



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Citocompatibilidad de Dos Nuevos
Cementos de Ionómero de Vidrio (GICS) en
Células Madre de Pulpa Dental

D Miguel Ramón Pecci Lloret

2017



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Facultad de Medicina

Departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y

Medicina Física

CITOCOMPATIBILIDAD DE DOS NUEVOS CEMENTOS DE

IONÓMERO DE VIDRIO (GICS) EN CÉLULAS MADRE DE

PULPA DENTAL

DIRECTORES:

Francisco Javier Rodríguez Lozano

Ricardo Elías Oñate Sánchez

D. Miguel Ramón Pecci Lloret

2017



D. Ricardo Elías Oñate Sánchez Profesor Titular de Universidad del Área de Estomatología en el Departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y Medicina Física AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Citocompatibilidad de dos nuevos cementos de ionómero de vidrio (GICS) en células madre de pulpa dental ", realizada por D. Miguel Ramón Pecci Lloret, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 28 de Abril de 2017

Fdo. Ricardo E. Oñate Sánchez



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Francisco Javier Rodríguez Lozano Profesor Contratado Doctor de Universidad del Área de Estomatología en el Departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y Medicina Física AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Citocompatibilidad de dos nuevos cementos de ionómero de vidrio (GICS) en células madre de pulpa dental ", realizada por D. Miguel Ramón Pecci Lloret, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 28 de Abril de 2017

Fdo. Francisco Javier Rodríguez Lozano

CITOCOMPATIBILIDAD DE DOS NUEVOS CEMENTOS DE IONÓMERO DE VIDRIO (GICS) EN CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL

Memoria presentada por
Miguel Ramón Pecci Lloret
para optar al Grado de
Doctor en Odontología por la
Universidad de Murcia.

Directores:

Dr. Francisco Javier Rodríguez Lozano

Dr. Ricardo Elías Oñate Sánchez

“Siempre puedes un poco más”

AM.P.P

Agradecimientos

Principalmente agradecer a todos los investigadores y técnicos del Laboratorio de Investigación Biosanitaria (LAIB) de la Universidad de Murcia, que siempre tienen un rato para ayudar, explicar y enseñarte desinteresadamente.

Una mención especial a María del Mar Collado González, quien me ha ayudado muchísimo en este trabajo, muchas gracias.

Gracias a mi director de tesis, Francisco Javier Rodríguez Lozano, por enseñarme esta parte de la odontología, el mundo universitario y el de la investigación que vive y transmite con pasión, sacando tiempo de donde no lo tiene. Con su ejemplo, ha conseguido motivarme y dirigir esta tesis, de verdad: muchas gracias.

Gracias a mi director de tesis, Ricardo Elías Oñate Sánchez, que con su paciencia, en cada revisión ha realizado aportaciones brillantes, dada su gran experiencia.

Gracias Mamá, eres la alegría y la sonrisa de mi vida, viendo tu esfuerzo y generosidad, día a día me has empujado para seguir adelante.

Gracias Papá, eres todo para mí, cada mañana cuando madrugaba para sacar tiempo para la tesis antes de ir a trabajar, tenía tu ánimo para ayudarme a seguir adelante.

Gracias Pilar por tu apoyo, viendo tu competitividad, la pasión por este trabajo y el esfuerzo en tu propia tesis, sé que pronto serás una Doctora excepcional.

Gracias Julia, por ser mi luz y mostrarme el camino a seguir, tengo claro que sin ti no lo hubiera conseguido.

Gracias a todos mis amigos y seres queridos, que de una manera u otra me han ayudado a sacar este trabajo adelante.

FINANCIACIÓN

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

ÍNDICE

1.	Justificación clínica.....	1
2.	Introducción.....	4
2.1.	Complejo Dentinopulpar.....	5
2.2.	Células Madre	7
2.2.1	Células madre derivadas de tejidos orofaciales.....	10
2.4.	Odontología mínimamente invasiva.....	14
2.5.	Materiales de restauración en base a Ionómero de vidrio.....	18
2.5.1.	Ionómeros de vidrio.....	18
2.5.2.	Cermets.....	19
2.5.3.	Ionómeros de vidrio modificados con resina.....	20
2.5.4.	Resinas compuestas modificadas con poliácidos (Compómeros).....	23
2.5.5.	Carbómeros de vidrio.....	24
2.5.6.	Giómeros.....	25
2.6.	Reacción de fraguado de los ionómeros de vidrio....	25
2.7.	Pruebas de citotoxicidad para materiales dentales...	27
3.	Objetivos.....	31

4.	Material y métodos.....	33
4.1.	Materiales.....	34
4.2.	Aislamiento celular.....	35
4.3.	Recuento y estimación de viabilidad celular.....	38
4.4.	Cultivo de células de pulpa dental de dientes permanentes (DPSCs).....	40
4.5.	Ensayo experimental.....	42
4.5.1.	Preparación de los extractos.....	42
4.5.2.	Análisis del Ph, osmolalidad y espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) de los diferentes extractos.....	42
4.5.3.	Ensayo de viabilidad celular MTT.....	43
4.5.4.	Análisis de la expresión de los marcadores de superficie de células madre mesenquimales sobre las DPSCs expuestas a los ionómeros de vidrio.....	45
4.5.5.	Ensayo de apoptosis celular.....	46
4.5.6.	Ensayo de migración celular.....	47
4.5.7.	Estudio microscópico de la morfología celular.....	48
4.5.8.	Adhesión celular y superficie de los ionómeros de vidrio.....	48
4.5.9.	Caracterización de los ionómeros de vidrio.....	49
4.6.	Análisis estadístico.....	50

