de elución, muestran que se produce una mayor elución de monómeros sin reaccionar como el TEDGMA, durante las primeras 24 horas y que se va reduciendo posteriormente. Los materiales *bulkfill*, se muestran estables químicamente en medio acuoso en condiciones muy parecidas al medio oral (240, 241, 276). Los resultados obtenidos en nuestro estudio nos muestran una actividad similar, con un aumento de la toxicidad a las 24 horas y una disminución progresiva hacia la semana.

En la bibliografía hemos encontrado numerosos estudios que se basan en las propiedades mecánicas o químicas de este tipo de composites (277-286), sin embargo, no se encuentran apenas estudios que evalúen la biocompatibilidad o citotoxicidad de los mismos (287).



#### **D) Limitaciones de este estudio:**

El ensayo MTT predominantemente se ha utilizado como una medida de la viabilidad celular que, a menudo, pero no siempre, se correlaciona con el número de células vivas.

Fue utilizado originalmente como un ensayo para la determinación de la muerte celular. Actualmente se utiliza principalmente, como un medio para determinar la viabilidad, ya que presenta muchas ventajas al ser comparado con otros métodos más tediosos (288).

Como sabemos, el proceso de reducción de MTT a menudo se ha atribuido a la actividad de deshidrogenasas o la reducción de las enzimas mitocondriales. A pesar de ello, existen otros mecanismos implicados en el proceso para su bio-reducción que se han presentado en la literatura. Se podría decir, que es un proceso más complejo que se acepta que principalmente sucede a nivel mitocondrial.

Existen otros métodos *in vitro*, que se han utilizado para determinar la viabilidad celular. Por ejemplo, la técnica de tinción del *azul tripán* es un procedimiento ampliamente utilizado para la tinción de las células muertas (289, 290). En este método, la viabilidad celular debe ser determinada utilizando el recuento de las células no teñidas, mediante un microscopio u otros instrumentos. En nuestro caso un contador celular automático. Sin embargo, la tinción de *azul tripán* no puede ser utilizada para distinguir entre las células sanas y las células que permanecen vivas aunque hayan perdido todas o algunas de sus funciones (289, 291).

Uno de los problemas que pueden encontrarse al realizar el ensayo MTT es que los resultados sean imprecisos cuando el ensayo presenta densidades muy altas o muy bajas de células. Una producción excesiva de formazano a partir de una densidad celular elevada puede entorpecer el procedimiento, debido a la formación de cristales de formazano a partir de la reducción del MTT. Dichos cristales pueden ser depositados fuera de las células y ser erróneamente eliminados con el sobrenadante después de la incubación con MTT. Un menor nivel de producción de formazano minimiza los riesgos de que esto ocurra. Grandes depósitos de formazano podrían afectar mecánicamente a las células (292). Para evitar que esto suceda, se realizó un estudio de



densidad celular, previamente al ensayo de proliferación. De este modo, nos aseguramos que la densidad es adecuada para no afectar al ensayo MTT.

Existen otros métodos alternativos que tratan de evitar dichos problemas. De este modo, la empresa japonesa *Dojindo (Dojindo Molecular Technologies, Inc. Japan)* desarrolló un método, llamado WSTs, usando sales de tetrazolio altamente solubles en agua. Esta técnica produce formazanos solubles en agua y es adecuada para ensayos de proliferación celular y de citotoxicidad. Su principal ventaja, es que no forma cristales como MTT (293).

No obstante, el método MTT se muestra superior a otros métodos debido a su facilidad de uso, su seguridad, su alta reproductibilidad, y por ser un método ampliamente utilizado en la bibliografía para los ensayos de viabilidad celular y citotoxicidad. Es el método más conocido para la determinación de las actividades de la deshidrogenasa mitocondrial en las células vivas.

Las principales limitaciones propias del estudio se deben al hecho de ser un ensayo *in vitro*, lo que limita o hace que seamos cautelosos a la hora de establecer conclusiones que sean extrapolables a la práctica clínica. Este experimento utiliza los linajes celulares más importantes en relación a la práctica odontológica. No obstante, estos linajes se hayan aislados en un medio de cultivo que no reproduce las condiciones propias del medio oral. Por tanto, se obvian tanto las barreras mecánicas como los componentes propios del sistema inmune. Esto hace que este tipo de estudios, por si solos, sean limitados y precisen de otras investigaciones en la misma línea y del apoyo de los ensayos clínicos que pueden dar una mayor repercusión científica a los resultados obtenidos.



# CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES.

**E**n este estudio, se han evaluado dos tipos de composites de última generación (SDR y Venus Bulkfill) y considerados como composites de empaquetamiento en masa o de grandes incrementos, y se han realizado pruebas *in vitro* con las líneas celulares más comunes en la cavidad oral, como son células derivadas del ligamento periodontal y células de la pulpa dental.

A la finalización del estudio y según los resultados obtenidos, podemos concluir que:

- ✓ Los composites estudiados dada su composición, similar en muchos aspectos a la de otros composites derivados de polímeros de metacrilato, producen una respuesta citotóxica esperada.
- ✓ La evolución en los días de seguimiento de los cultivos, muestra la respuesta celular ante este efecto es limitada en el tiempo, con mayor repercusión las primeras 24 horas y se reduce de forma gradual hasta la semana.
- ✓ El grado de apoptosis o muerte celular producido por estos composites es similar al grupo control negativo, con lo que son aptos para su uso odontológico.
- ✓ El fenotipo de origen mesenquimal que presentan las DPSCs y PDLSCs no se ve modificado tras la exposición a los composites, ya que mantienen su condición de células madre de origen mesenquimal.



# **BIBLIOGRAFÍA**



# BIBLIOGRAFÍA.

1. Malterud MI, Kutsch VK. The evolution of dental caries treatment. *Gen Dent.* 2012;60(5):386-9.
2. Sołtysiak A. Comment: low dental caries rate in Neandertals: the result of diet or the oral flora composition? *Homo.* 2012;63(2):110-3.
3. Silikas N, Eliades G, Watts DC. Light intensity effects on resin-composite degree of conversion and shrinkage strain. *Dent Mater.* 2000;16(4):292-6.
4. Santerre JP, Shajii L, Leung BW. Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001;12(2):136-51.
5. Viljanen EK, Skrifvars M, Vallittu PK. Dendrimer/methyl methacrylate co-polymers: residual methyl methacrylate and degree of conversion. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2005;16(10):1219-31.
6. Nahsan FP, Mondelli RF, Franco EB, Naufel FS, Ueda JK, Schmitt VL, et al. Clinical strategies for esthetic excellence in anterior tooth restorations: understanding color and composite resin selection. *J Appl Oral Sci.* 2012;20(2):151-6.
7. Colson DG. A safe protocol for amalgam removal. *J Environ Public Health.* 2012;2012:517391.
8. Geier DA, Carmody T, Kern JK, King PG, Geier MR. A significant dose-dependent relationship between mercury exposure from dental amalgams and kidney integrity biomarkers: a further assessment of the Casa Pia children's dental amalgam trial. *Hum Exp Toxicol.* 2013;32(4):434-40.
9. Geier DA, Kern JK, Geier MR. A prospective study of prenatal mercury exposure from maternal dental amalgams and autism severity. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2009;69(2):189-97.
10. Leinfelder KF. Composite resins. *Dent Clin North Am.* 1985;29(2):359-71.
11. H. A. *Odontología Estética. Selección y colocación de Materiales.* Barcelona: Labor; 1988.
12. Bowen RL, Rodríguez, MS. Tensile strength and modulus of elasticity of tooth structure and several restorative materials. *J Am Dent Assoc.* 1962;64:378-87.
13. Bayne SC. Dental biomaterials: where are we and where are we going? *J Dent Educ.* 2005;69(5):571-85.



14. Anusavice KJ. Informatics systems to assess and apply clinical research on dental restorative materials. *Adv Dent Res.* 2003;17:43-8.
15. Rodríguez D, Pereira N. Evolución y tendencias actuales en resinas compuestas. *Acta Odontológica Venezolana.* 2008(46):19.
16. Affairs ACoS. Direct and indirect restorative materials. *J Am Dent Assoc.* 2003;134(4):463-72.
17. Cobb DS, MacGregor KM, Vargas MA, Denehy GE. The physical properties of packable and conventional posterior resin-based composites: a comparison. *J Am Dent Assoc.* 2000;131(11):1610-5.
18. Chain MB, L. Restauraciones estéticas directas en dientes posteriores. Sao Paulo, Brasil. 2001.
19. Hervás-García A, Martínez-Lozano MA, Cabanes-Vila J, Barjau-Escribano A, Fosalve P. Composite resins. A review of the materials and clinical indications. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006;11(2):E215-20.
20. Ferracane JL. Is the wear of dental composites still a clinical concern? Is there still a need for in vitro wear simulating devices? *Dent Mater.* 2006;22(8):689-92.
21. Fortin D, Vargas MA. The spectrum of composites: new techniques and materials. *J Am Dent Assoc.* 2000;131 Suppl:26S-30S.
22. Combe E, Burke F. Contemporary Resin-based Composites Materials for Direct Placement Restorations: Packables, Flowables and Others. *DentUpdate.* 2000;27:326-36.
23. Sarrett DC. Clinical challenges and the relevance of materials testing for posterior composite restorations. *Dent Mater.* 2005;21(1):9-20.
24. Chain MC, C., Andriani O. Estética. São Paulo. Brasil. 2002.
25. Fong H, Dickens SH, Flaim GM. Evaluation of dental restorative composites containing polyhedral oligomeric silsesquioxane methacrylate. *Dent Mater.* 2005;21(6):520-9.
26. Ferracane JL, Marker VA. Solvent degradation and reduced fracture toughness in aged composites. *J Dent Res.* 1992;71(1):13-9.
27. Söderholm KJ, Shang SW. Molecular orientation of silane at the surface of colloidal silica. *J Dent Res.* 1993;72(6):1050-4.
28. Rueggeberg FA, Caughman WF, Curtis JW, Davis HC. Factors affecting cure at depths within light-activated resin composites. *Am J Dent.* 1993;6(2):91-5.
29. Moszner N, Salz U. *New developments of polymeric dental composites. Prog Polym Sci.* 2001;26:535-76.
30. McCabe JF, Kagi S. Mechanical properties of a composite inlay material following post-curing. *Br Dent J.* 1991;171(8):246-8.



31. Sabbagh J, Ryelandt L, Bachérius L, Biebuyck JJ, Vreven J, Lambrechts P, et al. Characterization of the inorganic fraction of resin composites. *J Oral Rehabil.* 2004;31(11):1090-101.
32. Williemans GC, J. Lambrechts, P. Braem, M. Vanherle, G. Nano-indentation hardness and Young's modulus of filler particles of dental restorative materials compared with human enamel. *J Biomed Mater Res.* 1992;27:747-55.
33. Davidson CL, Feilzer AJ. Polymerization shrinkage and polymerization shrinkage stress in polymer-based restoratives. *J Dent.* 1997;25(6):435-40.
34. Bowen R. Properties of silica reinforced polymer for dental restoration. *J Am Dent Assoc.* 1963;66:57-64.
35. Sarkar NK. Internal corrosion in dental composite wear. *J Biomed Mater Res.* 2000;53(4):371-80.
36. Schmidseder J. *Aesthetic dentistry.* Stuttgart ; New York: Thieme; 2000. xii, 297 p. p.
37. Mohsen NM, Craig RG. Effect of silanation of fillers on their dispersability by monomer systems. *J Oral Rehabil.* 1995;22(3):183-9.
38. Mohsen NM, Craig RG. Hydrolytic stability of silanated zirconia-silica-urethane dimethacrylate composites. *J Oral Rehabil.* 1995;22(3):213-20.
39. Antonucci JD, S. Fowler, B. Xu, H. McDonough, W. Chemistry of Silanes: Interfaces in dental polymers and composites. *Trans Acad Dent Mater.* 2003;17:81-109.
40. Yearn JA. Factors affecting cure of visible light activated composites. *Int Dent J.* 1985;35(3):218-25.
41. Kuijs RH, Fennis WM, Kreulen CM, Barink M, Verdonschot N. Does layering minimize shrinkage stresses in composite restorations? *J Dent Res.* 2003;82(12):967-71.
42. Leinfelder KF, Broome JC. In vitro and in vivo evaluation of a new universal composite resin. *J Esthet Dent.* 1994;6(4):177-83.
43. Lutz F, Phillips RW. A classification and evaluation of composite resin systems. *J Prosthet Dent.* 1983;50(4):480-8.
44. Bayne ST, D. *Arte y ciencia: Operatoria Dental.* Edición T, editor. Madrid: Harcourt Brace.; 1999.
45. Phillips R, Avery D, Mehra R, Swatz M, McCone R. *Observations on a composite resin for class II restorations: Three-years report.* *J Prost Dent* 1973;30(6):891-7.
46. Belvedere P. Posterior composites experiencing growth trend. Interview by Phillip Bonner. *Dent Today.* 1999;18(3):44, 6-7.
47. Tveit A, Espelid I. Radiographic diagnosis of caries and marginal defect in connection with radiopaque composite fillings. *Dent Mter.* 1986;2:159-62.



48. Lang BR, Jaarda M, Wang RF. Filler particle size and composite resin classification systems. *J Oral Rehabil.* 1992;19(6):569-84.
49. Miyasaka T. Effects of shape and size of silanated fillers on mechanical properties of experimental photo cure composite resins. *J Dent materials.* 1996;15:98-110.
50. Braga RR, Ballester RY, Ferracane JL. Factors involved in the development of polymerization shrinkage stress in resin-composites: a systematic review. *Dent Mater.* 2005;21(10):962-70.
51. Wakefield CW, Kofford KR. Advances in restorative materials. *Dent Clin North Am.* 2001;45(1):7-29.
52. Lutz E, Krejci I, Oldenburg TR. Elimination of polymerization stresses at the margins of posterior composite resin restorations: a new restorative technique. *Quintessence Int.* 1986;17(12):777-84.
53. Dietschi D, Magne P, Holz J. Recent trends in esthetic restorations for posterior teeth. *Quintessence Int.* 1994;25(10):659-77.
54. Okamura H, Miyasaka T, Hagiwara T. Development of dental composite resin utilizing low-shrinking and low-viscous monomers. *Dent Mater J.* 2006;25(3):437-44.
55. Geraldi S, Perdigão J. Microleakage of a New Restorative System in Posterior Teeth. *J Dent Res.* 2003;81:127-65.
56. Bayne SC, Thompson JY, Swift EJ, Stamatiades P, Wilkerson M. A characterization of first-generation flowable composites. *J Am Dent Assoc.* 1998;129(5):567-77.
57. Dietschi D, Herzfeld D. In vitro evaluation of marginal and internal adaptation of class II resin composite restorations after thermal and occlusal stressing. *Eur J Oral Sci.* 1998;106(6):1033-42.
58. Olmez A, Oztas N, Bodur H. The effect of flowable resin composite on microleakage and internal voids in class II composite restorations. *Oper Dent.* 2004;29(6):713-9.
59. Labella R, Lambrechts P, Van Meerbeek B, Vanherle G. Polymerization shrinkage and elasticity of flowable composites and filled adhesives. *Dent Mater.* 1999;15(2):128-37.
60. Yazici AR, Ozgünaltay G, Dayangaç B. The effect of different types of flowable restorative resins on microleakage of Class V cavities. *Oper Dent.* 2003;28(6):773-8.
61. Kemp-Scholte CM, Davidson CL. Marginal integrity related to bond strength and strain capacity of composite resin restorative systems. *J Prosthet Dent.* 1990;64(6):658-64.
62. Christensen GJ. Direct restorative materials. What goes where? *J Am Dent Assoc.* 2003;134(10):1395-7.
63. Perry R, Kugel G, Leinfelder K. One-year clinical evaluation of SureFil packable composite. *Compend Contin Educ Dent.* 1999;20(6):544-50, 52-3.



64. Suzuki S. Does the wear resistance of packable composite equal that of dental amalgam? *J Esthet Restor Dent*. 2004;16(6):355-65; discussion 65-7.
65. de Souza FB, Guimarães RP, Silva CH. A clinical evaluation of packable and microhybrid resin composite restorations: one-year report. *Quintessence Int*. 2005;36(1):41-8.
66. Suh B, Cripe C, Yin R. Light intensity and exposure time effectson light cured composites,. *J Dent Res*. 1998;77(Special issue B):Abst. No. #73. 12.
67. Loureiro CC, P., Eduardo CP, E. Santos, J. In vitro evaluation of wear of the packable resin composites. *Journal of Dental Research*. 2001;80:68.
68. Thompson V, Williams E, Bailey W. *Dental Resins with Reduced Shrinkage During Hardening*,. *J Dent Res* 1979;58:1522-32.
69. Stansbury JW. Synthesis and evaluation of new oxaspiro monomers for double ring-opening polymerization. *J Dent Res*. 1992;71(7):1408-12.
70. Byerley TJ, Eick JD, Chen GP, Chappelow CC, Millich F. Synthesis and polymerization of new expanding dental monomers. *Dent Mater*. 1992;8(6):345-50.
71. Eick JD, Byerley TJ, Chappell RP, Chen GR, Bowles CQ, Chappelow CC. Properties of expanding SOC/epoxy copolymers for dental use in dental composites. *Dent Mater*. 1993;9(2):123-7.
72. Krenkel T, Bowles B. Determination of polymerization shrinkage stress in low shrinkage epoxy resins resins. *Journal of Dental Research*. 1999;78:315.
73. Kaufman K, Chappelow W, (1999), -An. Determination of polymerization and darkcurein epoxy/polyols by FTIR. 1999.
74. Chappelow WE, E. Photopolymerizable expanding matrix resin systems for low stresses composites. *Journal of Dental Research* 1999;78:371.
75. Condon PF, J. The effects of composite formulation on polymerization stress. *Journal of the American Dental Association*. 2000;131(4):497-503.
76. Freilich CG, G. Fiber reinforced composites. Quintessence Publishing Co Inc Chicago. 2000.
77. Ferracane J. New polymer resins for dental restoratives. *Operative Dentistry Supplement*. 2001;6:199-209.
78. Tilbrook DA, Clarke RL, Howle NE, Braden M. Photocurable epoxy-polyol matrices for use in dental composites I. *Biomaterials*. 2000;21(17):1743-53.
79. Weinmann W, Thalacker C, Guggenberger R. Siloranes in dental composites. *Dent Mater*. 2005;21(1):68-74.
80. Eick JD, Smith RE, Pinzino CS, Kostoryz EL. Stability of silorane dental monomers in aqueous systems. *J Dent*. 2006;34(6):405-10.