5.	Resultados.....	52
5.1.	Análisis del Ph, osmolalidad y espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) de los diferentes extractos.....	52
5.2.	Aislamiento y cultivo celular.....	53
5.3.	Caracterización fenotípica de la línea celular.....	54
5.4.	Ensayo de proliferación celular MTT.....	55
5.5.	Análisis de fenotipo.....	57
5.6.	Análisis apoptosis/necrosis.....	59
5.7.	Ensayo de migración celular.....	60
5.8.	Análisis de la morfología celular.....	62
5.9.	Ensayo de la adhesión celular.....	62
5.10.	Caracterización de la superficie de los materiales Equia® y Voco® mediante espectrometría dispersiva de rayos X (EDX).....	63
6.	Discusión.....	68
6.1.	Sobre los materiales.....	69
6.2.	Sobre la metodología.....	71
6.3.	Sobre los resultados.....	74
6.3.1	Relacionado con el aislamiento y la caracterización celular.....	74
6.3.2	Relacionado con la viabilidad celular y la citotoxicidad.....	76

6.3.3	Relacionado con la migración celular.....	78
6.3.4	Relacionado con la adhesión celular.....	79
6.3.5	Relacionado con la morfología celular.....	80
6.3.6	Relacionado con la caracterización de la superficie de los materiales de los extractos.....	81
7.	Conclusiones.....	84
8.	Bibliografía.....	86
9.	Anexos.....	99
11.	Índice de figuras.....	103
12.	Índice de tablas y gráficas.....	105

JUSTIFICACIÓN CLÍNICA

1. JUSTIFICACIÓN CLÍNICA

La odontología en las últimas décadas ha sufrido una evolución muy importante gracias a la aparición de nuevas tecnologías y materiales que ayudan a conseguir con mayor probabilidad el éxito de nuestros tratamientos.

Una de las filosofías de trabajo que más se está desarrollando es la de la “Odontología Mínimamente Invasiva”, entendiendo por ésta el mínimo procedimiento necesario mediante el cual conseguiremos el mayor beneficio clínico posible para nuestro paciente, respetando al máximo los tejidos y su capacidad de respuesta ante diversos estímulos, huyendo del famoso dicho americano “drill and bill”, tratamientos más invasivos, con resultados discutibles a largo plazo y que solo buscan el rendimiento económico.

La enfermedad infecciosa más extendida en el mundo según la OMS, es la caries, uno de los problemas habituales que surgen en la práctica clínica diaria. Las caries de gran tamaño, se extienden hasta capas muy profundas de la dentina en las cercanías de la pulpa. Ante esta circunstancia, lo más habitual hace años era la remoción de la caries, eliminando toda la dentina infectada y afectada, provocando en muchas ocasiones exposiciones pulpares, que obligaban al clínico a realizar protecciones pulpares con un pronóstico incierto o tener que realizar la endodoncia de ese diente, perdiendo la vitalidad.

En esa búsqueda de ser lo menos invasivo posible, uno de los materiales que más se usa son los ionómeros de vidrio. Debido a sus excelentes propiedades y sobre todo a su capacidad de remineralizar dentina afectada y liberar flúor, los ionómeros de vidrio son materiales de elección en grandes caries, evitando de esta manera que tengamos que realizar una extensiva remoción de dentina y librándonos de afectaciones pulpares que provoquen la pérdida de vitalidad de esos dientes.

Estos materiales de restauración se sitúan en posiciones muy cercanas a la pulpa dental. Con la reciente introducción de nuevos ionómeros de vidrio en el mercado, con mejores propiedades mecánicas y de adhesión, y ante la poca evidencia de estudios de biocompatibilidad de estos materiales, resultan indispensables nuevos estudios de calidad que nos permitan asegurar que estos materiales no son tóxicos para la pulpa dental.

La existencia de soluciones menos invasivas que las tradicionalmente usadas, sugiere la necesidad de plantearnos nuevas alternativas terapéuticas y de prevención para las diferentes patologías dentales. Se hace cada vez más imprescindible que los profesionales de la salud, integrando no solo a todo el equipo de la salud bucodental sino también a pediatras, médicos de familia, matronas, e incluso también a otras personas como los profesores en las escuelas, los padres... estén concienciados de la importancia que tiene la prevención de la salud, y de la salud oral en particular, haciendo principal hincapié en la dieta y la higiene.