81. Bouillaguet S, Gamba J, Forchelet J, Krejci I, Wataha JC. Dynamics of composite polymerization mediates the development of cuspal strain. *Dent Mater.* 2006;22(10):896-902.
82. Palin WM, Fleming GJ, Nathwani H, Burke FJ, Randall RC. In vitro cuspal deflection and microleakage of maxillary premolars restored with novel low-shrink dental composites. *Dent Mater.* 2005;21(4):324-35.
83. Sengun AS, Hiller H, Ozer K, Schmalz G. Cytotoxicity of a Silorane-Based Composite in a Dentin Barrier. Department of Operative Dentistry and Periodontology University of Regensburg Germany. 2004.
84. Culberstson BT, Wan F, K. Copolymerization of Multymethacrylate derivatives of styrene ally alcohol copolymer. *Journal of Macromolecular Science Pure and Applied Chemistry.* 1997;A34:1249-60.
85. Culberstson BT, Wan F, K. Multymethacrylate derivatives of styrene ally alcohol copolymers in dental restoratives. *Journal of Dental Research.* 1997;76:77.
86. Culberstson BT, Wan F, K. Preparation and evaluation of visible light cured multymethacrylates for dental composites. *Journal of Macromolecular Science Pure and Applied Chemistry.* 1997;A34:2405-21.
87. Miyasaki MA, L. Synthesis and polymerization of acrylic monomers with pendant spiro ortho ester and cyclic carbonate groups. *Polymer Preprints.* 1997;38:165-6.
88. Moszner DV, W. Radical ring opening monomers for dental composites. *Polymer Preprints.* 1997;38:86-7.
89. Norling TW, P. Rawls, O. New polymer in dentistry. *Journal of Dental Research.* 1999;78:233.
90. Rawls O. Low shrinkage resin from liquid crystal diacrylate monomers. *Polymer Preprints.* 1997;38:167-8.
91. Lovell LG, Newman SM, Bowman CN. The effects of light intensity, temperature, and comonomer composition on the polymerization behavior of dimethacrylate dental resins. *J Dent Res.* 1999;78(8):1469-76.
92. Wei WJ, K. A new class organic-inorganic hybrid dental materials. *Polymer Preprints.* 1997;38:112-23.
93. Gravel C, Laine L. Synthesis and characterization of a new amino functionalized silsesquioxane. *Polymer Preprints.* 1997;38:155-6.
94. Bárrales-Rienda JM. Síntesis y Preparación de Materiales Hídricos Orgánico/Inorgánico. *Ormóceros. Nuevas Aplicaciones de los Materiales Polímeros. Revista de Plásticos Modernos [Internet].* 1996; 72(403):[257-74 pp.].
95. Wei W, Jin K, Xu J. Novel organic-inorganic chemical hybrid fillers for dental composite materials. *Journal Applied Polymer Science* 1998;70:1689-99.



96. Antonucci L, Stransbury J. Facile synthesis of acrylic organo silsesquioxanes for dental applications. *Polymer Preprints* 1997;38:118-9.
97. Khatri H, Stansbury J. Investigation of alternatives to urethane dimethacrylate in dental resins. *Journal of Dental Research*. 1999;78(371).
98. Bertoldi A. Ormoceros. Una nueva posibilidad en Odontología Restauradora. Disponible en: <http://www.red-dental.com/ot004401.htm2006> [
99. Stefanello A. *Odontología Restauradora y Estética*. São Paulo: Actualidades Médico Odontológicas Latinoamérica.; 2005.
100. Söderholm KJ. Degradation of glass filler in experimental composites. *J Dent Res*. 1981;60(11):1867-75.
101. Kreulen CM, van Amerongen WE. Wear measurements in clinical studies of composite resin restorations in the posterior region: a review. *ASDC J Dent Child*. 1991;58(2):109-23.
102. Leinfelder KF, Wilder AD, Teixeira LC. Wear rates of posterior composite resins. *J Am Dent Assoc*. 1986;112(6):829-33.
103. Chapman RJ, Nathanson D. Excessive wear of natural tooth structure by opposing composite restorations. *J Am Dent Assoc*. 1983;106(1):51-3.
104. Bourgogne A, Nicholls J, Brudvik J. In vitro two-body wear of inlays-onlays composite resin restoratives. *J Prosthet Dent*. 1991;65:206-14.
105. Craig R. *Materiales de Odontología Restauradora*. . Décima edición. ed. Madrid: Editorial Harcourt Brace.; 1998.
106. Leinfelder KF. Using composite resin as a posterior restorative material. *J Am Dent Assoc*. 1991;122(4):65-70.
107. Söderholm KJ. Influence of silane treatment and filler fraction on thermal expansion of composite resins. *J Dent Res*. 1984;63(11):1321-6.
108. Ping Chaing BK. Polymers in the service of prosthetic dentistry. *J Dent*. 1984;12(3):203-14.
109. Santos JL, K. O estágio atual das resinas compostas. *Rev Ass paul Cirurg Dent*. 1982;36(3):322-5.
110. Baratieri LN. *Dentística : procedimentos preventivos e restauradores*. Rio de Janeiro, RJ: Livraria Editora Santos; 1989. xvii, 509 p. p.
111. Hu X, Marquis PM, Shortall AC. Influence of filler loading on the two-body wear of a dental composite. *J Oral Rehabil*. 2003;30(7):729-37.
112. Mandarino F. Estudo comparativo das partículas de carga de diferentes tipos de resinas compostas. *E A P*. 1989;3:27-31.
113. Miyagawa Y, Powers JM. Prediction of color of an esthetic restorative material. *J Dent Res*. 1983;62(5):581-4.



114. Dennison JB, Powers JM, Koran A. Color of dental restorative resins. *J Dent Res.* 1978;57(4):557-62.
115. Feilzer AJ, De Gee AJ, Davidson CL. Quantitative determination of stress reduction by flow in composite restorations. *Dent Mater.* 1990;6(3):167-71.
116. Braga RR, Ferracane JL. Alternatives in polymerization contraction stress management. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(3):176-84.
117. Manhart J, García-Godoy F, Hickel R. Direct posterior restorations: clinical results and new developments. *Dent Clin North Am.* 2002;46(2):303-39.
118. Chen HY, Manhart J, Hickel R, Kunzelmann KH. Polymerization contraction stress in light-cured packable composite resins. *Dent Mater.* 2001;17(3):253-9.
119. Sankarapandian KK, H. Influence of resin molecular structure on the processibility and physical behavior of a dental composite matrix. *Journal of Advanced Materials.* 1997;28:59-63.
120. Behr EH, N. Flexural strength of fiber reinforced bars after different types of loading. *Journal of Dental Research.* 1999;78:394.
121. Imazato JI, B. Water sorption and color stability of composite containing the antibacterial monomer MDPB. *Journal of Dentistry.* 1999;27(4):279-83.
122. Imazato S, Torii M, Tsuchitani Y, McCabe JF, Russell RR. Incorporation of bacterial inhibitor into resin composite. *J Dent Res.* 1994;73(8):1437-43.
123. Imazato S, McCabe JF. Influence of incorporation of antibacterial monomer on curing behavior of a dental composite. *J Dent Res.* 1994;73(10):1641-5.
124. Vaidyanathan KM, H. Nathoo, R. Antimicrobial activity and its retention in an antibacterial composite. *Journal of Dental Research.* 1999;78:314.
125. Vaidyanathan KM, H. Nathoo, R. Effect of antimicrobial ingredient on the color stability of composite. *Journal of Dental Research.* 1999;78:313.
126. Skrtic D, Antonucci JM, Eanes ED. Improved properties of amorphous calcium phosphate fillers in remineralizing resin composites. *Dent Mater.* 1996;12(5):295-301.
127. Park MS, Eanes ED, Antonucci JM, Skrtic D. Mechanical properties of bioactive amorphous calcium phosphate/methacrylate composites. *Dent Mater.* 1998;14(2):137-41.
128. Skrtic D, Antonucci JM, Eanes ED, Eichmiller FC, Schumacher GE. Physicochemical evaluation of bioactive polymeric composites based on hybrid amorphous calcium phosphates. *J Biomed Mater Res.* 2000;53(4):381-91.
129. Bohlig CM, K. Douglas, G. Plaque prevention due to polymer bonded enamel. *Journal of Dental Research.* 2000;79:273.
130. Rozzi LM, K. Toothbrush abrasion resistance of a plaque and acid resistant polymeric coating. *Journal of Dental Research.* 1999;78:114.



131. Friedl KH, Hiller KA, Schmalz G. Placement and replacement of composite restorations in Germany. *Oper Dent.* 1995;20(1):34-8.
132. MacInnis WA, Ismail A, Brogan H. Placement and replacement of restorations in a military population. *J Can Dent Assoc.* 1991;57(3):227-31.
133. Qvist V, Qvist J, Mjör IA. Placement and longevity of tooth-colored restorations in Denmark. *Acta Odontol Scand.* 1990;48(5):305-11.
134. Choi KK, Ferracane JL, Hilton TJ, Charlton D. Properties of packable dental composites. *J Esthet Dent.* 2000;12(4):216-26.
135. Feilzer AJ, De Gee AJ, Davidson CL. Curing contraction of composites and glass-ionomer cements. *J Prosthet Dent.* 1988;59(3):297-300.
136. Davidson CDG, A. Feilzer, A. The competitions between the composite dentin bond strength and the polymerization contraction stress. *Journal of Dental Research.* 1984;63(12):1396-9.
137. Abdalla AI, Davidson CL. Comparison of the marginal integrity of in vivo and in vitro Class II composite restorations. *J Dent.* 1993;21(3):158-62.
138. Ferrari RD, C. Sealing performance of scotchbond multipurpose Z100 in class II restorations. *American Journal of Dentistry.* 1996;9(4):145-9.
139. Hilton DF, J. Cavity preparation factors and Microleakage of class II resin composite insertion techniques at intraoral temperature. *American Journal of Dentistry.* 1999;12(3):123-30.
140. Zhan Y, Wang XY, Li SL, Fu X, Yu GY, Cao T, et al. [Cytotoxicity of two dental materials on fibroblasts derived from human embryonic stem cells]. *Beijing Da Xue Xue Bao.* 2012;44(1):1-5.
141. Bakopoulou A, Papadopoulos T, Garefis P. Molecular toxicology of substances released from resin-based dental restorative materials. *Int J Mol Sci.* 2009;10(9):3861-99.
142. Matfield M. Animal experimentation: the continuing debate. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1(2):149-52.
143. Yoshino P, Nishiyama CK, Modena KC, Santos CF, Sipert CR. In vitro cytotoxicity of white MTA, MTA Fillapex® and Portland cement on human periodontal ligament fibroblasts. *Braz Dent J.* 2013;24(2):111-6.
144. M R. Toxicología fundamental. Métodos alternativos. Toxicidad in Vitro. Tercera Edición ed. Santos EDD, editor. Sevilla, España.: Enseps-Mercie Group; 2002. 303-5 p.
145. Mantellini MG, Botero TM, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nör JE. Adhesive resin induces apoptosis and cell-cycle arrest of pulp cells. *J Dent Res.* 2003;82(8):592-6.



146. Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J*. 2003;36(2):75-85.
147. Wataha JC. Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dent Mater*. 2012;28(1):23-40.
148. Freshney RI. *Culture of animal cells : a manual of basic technique*. 5th ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Liss; 2005. xxvi, 642 p., 24 p. of plates p.
149. Carrel A. On the permanent line of tissues outside of the organism. *J Exp Med*. 1912;15(5):516-28.
150. Sanford KK, Earle WR, Likely GD. The growth in vitro of single isolated tissue cells. *J Natl Cancer Inst*. 1948;9(3):229-46.
151. Grey DS. Properties of reflecting and reflecting-refracting microscope systems for ultraviolet microspectrophotometry. *Lab Invest*. 1952;1(1):71-136.
152. Levi-Montalcini R. Recent studies on the NGF-target cells interaction. *Differentiation*. 1979;13(1):51-3.
153. Eagle H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*. 1955; 122(3168):501-14.
154. Eagle H. The growth requirements of two mammalian cell lines in tissue culture. *Trans Assoc Am Physicians*. 1955;68:78-81.
155. Hernández E, Juárez E. Evolution of culture medium in the study of neural stem cells. *Rev Med UV*. 2009:16-23.
156. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961;25:585-621.
157. Ham RG. Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1965;53:288-93.
158. Augusti-Tocco G, Sato G. Establishment of functional clonal lines of neurons from mouse neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1969;64(1):311-5.
159. Kratz F, Elsadek B. Clinical impact of serum proteins on drug delivery. *J Control Release*. 2012;161(2):429-45.
160. Hayashi I, Sato GH. Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. *Nature*. 1976;259(5539):132-4.
161. Freshney R, Romijn H. Development and advantages of serum-free, chemically defined nutrient media for culturing of nerve *Biol Cell*. 1988;63:263-8.
162. Annunziata M, Aversa R, Apicella A, Annunziata A, Apicella D, Buonaiuto C, et al. In vitro biological response to a light-cured composite when used for cementation of composite inlays. *Dent Mater*. 2006;22(12):1081-5.



163. Cortes O, Garcia C, Perez L, Boj J, Alcaina A. Pulp cell cultures obtained with two different methods for in vitro cytotoxicity tests. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2006;7(2):96-9.
164. Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Mater*. 2002;18(4):318-23.
165. Lovschall H, Fejerskov O, Josephsen K. Age-related and site-specific changes in the pulpodentinal morphology of rat molars. *Arch Oral Biol*. 2002;47(5):361-7.
166. Lee CH, Moioli EK, Mao JJ. Fibroblastic differentiation of human mesenchymal stem cells using connective tissue growth factor. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2006;1:775-8.
167. Uhl A, Mills RW, Jandt KD. Photoinitiator dependent composite depth of cure and Knoop hardness with halogen and LED light curing units. *Biomaterials*. 2003;24(10):1787-95.
168. Schmalz G, Schweikl H, Esch J, Hiller KA. Evaluation of a dentin barrier test by cytotoxicity testing of various dental cements. *J Endod*. 1996;22(3):112-5.
169. Schweikl H, Schmalz G. Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *Eur J Oral Sci*. 1996;104(3):292-9.
170. MacDougall M, Simmons D, Dodds A, Knight C, Luan X, Zeichner-David M, et al. Cloning, characterization, and tissue expression pattern of mouse tuftelin cDNA. *J Dent Res*. 1998;77(12):1970-8.
171. MacDougall M, Nydegger J, Gu TT, Simmons D, Luan X, Cavender A, et al. Developmental regulation of dentin sialophosphoprotein during ameloblast differentiation: a potential enamel matrix nucleator. *Connect Tissue Res*. 1998;39(1-3):25-37; discussion 63-7.
172. Consiglio R, Rengo S, Liguoro D, Riccitiello F, Formisano S, Palumbo G, et al. Inhibition by glass-ionomer cements of protein synthesis by human gingival fibroblasts in continuous culture. *Arch Oral Biol*. 1998;43(1):65-71.
173. Aranha AM, Giro EM, Souza PP, Hebling J, de Souza Costa CA. Effect of curing regime on the cytotoxicity of resin-modified glass-ionomer lining cements applied to an odontoblast-cell line. *Dent Mater*. 2006;22(9):864-9.
174. de Souza Costa CA, Hebling J, Randall RC. Human pulp response to resin cements used to bond inlay restorations. *Dent Mater*. 2006;22(10):954-62.
175. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13625-30.
176. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(10):5807-12.
177. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004;364(9429):149-55.



178. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One*. 2006;1:e79.
179. Yamaza T, Ren G, Akiyama K, Chen C, Shi Y, Shi S. Mouse mandible contains distinctive mesenchymal stem cells. *J Dent Res*. 2011;90(3):317-24.
180. Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Le AD. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol*. 2009;183(12):7787-98.
181. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod*. 2008;34(8):962-9.
182. Seo BM, Sonoyama W, Yamaza T, Coppe C, Kikuri T, Akiyama K, et al. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Dis*. 2008;14(5):428-34.
183. Fu X, Jin L, Ma P, Fan Z, Wang S. Allogeneic stem cells from deciduous teeth in treatment for periodontitis in miniature swine. *J Periodontol*. 2014;85(6):845-51.
184. Zheng Y, Liu Y, Zhang CM, Zhang HY, Li WH, Shi S, et al. Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine. *J Dent Res*. 2009;88(3):249-54.
185. Zheng Y, Wang XY, Wang YM, Liu XY, Zhang CM, Hou BX, et al. Dentin regeneration using deciduous pulp stem/progenitor cells. *J Dent Res*. 2012;91(7):676-82.
186. Yang ZH, Zhang XJ, Dang NN, Ma ZF, Xu L, Wu JJ, et al. Apical tooth germ cell-conditioned medium enhances the differentiation of periodontal ligament stem cells into cementum/periodontal ligament-like tissues. *J Periodontal Res*. 2009;44(2):199-210.
187. Ripamonti U, Petit JC, Teare J. Cementogenesis and the induction of periodontal tissue regeneration by the osteogenic proteins of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Periodontal Res*. 2009;44(2):141-52.
188. McGuire MK, Scheyer ET, Nunn ME, Lavin PT. A pilot study to evaluate a tissue-engineered bilayered cell therapy as an alternative to tissue from the palate. *J Periodontol*. 2008;79(10):1847-56.
189. Morszeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol*. 2005;24(2):155-65.
190. Morszeck C, Moehl C, Götz W, Heredia A, Schäffer TE, Eckstein N, et al. In vitro differentiation of human dental follicle cells with dexamethasone and insulin. *Cell Biol Int*. 2005;29(7):567-75.
191. Morszeck C, Petersen J, Völlner F, Driemel O, Reichert T, Beck HC. Proteomic analysis of osteogenic differentiation of dental follicle precursor cells. *Electrophoresis*. 2009;30(7):1175-84.