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. COMPLEJO DENTINOPULPAR

La pulpa dental y la dentina forman un complejo estructural, una unidad, ya que las prolongaciones de los odontoblastos penetran dentro de los túbulos de la dentina. Además ambos tejidos se complementan, ya que la dentina protege la pulpa y la pulpa mantiene la vitalidad de la dentina. Igualmente, la pulpa y la dentina comparten un mismo origen embriológico ya que derivan del ectomesénquima que forma la papila del germen dentario.(1)

La dentina al incluir en su interior prolongaciones de los odontoblastos, por la presencia de líquido dentinario que la nutre, es considerada un tejido vivo. Está compuesta por una matriz dentinaria parcialmente mineralizada en la que en medio se encuentran los túbulos. Alrededor de los túbulos se encuentra la llamada dentina peritubular, y el número de túbulos va variando según la profundidad, pues cuanto más nos aproximamos a la pulpa mayor es el número de túbulos que hay, pudiendo llegar hasta los 65.000 por mm² (1). La luz de los túbulos también varía, y llega a su tamaño más amplio al estar muy próximo a la pulpa, siendo tres veces más ancha que en la zona de la superficie, por lo que la permeabilidad es mucho mayor en profundidad. La dentina continúa creciendo durante toda la vida lo que hace que el grosor de la dentina peritubular vaya aumentando, y ocasiona una reducción del diámetro de los túbulos. La aposición de dentina es un mecanismo protector, para proteger a la pulpa de lesiones, siendo la respuesta frente a estímulos crónicos, como atricción lenta, microfiltraciones, caries de avance lento, irritación por materiales... Las lesiones traumáticas, el uso de materiales que irriten la pulpa, los cambios térmicos, en definitiva, agresiones agudas a la pulpa, producen una respuesta defensiva distinta. (2)

Entre los túbulos existe una matriz dentinaria compuestas por fibras colágenas, hidroxiapatita, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, proteínas osteogénicas, factores de crecimiento o TGF, heparina, condroitin sulfato, etc. La heterogeneidad estructural

de este tejido y la presencia de fluido dentinario configura un sustrato peculiar y hace que esta zona sea muy importante en los mecanismos de adhesión. (3)

La pulpa dentaria es un tejido conectivo laxo, ampliamente vascularizado e innervado, altamente diferenciado y con capacidad de reparación. Contiene un 75% de agua y un 25% de materia orgánica. La capa exterior de la pulpa está en contacto con la capa más profunda de la dentina, estando formada por los cuerpos celulares de los odontoblastos. Justo debajo aparece la zona acelular, con gran número de terminaciones nerviosas sensitivas y capilares sanguíneos. El tejido pulpar está formado en su mayor parte por células mesenquimales, células defensivas y fibroblastos, sustancia fundamental, colágeno, capilares, arteriolas y vénulas, vasos linfáticos, troncos nerviosos sensitivos y terminaciones sensitivas libres. Todos estos tejidos son necesarios para que los odontoblastos formen la dentina en su fase inicial y la dentina reaccional.

La pulpa dental presenta diferentes zonas topográficas estructuradas en una disposición descrita como: zona odontoblástica, zona acelular, zona rica en células y la zona de la pulpa propiamente dicha.

- Zona odontoblástica: formada por odontoblastos que se disponen pegados a la predentina, formando una sola capa en la periferia de la pulpa. Pertenecen tanto a la pulpa como a la dentina, ya que sus prolongaciones penetran en los túbulos dentinarios.
- Zona acelular: está ocupada en parte por el plexo de Rashkow, caracterizado por la presencia de filetes nerviosos que ingresan en la pulpa por el foramen apical, algunos de ellos pueden llegar a la predentina o dentina(4)(1).
- Zona rica en células: es una capa rica en células mesenquimales indiferenciadas junto a la zona acelular. Estas células son las encargadas de la respuesta reparativa del tejido pulpar(5). Constituyen una población que tiene capacidad de diferenciarse en nuevos odontoblastos productores de dentina o en fibroblastos productores de

matriz pulpar.

- Zona de la pulpa propiamente dicha: En esta zona están presentes los fibroblastos. Forman y mantienen la matriz de la pulpa, secretan los precursores de las fibras colágenas, reticulares y elásticas y la sustancia fundamental de la pulpa. También tienen la capacidad de degradar el colágeno. (6)

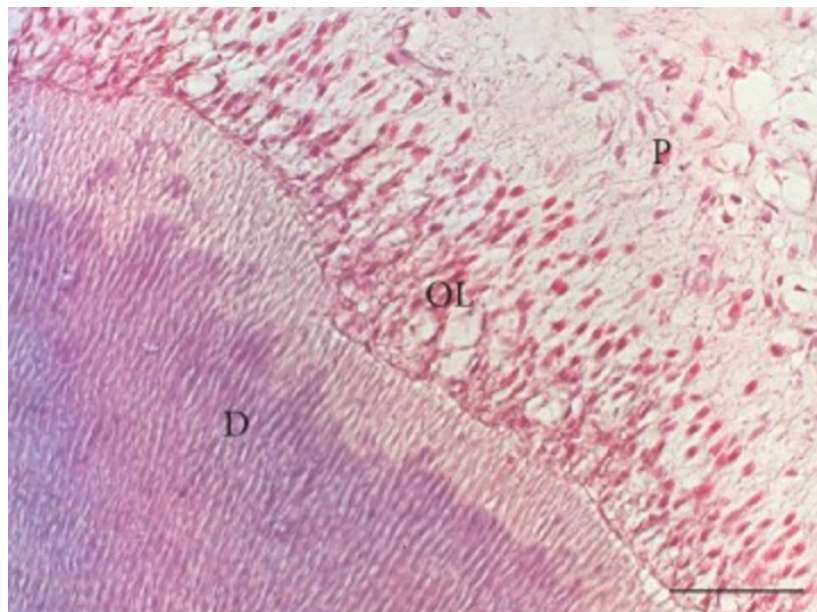


Fig. 4: Dentina y pulpa, tinción hematoxilina-eosina(7)