192. Luan X, Ito Y, Dangaria S, Diekwisch TG. Dental follicle progenitor cell heterogeneity in the developing mouse periodontium. *Stem Cells Dev.* 2006;15(4):595-608.
193. Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE. Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J Dent Res.* 2008;87(8):767-71.
194. Morszeck C, Ernst W, Florian C, Reichert TE, Proff P, Bauer R, et al. Gene expression of nestin, collagen type I and type III in human dental follicle cells after cultivation in serum-free medium. *Oral Maxillofac Surg.* 2008;12(2):89-92.
195. Wu J, Jin F, Tang L, Yu J, Xu L, Yang Z, et al. Dentin non-collagenous proteins (dNCPs) can stimulate dental follicle cells to differentiate into cementoblast lineages. *Biol Cell.* 2008;100(5):291-302.
196. Tsuchiya S, Honda MJ, Shinohara Y, Saito M, Ueda M. Collagen type I matrix affects molecular and cellular behavior of purified porcine dental follicle cells. *Cell Tissue Res.* 2008;331(2):447-59.
197. Kémoun P, Laurencin-Dalicioux S, Rue J, Farges JC, Gennero I, Conte-Auriol F, et al. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res.* 2007;329(2):283-94.
198. Morszeck C. Gene expression of runx2, Osterix, c-fos, DLX-3, DLX-5, and MSX-2 in dental follicle cells during osteogenic differentiation in vitro. *Calcif Tissue Int.* 2006;78(2):98-102.
199. Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod.* 2008;34(6):645-51.
200. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* 2008;34(2):166-71.
201. Ge S, Mrozik KM, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell-like cells from healthy and inflamed gingival tissue: potential use for clinical therapy. *Regen Med.* 2012;7(6):819-32.
202. Mitrano TI, Grob MS, Carrión F, Nova-Lamperti E, Luz PA, Fierro FS, et al. Culture and characterization of mesenchymal stem cells from human gingival tissue. *J Periodontol.* 2010;81(6):917-25.
203. Xu X, Chen C, Akiyama K, Chai Y, Le AD, Wang Z, et al. Gingivae contain neural-crest- and mesoderm-derived mesenchymal stem cells. *J Dent Res.* 2013;92(9):825-32.
204. Zhang QZ, Nguyen AL, Yu WH, Le AD. Human oral mucosa and gingiva: a unique reservoir for mesenchymal stem cells. *J Dent Res.* 2012;91(11):1011-8.



205. Dokić J, Tomić S, Cerović S, Todorović V, Rudolf R, Colić M. Characterization and immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells from periapical lesions. *J Clin Periodontol.* 2012;39(9):807-16.
206. Dokić J, Tomić S, Marković M, Milosavljević P, Colić M. Mesenchymal stem cells from periapical lesions modulate differentiation and functional properties of monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2013;43(7):1862-72.
207. Davies LC, Locke M, Webb RD, Roberts JT, Langley M, Thomas DW, et al. A multipotent neural crest-derived progenitor cell population is resident within the oral mucosa lamina propria. *Stem Cells Dev.* 2010;19(6):819-30.
208. Davies LC, Lönnies H, Locke M, Sundberg B, Rosendahl K, Götherström C, et al. Oral mucosal progenitor cells are potently immunosuppressive in a dose-independent manner. *Stem Cells Dev.* 2012;21(9):1478-87.
209. Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res.* 2005;20(8):1394-402.
210. Laino G, Graziano A, d'Aquino R, Pirozzi G, Lanza V, Valiante S, et al. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *J Cell Physiol.* 2006;206(3):693-701.
211. Graziano A, d'Aquino R, Cusella-De Angelis MG, De Francesco F, Giordano A, Laino G, et al. Scaffold's surface geometry significantly affects human stem cell bone tissue engineering. *J Cell Physiol.* 2008;214(1):166-72.
212. Okamoto Y, Sonoyama W, Ono M, Akiyama K, Fujisawa T, Oshima M, et al. Simvastatin induces the odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro and in vivo. *J Endod.* 2009;35(3):367-72.
213. Carinci F, Papaccio G, Laino G, Palmieri A, Brunelli G, D'Aquino R, et al. Comparison between genetic portraits of osteoblasts derived from primary cultures and osteoblasts obtained from human pulpar stem cells. *J Craniofac Surg.* 2008;19(3):616-25; discussion 26-7.
214. Armiñán A, Gandía C, Bartual M, García-Verdugo JM, Lledó E, Mirabet V, et al. Cardiac differentiation is driven by NKX2.5 and GATA4 nuclear translocation in tissue-specific mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2009;18(6):907-18.
215. Ventura C, Cantoni S, Bianchi F, Lionetti V, Cavallini C, Scarlata I, et al. Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic Acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. *J Biol Chem.* 2007;282(19):14243-52.



216. Gandia C, Armiñan A, García-Verdugo JM, Lledó E, Ruiz A, Miñana MD, et al. Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells*. 2008;26(3):638-45.
217. Sasaki R, Aoki S, Yamato M, Uchiyama H, Wada K, Okano T, et al. Neurosphere generation from dental pulp of adult rat incisor. *Eur J Neurosci*. 2008;27(3):538-48.
218. Rosenbaum AJ, Grande DA, Dines JS. The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering: A global assessment. *Organogenesis*. 2008;4(1):23-7.
219. Abe S, Yamaguchi S, Watanabe A, Hamada K, Amagasa T. Hard tissue regeneration capacity of apical pulp derived cells (APDCs) from human tooth with immature apex. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;371(1):90-3.
220. Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer BJ, Boobis A, et al. Methods of in vitro toxicology. *Food Chem Toxicol*. 2002;40(2-3):193-236.
221. Ríos Hernández M, Cepero Cañas J. Citotoxicidad in vitro: sistema para la evaluación de biomateriales y equipos médicos implantables en Cuba. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2006;37(2).
222. ISO/FDIS -. Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Test for in vitro cytotoxicity.
223. Villegas A, Naranjo E, Gómez D. Tests of biocompatibility for dental materials. Review of the literatura. *Rev Estomat*. 2008;16(2):38-44.
224. Moretti Neto RT, Mello I, Moretti AB, Robazza CR, Pereira AA. In vivo qualitative analysis of the biocompatibility of different cyanoacrylate-based adhesives. *Braz Oral Res*. 2008;22(1):43-7.
225. Taira M, Toguchi MS, Hamada Y, Takahashi J, Itou R, Toyosawa S, et al. Studies on cytotoxic effect of nickel ions on three cultured fibroblasts. *J Mater Sci Mater Med*. 2001;12(5):373-6.
226. Oh SH, Choi SY, Choi SH, Lee YK, Kim KN. The influence of lithium fluoride on in vitro biocompatibility and bioactivity of calcium aluminate-pMMA composite cement. *J Mater Sci Mater Med*. 2004;15(1):25-33.
227. Makkawy HA, Koka S, Lavin MT, Ewoldsen NO. Cytotoxicity of root perforation repair materials. *J Endod*. 1998;24(7):477-9.
228. Kawahara H, Imai K, Kawahara D. Photo-pattern analysis and computation in the evaluation of the cytotoxicity of dental materials in vitro. *Int Endod J*. 1988;21(2):100-5.
229. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. London,: Methuen; 1959. xiv, 238 p. p.



230. Halder M, Balls M. Implementation of three Rs alternatives in regulatory testing: possibilities and obstacles--the view of the validator. *Dev Biol (Basel)*. 2002;111:199-206.
231. Spangberg L. Correlation *in vivo* and *in vitro* screening tests. *J Endodont*. 1978;4:296-9.
232. Nakamura M, Doi H, Yokoyama K, Kawahara H. Biocompatibility test of microfilled resins and composites for core use *in vitro*. *Dent Mater J*. 1984;3(2):280-7.
233. Cascone MG, Tricoli M, Cerrai P, Del Guerra RS. Cell cultures in the biocompatibility study of synthetic materials. *Cytotechnology*. 1993;11(Suppl 1):S137-9.
234. Pizzoferrato A, Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Arciola CR, Granchi D, et al. Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clin Mater*. 1994;15(3):173-90.
235. Cao T, Saw TY, Heng BC, Liu H, Yap AU, Ng ML. Comparison of different test models for the assessment of cytotoxicity of composite resins. *J Appl Toxicol*. 2005;25(2):101-8.
236. Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(3):333-55.
237. Lygre H. Prosthodontic biomaterials and adverse reactions: a critical review of the clinical and research literature. *Acta Odontol Scand*. 2002;60(1):1-9.
238. Schmalz G. The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. *Eur J Oral Sci*. 1998;106(2 Pt 2):696-706.
239. Cebe MA, Cebe F, Cengiz MF, Cetin AR, Arpag OF, Ozturk B. Elution of monomer from different bulk fill dental composite resins. *Dent Mater*. 2015;31(7):e141-9.
240. Durner J, Schrickel K, Watts DC, Ilie N. Determination of homologous distributions of bisEMA dimethacrylates in bulk-fill resin-composites by GC-MS. *Dent Mater*. 2015;31(4):473-80.
241. Łagocka R, Jakubowska K, Chlubek D, Buczkowska-Radlińska J. Elution study of unreacted TEGDMA from bulk-fill composite (SDR™ Dentsply) using HPLC. *Adv Med Sci*. 2015;60(2):191-8.
242. Alshali RZ, Salim NA, Sung R, Satterthwaite JD, Silikas N. Qualitative and quantitative characterization of monomers of uncured bulk-fill and conventional resin-composites using liquid chromatography/mass spectrometry. *Dent Mater*. 2015;31(6):711-20.
243. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater*. 2006;22(3):211-22.
244. Tseng WY, Huang CH, Chen RS, Lee MS, Chen YJ, Rueggeberg FA, et al. Monomer conversion and cytotoxicity of dental composites irradiated with different modes of photoactivated curing. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;83(1):85-90.
245. Yoon TH, Lee YK, Lim BS, Kim CW. Degree of polymerization of resin composites by different light sources. *J Oral Rehabil*. 2002;29(12):1165-73.



246. Franz A, König F, Lucas T, Watts DC, Schedle A. Cytotoxic effects of dental bonding substances as a function of degree of conversion. *Dent Mater.* 2009;25(2):232-9.
247. Bergmann P, Noack MJ, Roulet JF. Marginal adaptation with glass-ceramic inlays adhesively luted with glycerine gel. *Quintessence Int.* 1991;22(9):739-44.
248. Sigusch BW, Völpel A, Braun I, Uhl A, Jandt KD. Influence of different light curing units on the cytotoxicity of various dental composites. *Dent Mater.* 2007;23(11):1342-8.
249. Jaffer F, Finer Y, Santerre JP. Interactions between resin monomers and commercial composite resins with human saliva derived esterases. *Biomaterials.* 2002;23(7):1707-19.
250. Finer Y, Santerre JP. Biodegradation of a dental composite by esterases: dependence on enzyme concentration and specificity. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2003;14(8):837-49.
251. Becher R, Kopperud HM, Al RH, Samuelsen JT, Morisbak E, Dahlman HJ, et al. Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts. *Dent Mater.* 2006;22(7):630-40.
252. Reichl FX, Seiss M, Marquardt W, Kleinsasser N, Schweikl H, Kehe K, et al. Toxicity potentiation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with components of dental restorative materials on human oral cells. *Arch Toxicol.* 2008;82(1):21-8.
253. Moharamzadeh K, Van Noort R, Brook IM, Scutt AM. Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *Dent Mater.* 2007;23(1):40-4.
254. Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res.* 1991;70(11):1450-5.
255. Stanley H. Biological testing and reaction of dental materials. *Dental Materials Review.* 1977:205.
256. Northup SJ. Current problems associated with toxicity evaluation of medical device materials and future research needs. *Fundam Appl Toxicol.* 1989;13(2):196-204.
257. Mjör IA, Gordan VV. Failure, repair, refurbishing and longevity of restorations. *Oper Dent.* 2002;27(5):528-34.
258. de Waal H, Castellucci G. The importance of restorative margin placement to the biologic width and periodontal health. Part II. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1994;14(1):70-83.
259. Wataha JC, Hanks CT. Biological effects of palladium and risk of using palladium in dental casting alloys. *J Oral Rehabil.* 1996;23(5):309-20.
260. Mjör IA. In vivo versus in vitro. *J Am Dent Assoc.* 2004;135(10):1370, 2; author reply 2.
261. Rathbun MA, Craig RG, Hanks CT, Filisko FE. Cytotoxicity of a BIS-GMA dental composite before and after leaching in organic solvents. *J Biomed Mater Res.* 1991;25(4):443-57.



262. Koch P, Bahmer FA. Oral lesions and symptoms related to metals used in dental restorations: a clinical, allergological, and histologic study. *J Am Acad Dermatol.* 1999;41(3 Pt 1):422-30.
263. Zakrzewska JM, Thornhill M. Re: McCreary CE, McCarten BE. Clinical management of oral lichen planus. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1999; 37: 338-343. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2001;39(2):162.
264. Burgess J, Cakir D. Comparative properties of low-shrinkage composite resins. *Compend Contin Educ Dent.* 2010;31 Spec No 2:10-5.
265. Campos EA, Ardu S, Lefever D, Jassé FF, Bortolotto T, Krejci I. Marginal adaptation of class II cavities restored with bulk-fill composites. *J Dent.* 2014;42(5):575-81.
266. Scotti N, Comba A, Gambino A, Paolino DS, Alovisi M, Pasqualini D, et al. Microleakage at enamel and dentin margins with a bulk fills flowable resin. *Eur J Dent.* 2014;8(1):1-8.
267. Ilie N, Schöner C, Bücher K, Hickel R. An in-vitro assessment of the shear bond strength of bulk-fill resin composites to permanent and deciduous teeth. *J Dent.* 2014;42(7):850-5.
268. Ilie N, Hickel R. Investigations on a methacrylate-based flowable composite based on the SDR™ technology. *Dent Mater.* 2011;27(4):348-55.
269. Jang JH, Park SH, Hwang IN. Polymerization shrinkage and depth of cure of bulk-fill resin composites and highly filled flowable resin. *Oper Dent.* 2015;40(2):172-80.
270. Czasch P, Ilie N. In vitro comparison of mechanical properties and degree of cure of bulk fill composites. *Clin Oral Investig.* 2013;17(1):227-35.
271. Kim EH, Jung KH, Son SA, Hur B, Kwon YH, Park JK. Effect of resin thickness on the microhardness and optical properties of bulk-fill resin composites. *Restor Dent Endod.* 2015;40(2):128-35.
272. Rosatto CM, Bicalho AA, Veríssimo C, Bragança GF, Rodrigues MP, Tantbirojn D, et al. Mechanical properties, shrinkage stress, cuspal strain and fracture resistance of molars restored with bulk-fill composites and incremental filling technique. *J Dent.* 2015.
273. Giovannetti A, Goracci C, Vichi A, Chieffi N, Polimeni A, Ferrari M. Post retentive ability of a new resin composite with low stress behaviour. *J Dent.* 2012;40(4):322-8.
274. Lassila LV, Nagas E, Vallittu PK, Garoushi S. Translucency of flowable bulk-filling composites of various thicknesses. *Chin J Dent Res.* 2012;15(1):31-5.
275. Leprince JG, Palin WM, Vanacker J, Sabbagh J, Devaux J, Leloup G. Physico-mechanical characteristics of commercially available bulk-fill composites. *J Dent.* 2014;42(8):993-1000.



276. Alshali RZ, Salim NA, Satterthwaite JD, Silikas N. Long-term sorption and solubility of bulk-fill and conventional resin-composites in water and artificial saliva. *J Dent*. 2015.
277. Öznurhan F, Ünal M, Kapdan A, Öztürk C. Flexural and Microtensile Bond Strength of Bulk Fill Materials. *J Clin Pediatr Dent*. 2015;39(3):241-6.
278. Agarwal RS, Hiremath H, Agarwal J, Garg A. Evaluation of cervical marginal and internal adaptation using newer bulk fill composites: An in vitro study. *J Conserv Dent*. 2015;18(1):56-61.
279. Benetti AR, Havndrup-Pedersen C, Honoré D, Pedersen MK, Pallesen U. Bulk-fill resin composites: polymerization contraction, depth of cure, and gap formation. *Oper Dent*. 2015;40(2):190-200.
280. Tauböck TT, Feilzer AJ, Buchalla W, Kleverlaan CJ, Krejci I, Attin T. Effect of modulated photo-activation on polymerization shrinkage behavior of dental restorative resin composites. *Eur J Oral Sci*. 2014;122(4):293-302.
281. Furness A, Tadros MY, Looney SW, Rueggeberg FA. Effect of bulk/incremental fill on internal gap formation of bulk-fill composites. *J Dent*. 2014;42(4):439-49.
282. Juloski J, Carrabba M, Aragonese JM, Forner L, Vichi A, Ferrari M. Microleakage of Class II restorations and microtensile bond strength to dentin of low-shrinkage composites. *Am J Dent*. 2013;26(5):271-7.
283. Garcia D, Yaman P, Dennison J, Neiva G. Polymerization shrinkage and depth of cure of bulk fill flowable composite resins. *Oper Dent*. 2014;39(4):441-8.
284. Poggio C, Chiesa M, Scribante A, Mekler J, Colombo M. Microleakage in Class II composite restorations with margins below the CEJ: in vitro evaluation of different restorative techniques. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013;18(5):e793-8.
285. Van Ende A, De Munck J, Van Landuyt KL, Poitevin A, Peumans M, Van Meerbeek B. Bulk-filling of high C-factor posterior cavities: effect on adhesion to cavity-bottom dentin. *Dent Mater*. 2013;29(3):269-77.
286. Zaruba M, Wegehaupt FJ, Attin T. Comparison between different flow application techniques: SDR vs flowable composite. *J Adhes Dent*. 2013;15(2):115-21.
287. Rodríguez-Lozano FJ, Serrano-Belmonte I, Pérez Calvo JC, Coronado-Parra MT, Bernabeu-Esclapez A, Moraleda 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.
288. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res*. 1988;48(17):4827-33.



289. Tennant JR. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation*. 1964;2:685-94.
290. Avelar-Freitas BA, Almeida VG, Pinto MC, Mourão FA, Massensini AR, Martins-Filho OA, et al. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Braz J Med Biol Res*. 2014;47(4):307-15.
291. Kanemura Y, Mori H, Kobayashi S, Islam O, Kodama E, Yamamoto A, et al. Evaluation of in vitro proliferative activity of human fetal neural stem/progenitor cells using indirect measurements of viable cells based on cellular metabolic activity. *J Neurosci Res*. 2002;69(6):869-79.
292. Jabbar SA, Twentyman PR, Watson JV. The MTT assay underestimates the growth inhibitory effects of interferons. *Br J Cancer*. 1989;60(4):523-8.
293. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull*. 1996;19(11):1518-20.