2.2. CELULAS MADRE

Las células madre (CM) o *stem cells* son células indiferenciadas que tiene capacidad de ser clonogénicas, autorenovarse y poder diferenciarse en distintas estirpes celulares. También tienen la cualidad de en determinados ambientes de poder regenerar tejidos.

A día de hoy se han descrito varios tipos de CM basándose en:

- En función de su origen (embrionario o adulto)
- Su grado de diferenciación (potencialidad, plasticidad)
- Tejido en que se encuentran, células madre fetales, células madre adultas, células madre embrionarias, células madre embrionarias germinales y células embrionarias de carcinoma.

Además las CM se pueden clasificar en:

- *Unipotentes*, sólo pueden generar un tipo celular, como las células madre germinales. (8,9)
- *Oligopotentes*, cuando pueden diferenciarse a un subconjunto más reducido.
- *Multipotentes* pueden diferenciarse a un subconjunto de tipos celulares, distintos tipos de células pero de un mismo linaje celular.
- *Pluripotentes* pueden diferenciarse en cualquier estirpe celular del embrión, endodermo, mesodermo o ectodermo excepto extraembrionaria. (10)
- *Totipotentes*: son capaces a partir de una célula individual, dividirse y producir diferentes células y tipos de tejido de un humano además de los tejidos extraembrionarios, p.e. el cigoto es totipotente. (11)

Modelo de autorenovación y capacidad de diferenciarse de células madre.

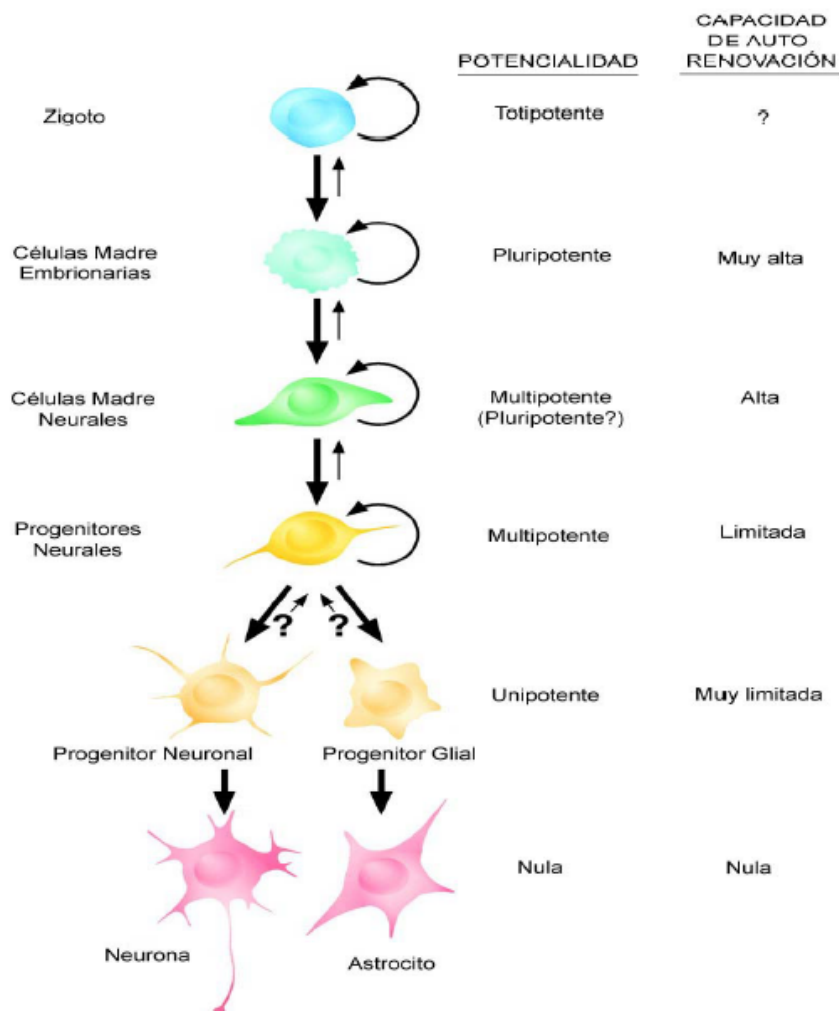


Fig. 5: Modelo de autorenovación y capacidad de diferenciarse de células madre.