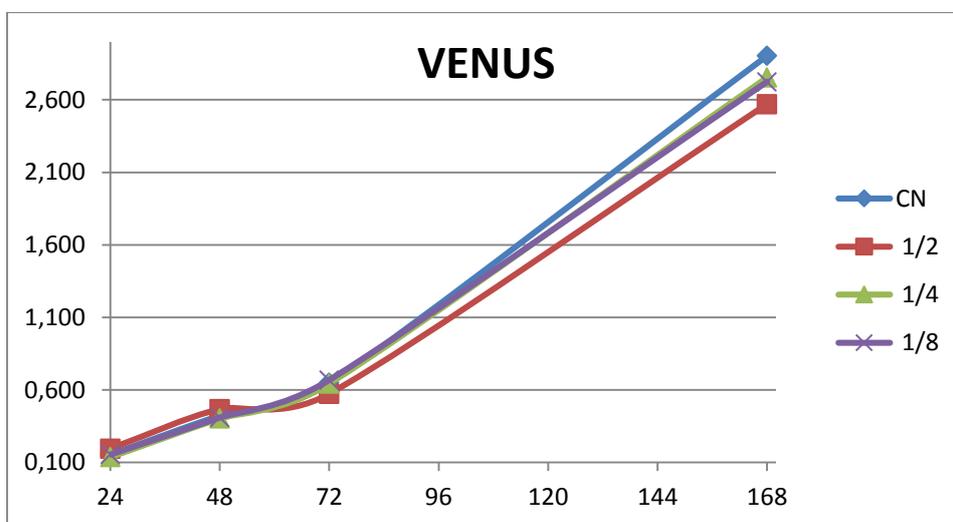
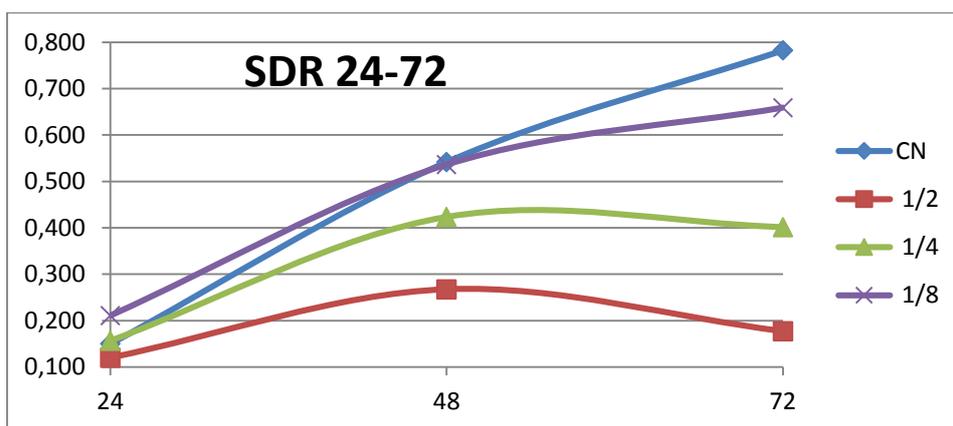
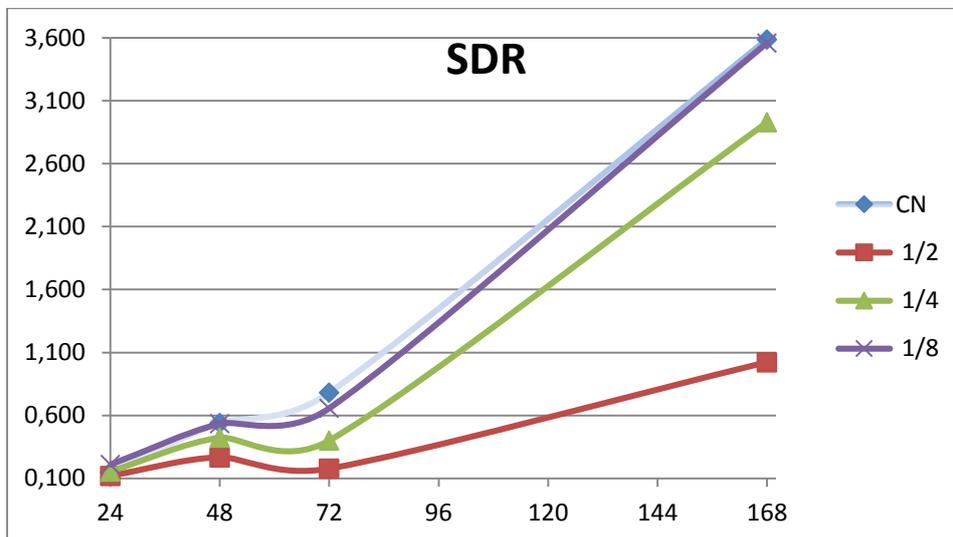


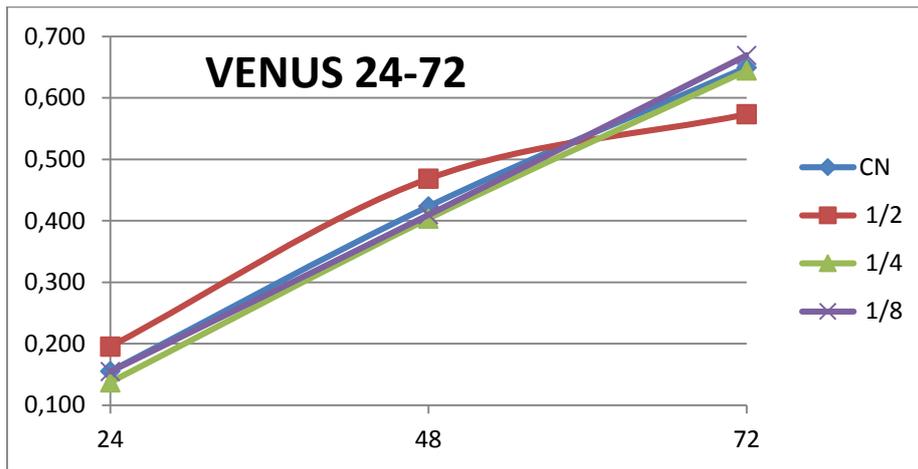
# ANEXOS



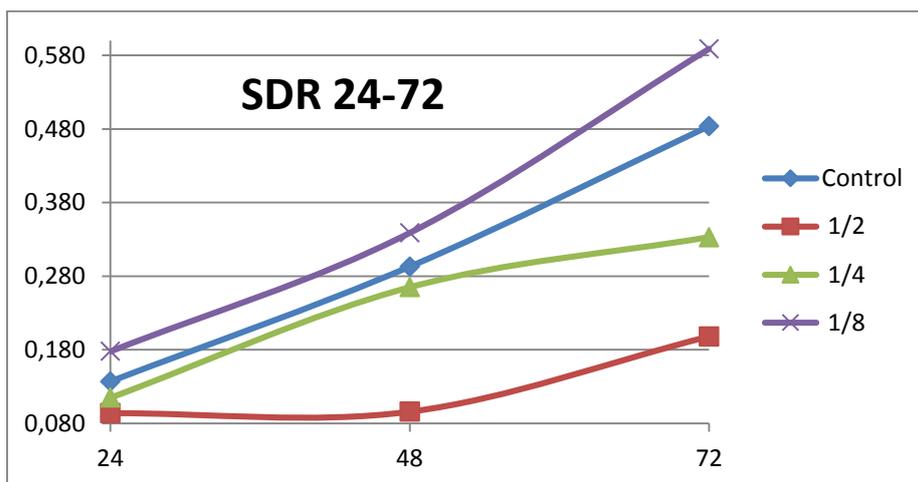
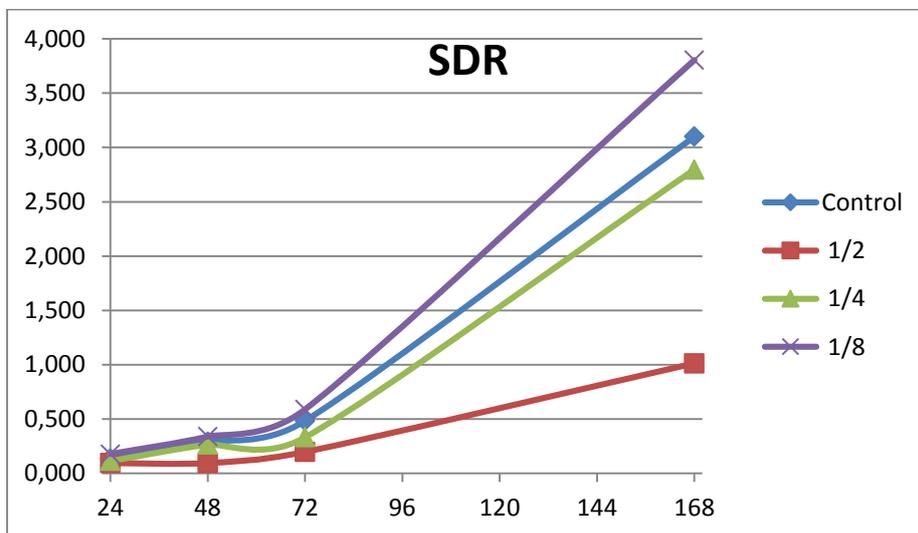
**ANEXO I: Tablas de absorbancia medidas con la aplicación Tecan i-control.**

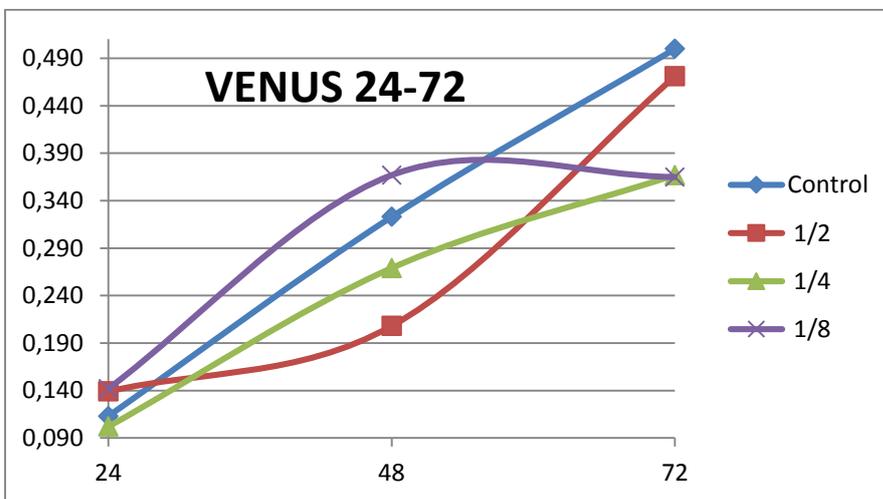
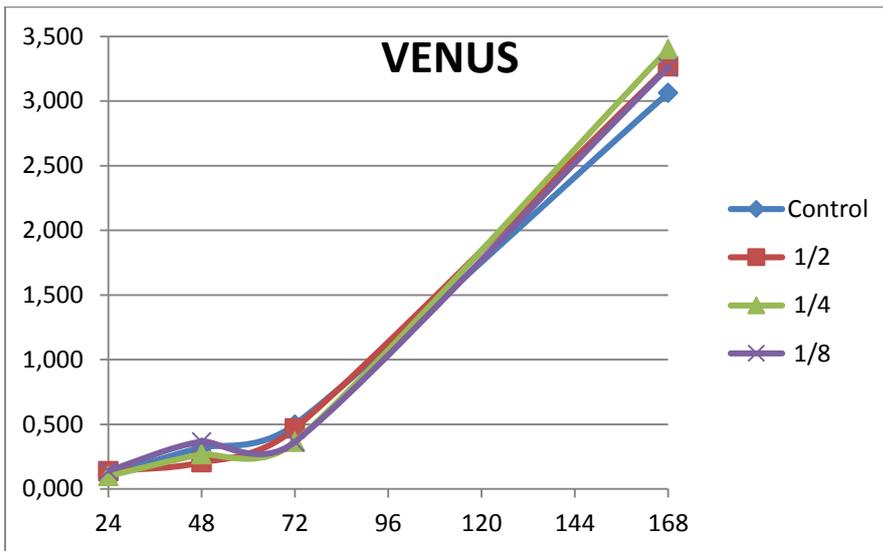
**A) Pulpa dental**





### B) Ligamento Periodontal







## ANEXO II: Relación de Figuras y Tablas.

### Figuras

Fig. 1. Ejemplos de incrustaciones de las culturas precolombinas.

Fig. 2 y 3. Ejemplos de odontología en el antiguo Egipto. Escáner del cráneo de una momia que muestra la obturación de cavidades con paño de lino embebido en sustancias calmantes (plantas medicinales).

Fig 4 y 5. Prótesis y relieve que muestra un tratamiento dental de la época romana.

Fig. 6. Grabado medieval que muestra el tratamiento dental de un barbero.

Fig. 7. Descripción del seno maxilar por Leonardo da Vinci.

Fig. 8 “*Le Chirurgien Dentiste*” de Pierre Fauchard 1798.

Fig. 9. Instrumental dental de Black. SXIX

Fig. 10. Desarrollo de las resinas compuestas de acuerdo a las partículas, sistemas de polimerización y tecnología adhesiva disponible. Adaptado de Bayne S.

Fig. 11. Componentes fundamentales de las resinas compuestas. Esquema general donde puede verse la matriz de resina, las partículas de relleno y el agente de conexión. Tomado de Rodriguez D.

Fig. 12. Estructura molecular de las resinas más usadas en composites.

Fig. 13. Agente de Conexión Silano. Modificado de Chain M, Baratieri L.

Fig. 14. Clasificación de las resinas compuestas de Lutz y Phillips.

Fig. 15. Esquema de la tecnología del nanorelleno. A) *Partículas nanométricas*, B) *Partículas nanoclusters*, C) *Partículas híbridas*. TPP: Tamaño promedio de las partículas.

Fig. 16. Disposición de las partículas en una resina de nanorelleno.

Fig. 17. Fotografía al MEB de una resina compuesta de partícula pequeña con nueve años de uso Tomado de Anusavice K.

Fig. 18. Adaptado de Moszner N, Salz.



Fig. 19. Parámetros que influyen la formación de estrés ocasionado por la contracción por polimerización.

Fig. 20 y 21. Jeringa para compules del sistema SDR y caja de compules.

Fig. 22. Jeringas de aplicación directa de Venus Bulkfill.

Fig. 23. Cámara de flujo laminar, necesaria para trabajar en condiciones de esterilidad.

Fig. 24 y 25. Cámara de Neubauer o hemocitómetro. Tras teñir con azul tripán, se diferencian las células muertas, con el fin de sembrar las células vivas.

Fig. 26. Cuadrícula de dimensiones conocidas, para facilitar el recuento celular.

Fig. 27, 28, 29 y 30. Preparación de las muestras de SDR y Venus Bulkfill, fotopolimerización con lámpara LED y aplicación del medio de cultivo.

Fig. 31. Placa de 96 pocillos con el cultivo celular con MTT.

Fig. 32. Placa de 96 pocillos tras aplicar DMSO, se observa el color morado característico de este ensayo. La placa se encuentra en el lector de placas.

Fig. 33, 34 y 35. DMSO utilizado como disolvente orgánico que destruye las membranas celulares, traslado de las células extraídas al laboratorio antes de la siembra, colorante azul tripán.

Fig.36. Distribución de las placas de 96 pocillos. Diluciones para SDR ligamento, SDR pulpa, Venus ligamento, Venus pulpa. CN (control). 0, equivale al medio sin tratar.

Fig.37 y 38. Observación de las muestras a microscopio. Contador de células automático, es una alternativa al conteo manual de la cámara de Neubauer.

Figura 39. Imagen donde observamos la gran confluencia celular a los 7 días de cultivo. A) DPSCs; B) PDLSCs.

Figura 40. Respuesta a los antígenos de membrana celular que expresaron las DPSCs y PDLSCs.

Fig. 41. Plot de Kruskal-Wallis para SDR Pulpa.

Fig.42. Plot de Kruskal-Wallis para SDR Ligamento Periodontal.

Fig. 43. Plot de Kruskal-Wallis para Venus Pulpa.

Fig.44. Plot de Kruskal-Wallis para Venus LPO.

Fig.45. Gráfico de perfil SDR Pulpa distribuido por tiempos.



Fig.46. Gráfico de perfil SDR LPO distribuido por tiempos.

Fig.47. Gráfico de perfil SDR LPO distribuido por tiempos.

Fig.48. Gráfico de perfil Venus pulpa distribuido por tiempos.

Fig.49. Gráfico de perfil Venus LPO distribuido por tiempos.

Fig. 50. Gráfico de perfil que muestra las cuatro condiciones distribuidas por tiempos hasta las 72 horas.

Fig. 51. Gráfico de perfil que muestra las cuatro condiciones distribuidas por tiempos hasta las 168 horas.

Fig.52. Análisis microscópico de la prueba de apoptosis celular. Las flechas blancas señalan núcleos apoptóticos. Escala 50  $\mu\text{m}$ .

Fig. 53 y 54. Expresión de los marcadores mesenquimales mediante inmunofluorescencia.

Fig. 55 Necesidad de realizar diferentes tipos de pruebas de biocompatibilidad. De Villegas (2008)

### **Tablas**

Tabla 1. Relación entre peso molecular y viscosidad de los monómeros. Modificado de Moszner N, Salz.

Tabla 2. Clasificación de las resinas compuestas.

Tabla 3. Principales tipos de resinas compuestas.

Tabla 4. Factores que afectan el grado de conversión de las resinas compuestas. Tomado de Hervas-Garcia A, et al 2006. (10)

Tabla 5. Componentes añadidos al medio de cultivo celular, denominado basal (MB).

Tabla 6. Anticuerpos usados para la evaluación de antígenos de superficie de las DPSCs

Tabla 7. Anticuerpos usados con fluorescencia.

Tabla 8. Efecto del tiempo en la proliferación celular. Kruskal Wallis- test.



\*\*\* $p < 0.0001$

Tabla 9. Efecto del tiempo en la proliferación celular. Kruskal Wallis- test.

\*\*\* $p < 0.0001$

Tabla 10. Efecto del tiempo en la proliferación celular. Kruskal Wallis- test.

\*\*\* $p < 0.0001$

Tabla 11. Efecto del tiempo en la proliferación celular. Kruskal Wallis- test.

\*\*\* $p < 0.0001$ .

Tabla 12. Pruebas de biocompatibilidad de materiales de uso odontológico.