El destino de una CM depende fundamentalmente de factores epigenéticos

2.3. CÉLULAS MADRE DERIVADAS DE TEJIDOS OROFACIALES

En el año 2000 el equipo de Songtao Shi, consiguió aislar células madre de la pulpa dental (DPSCs: Dental pulp stem cells). Esto fue una revolución, sobre todo para el sector dental, abriendo un abanico de posibilidades para la investigación. Fueron extraídas de terceros molares humanos y demostraron que tenían capacidad clonogénica. También consiguieron diferenciarlas hacia odontoblastos, y formar el complejo dentinopulpar cuando fueron implantadas subcutáneamente en ratas inmunocomprometidas. Uno de los datos más llamativos fue que demostraron que estas células presentaban un mayor porcentaje de proliferación que las células madre mesenquimales de médula ósea. Estas son las células que hemos usado en nuestro estudio.(12)

Además de las DPSCs, se han conseguido aislar otros tipos de células madre del área orofacial, como las células madre de la pulpa a partir de dientes deciduos (SHED: Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth) con una plasticidad mayor que las de pulpa de diente permanente, debido a estar teóricamente más indiferenciada. Las SHED poseen capacidad para diferenciarse al linaje osteoblástico, adiposo y neural. Cuando se trasplantan en ratones inmunodeprimidos son capaces de sobrevivir y expresar marcadores neurales en el cerebro del ratón, regenerar dentina o formar hueso. Sin embargo, no son capaces de regenerar el complejo dentinopulpar completo como las DPSCs en experimentos in vivo. (13)

En el ligamento periodontal, tejido circundante a la raíz, que se encuentra entre el hueso alveolar y el cemento radicular, existen unas células mesenquimales indiferenciadas (PDLSCs: Periodontal Ligament Stem Cells) que fueron aisladas en 2004 con las características de capacidad de regenerar el tejido periodontal, tener una proliferación alta y ser clonogénicas.

Las PDLSCs tienen capacidad para diferenciarse a cementoblastos, osteoblastos, a células formadoras de colágenos y a adipocitos. Estas células tienen capacidad osteogénica pero en menor medida que otros tejidos homólogos. En cambio la capacidad adipogénica es similar. En vivo son capaces de diferenciarse a cementoblastos funcionales y producir cemento en experimentos con ratones inmunodeprimidos. (14)

Las PDLSCs contribuyen a la reparación del tejido periodontal cuando son trasplantadas en defectos periodontales, en el área molar de la mandíbula de ratas inmunocomprometidas, también se ha comprobado que regeneran defectos de furca en perros cuando se aplican en scaffolds de colágeno. Estas células se integran en la mandíbula para reparar el defecto periodontal y conectan las superficies del hueso alveolar y del diente. Este hecho es de gran relevancia, ya que abre la puerta a la regeneración del tejido destruido por la enfermedad periodontal, una de las causas de pérdida de piezas dentales más importante. (15)

Otra fuente diferente de células madre del diente es el folículo dental (DFSCs: Dental Follicle Stem Cells), saco de tejido conectivo que envuelve al diente en desarrollo que aún no ha erupcionado. Este folículo es el que en un futuro formará al ligamento periodontal, dando lugar a los fibroblastos del ligamento que rodea el diente, con capacidad de diferenciarse a odontoblastos, cementoblastos y osteoblastos. “In vivo” son capaces de expresar la proteína osteocalcina y sialoproteína ósea tras un mes de trasplante en ratón inmunodeprimido, pero no de formar hueso o cemento. Estudios de los últimos años avalan su diferenciación a osteoblastos/cementoblastos, adipocitos y neuronas “in vitro”, aunque su capacidad condrogénica está en duda. Tiene la gran ventaja de una crioconservación durante muchos años. (16–18)

En los últimos años se ha demostrado que también hay células madre en la papila apical (SCAP: Root Apical Papilla Stem Cells), tejido derivado del ectomesénquima, que inducido por la lámina dental, es el responsable del desarrollo de las raíces en el proceso de formación del diente. Estas células madre tienen

potencial dentinogénico, adipogénico, y neurogénico cuando son tratadas con los diferentes estímulos. Al comparar las propiedades de las células madre de la papila apical con las de ligamento, se observó que mostraban mayor tasa de proliferación, mayor número de células STRO-1 positivas, es decir, mayor capacidad clonogénica y mayor capacidad de regeneración tisular. Hay que destacar también que las células madre de la papila apical expresan un nivel más elevado de supervivencia, pues tienen una tasa de apoptosis menor y son positivas para telomerasa (19,20).

El tejido gingival o la encía presenta también células mesenquimales de fácil acceso. Estas células denominadas “gingival mesenchymal stem cells (GMSCs)” son clonogénicas, tienen capacidad de auto-renovación, y pueden diferenciarse en adipocitos, osteoblastos, condrocitos, células endoteliales y células neurales. Además diferentes estudios reportan que derivan en un 90% de células procedentes de cresta neural y en un 10% del mesodermo(21).

Yamaza y cols., realizaron un estudio que compararon células mesenquimales de médula ósea de mandíbula o “OMSCs” con células mesenquimales de médula ósea de huesos largos (BMMSCs)(22). Estas células expresaron los siguientes marcadores: CD73, CD105, CD106, SSEA-4, y Oct-4; mientras que no expresaron los marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45. En cultivo OMSCs presentaron una mayor tasa de proliferación y de unidades formadoras de colonias que BMMSCs. En presencia de un medio inductor, estas células fueron capaces de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condrocitos. “In vivo” son capaces de formar hueso en combinación de un scaffold de hidroxiapatita y fosfato tricálcico en ratones inmunodeprimidos (22).

Recientemente se han aislado células madre mesenquimales (CMM) de tejido inflamatorio periapical procedente de infecciones odontógenas. Estas células fueron positivas para los marcadores de CMM STRO-1, CD90 y CD146. Tras el segundo pase, las células mostraron niveles bajos de STRO-1 y CD146 y moderados de CD90, CD73 y CD105. Además, mostraron capacidad osteogénica pero no adipogénica. In vivo, estas células formaron tejido mineralizado en ratas inmunocomprometidas (23,24)

Otra población de células mesenquimales se encuentra en la lámina propia de la mucosa oral denominadas OMLP-PCs. Estas células expresaron marcadores Oct4, Sox2, Nanog, CD44, CD90, CD105, y CD166, y no expresaron CD34 y CD45. Esta nueva población de células madre mostraron capacidad de diferenciación en células mesenquimales (condrocitos, osteoblastos y adipocitos), células del endodermo y neurales (neuronas y células de Schwann) (25,26).

Células madre orofaciales y su origen.

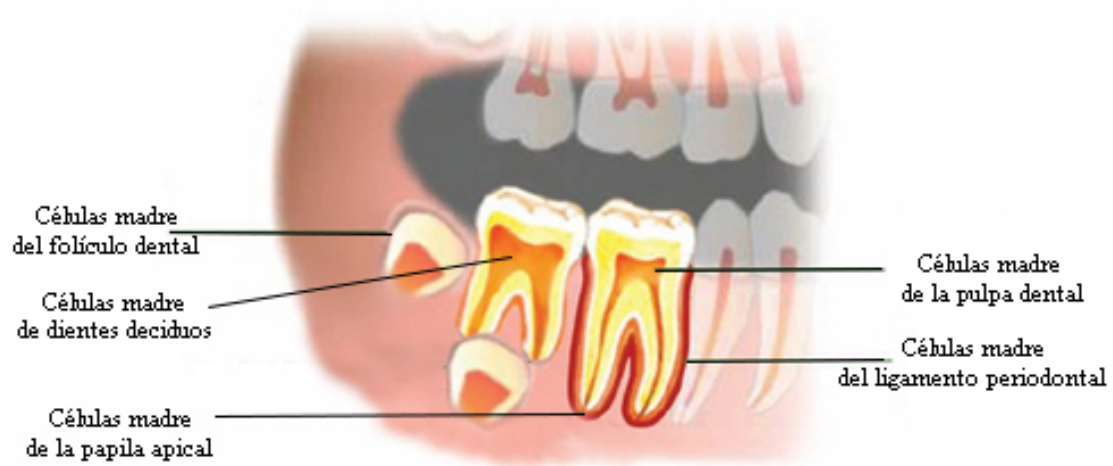


Fig. 6: Células madre orofaciales y su origen

2.4. ODONTOLOGÍA MINIMAMENTE INVASIVA.

En el siglo XX Black promulgó que la restauración de las piezas afectadas no constituía la solución al problema que planteaba la caries dental, que la obturación o restauración de los dientes no solucionaba su problemática. La evolución del tratamiento de la caries ha provocado la sustitución del concepto original de Black de “extensión por prevención” por el de “mínima intervención”. (27)

En los últimos años ha aparecido el concepto de odontología mínimamente invasiva, que se basa en un respeto por el tejido original, esta filosofía de trabajo incluye el diagnóstico, la evaluación del riesgo, el tratamiento preventivo y la eliminación mínima de tejido para la restauración(28). Este concepto conlleva una serie de premisas(29):

- Asesoramiento al paciente del riesgo de enfermedad, medidas de prevención y formas de detección precoz si apareciera la lesión.
- Uso de mecanismos de remineralización y de infiltración dentinaria.
- Materiales y equipamiento que permita realizar un tratamiento conservador.

El proceso de remineralización en el diente es el proceso natural por el cual se produce la reparación de las lesiones producidas por agentes externos. Este proceso se conoce desde hace varias décadas, pero solo en los últimos años se usa como opción terapéutica en el control de la caries y consiste en revertir sus estados iniciales, como son las manchas blancas(30).

Hasta ahora la aplicación de flúor ha sido la estrategia de remineralización por excelencia, aunque se ha visto que tiene ciertas limitaciones. Entre las nuevas estrategias en busca del proceso para reparar el diente aparecen:

- Combinar agentes remineralizantes con flúor .
- Combinar los agentes remineralizantes con una dosis menor de flúor para evitar la fluorosis en niños
- Usar productos remineralizantes dentarios como agentes independientes, que son capaces de liberar calcio y fosfato a la cavidad oral. Entre estos productos que se están investigando aparecen: Xilitol, fosfosilicato de calcio y sodio (CSP), fosfato de calcio amorfo (CPP-ACP), carbonato de calcio, fosfato de calcio dihidratado, lactato de calcio, glicerofosfato de calcio.(29)

Uno de los materiales que mejores resultados esta dando es el Recaldent® (CPP-ACP) Melbourne, Australia. Cuando el producto se encuentra en la superficie del diente y hay acidez, interacciona con los iones de hidrógeno y forma fosfato de calcio hidrogenado que penetra en el diente y mediante reacción con el agua produce remineralización del esmalte(31)(32).

Cuando ya hay cavitación del esmalte normalmente se realizan tratamientos más invasivos. Si hay existencia de caries interproximales por ejemplo, nos obliga a la remoción de tejido sano para poder acceder hasta la lesión. Para este tipo de lesiones se ha desarrollado un procedimiento que se denomina infiltración. Con este procedimiento lo que buscamos es reemplazar el tejido perdido por la desmineralización con resinas de baja viscosidad(30)(33).

Uno de los productos estrella para la infiltración es ICON (DMG AMERICA), es una resina fotopolimerizable de baja viscosidad(34), esta resina bloquea los canales de

difusión, impidiendo que los iones de hidrógeno penetren en el esmalte, de esta manera el proceso de avance de caries quedará detenido.

Esta técnica de infiltración sería efectiva en los estadíos E1, E2 y D1 de la clasificación de Méjare(35) y así lo aseguran diversos estudios de los que realizan la infiltración de esta resina en procesos iniciales de caries(33)(36)(37),

FASE	EXTENSIÓN
E1	Radiolucidez confinada a la mitad externa del esmalte.
E2	Radiolucidez confinada a la mitad interna del esmalte, incluyendo lesiones hasta la unión amelodentinaria, pero excluyendo aquéllas que van más allá de esta.
D1	Radiolucidez en la dentina, rompiendo la unión amelodentinaria pero no extendiéndose más allá del tercio externo de la dentina.
D2	Radiolucidez extendida hasta el tercio medio de la dentina.
D3	Radiolucidez extendida hasta el tercio interno de la dentina.

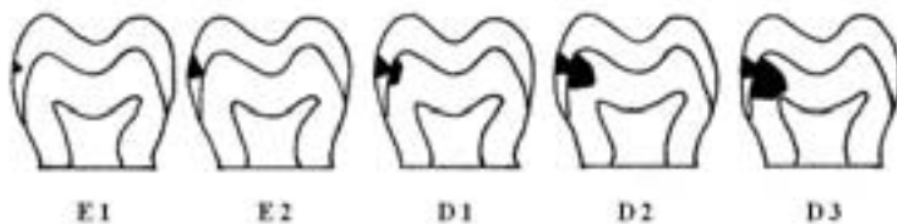


Fig.1 Clasificación de Méjare de la caries dental.

Otro tratamiento odontológico preventivo y restaurador basado en la odontología mínimamente invasiva es el tratamiento restaurador atraumático (ART),

cuya filosofía es el máximo respeto por los tejidos y la capacidad de una respuesta biológica ante los estímulos sobre la pulpa y la dentina(38).

Este procedimiento inicialmente se recomendó para países en desarrollo donde las condiciones técnicas, económicas y operativas no eran favorables(39). Sin embargo, se ha demostrado que es un tratamiento de alta calidad y adecuado para todo tipo de pacientes, independientemente de la situación económica o social.

El tratamiento se lleva a cabo tal como describió Frencken y cols. (40). Mediante aislamiento relativo se realiza la limpieza de la caries con instrumental manual, solo se retira la dentina blanda y completamente desmineralizada con cucharillas manuales. Se graba con ácido poliacrílico y luego se lava con agua y se seca con algodones. A continuación se mezcla el ionómero de vidrio y se aplica con una espátula y se presiona para compactarlo con el dedo con vaselina.

Los estudios a largo plazo comparando esta técnica con las técnicas convencionales muestran que no hay diferencias significativas entre este procedimiento mínimamente invasivo y el procedimiento tradicional(41).

2.5. MATERIALES DE RESTAURACIÓN EN BASE A IONÓMEROS DE VIDRIO

2.5.1. IONÓMEROS DE VIDRIO.

Ionómero de vidrio: “Ionómero” etimológicamente proviene del griego ION (partícula con carga) y MEROS (miembro de una clase específica) y VIDRIO proviene del latín VITRIUM.

El término “Ionómero de vidrio” fue el que se aplicó desde su descubrimiento, pero no es estrictamente correcto, ya que según la Organización Internacional de Estandarización ISO, el nombre apropiado debería ser “polialquenoato de vidrio”, aun así, el termino aceptado y más usado en la profesión sigue siendo Ionómero de vidrio. (42)

Mc Lean, Nicholson y Wilson definieron el cemento de vidrio como “Un cemento que consiste en un cristal básico y un polímero ácido que polimeriza mediante una reacción ácido-base entre esos componentes”(43)

La aparición de los cementos de Ionómero fue un hallazgo casual que ocurrió a principio de los años 60 cuando Wilson y Kent en un laboratorio del gobierno en Londres, intentaban mejorar las propiedades de los cementos de silicato que era el material de restauración de la época, hicieron una serie de 15 estudios en los que analizaron los diferentes componentes de los ionómeros.(44)(45)

En 1965 Wilson probó cementos experimentales mezclando polvo de cemento de silicato (vidrio aluminio-silicato) con diferentes ácidos: tartárico, tánico, pirúvico, etc., a diferentes concentraciones. Los cementos parecían que obtenían resultados prometedores pero no eran estables en agua y tardaban en fraguar hasta 24 horas.(46)

En 1969 consiguieron una mezcla con una concentración de ácido poliacrílico entre el 40 y 50% con cristales de aluminosilicatos que tenía numerosas propiedades, como adhesión a tejidos dentarios y a substratos metálicos, propiedades estéticas aceptables, biocompatibilidad y propiedades mecánicas estables en el tiempo. A esta mezcla la llamaron ASPA I (alúmina, silicato, poliacrilato) y es la considerada como el germen de la evolución de los ionómeros de vidrio.

Mc Lean y Wilson fueron desarrollando y divulgando este material que dio lugar a ASPA II, III y finalmente ASPA IV, haciendo modificaciones que conseguían mayor estabilidad, y mejores cualidades mecánicas y estéticas.(47)(48)

2.5.2. CERMETS

En 1985 Mc Lean y Gasser crean los cermets, que son materiales compuestos de elementos cerámicos y metálicos, uniendo plata con el polvo del Ionómero. Se realizaba una mezcla íntima de partículas de plata de 3-4µm con el polvo del Ionómero mediante sintetización. La composición del polvo era: 40% plata pura, óxido de titanio 5% y partículas de vidrio en un 55% en peso.

La composición de líquido era: 54% agua, 9% ácido tartárico y 37% copolímeros.(49)

En 1993 Chung realiza un experimento comparando 4 de estos materiales con uno de los ionómeros de vidrio de la época (Fuji II) y llega a las siguientes conclusiones(50):

- Mayor resistencia a la tensión diametral que los ionómeros convencionales.
- Mayor dureza.
- Menor liberación de flúor que el Fuji II.
- Fuerza de adhesión menor que el Fuji II.

Estas conclusiones se obtuvieron ese mismo año y posteriormente, fueron

apoyadas por otros trabajos como los de Cattani-Lorente y Meyer que obtenían resultados muy similares.(51)

Por sus propiedades físicas, las aplicaciones clínicas de los cermetes son mayores que las de los ionómeros convencionales, aunque por su baja estética, su uso se ve limitado al sector posterior:

- Obturación provisional de dientes semierupcionados.
- Obturación en dientes deciduos excepto en cavidades clase II.
- Obturación retrógrada en apiceptomías.
- Obturaciones de clase I que no tengan excesiva carga oclusal.
- Obturaciones en clase V en dientes posteriores.
- Bases o fondos cavitarios.
- Reconstrucción de muñones.

2.5.3. IONÓMEROS DE VIDRIO MODIFICADOS CON RESINA

Estos cementos se desarrollaron para intentar mejorar las propiedades de los ionómeros tradicionales y tienen la misma composición base que aquéllos: un polvo y un líquido. Al añadir resina se obtuvo un material con capacidad para fotopolimerizarse y además con mayor resistencia.

Este grupo de materiales ha ido recibiendo diferentes denominaciones, como: “materiales híbridos de cemento de vidrio y resina”, “cementos de vidrio ionómero fotopolimerizable” y “cementos de vidrio de polimerización dual” hasta que el nombre que introdujo Antonucci “ionómeros modificados con resina” fue el que finalmente se impuso, ya que las demás denominaciones hacían mención a la polimerización, pudiendo confundir.(52)

Estos cementos están compuestos por un polvo y un líquido que básicamente son:

- Polvo: Vidrio de fluoraluminiosilicato.
- Líquido: Hidroxietileno de metacrilato (HEMA), agua y ácido poliacrílico o un análogo.

Normalmente dependiendo del fabricante se le añade al líquido tradicional un 18-20% de resina.

Esta sería la molécula de los Ionómeros modificados con resina:

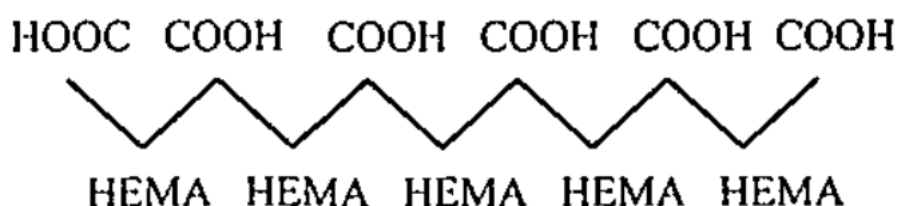


Fig 2. Molécula de ionómero de vidrio modificado con resina

La reacción de fraguado de los ionómeros de vidrio modificados con resina es similar a la que se produce en los ionómeros normales, pero se le añade una última fase que es la reacción fotoiniciada que coexiste con las otras, es decir, cuando se mezcla el polvo y el líquido empieza una reacción ácido-base pero solo cuando se somete a la luz empieza la reacción de polimerización fotoiniciada, esta reacción suplementa a la primera pero no la sustituye.

Propiedades

Las propiedades son similares a las de los ionómeros convencionales pero mejoradas al incorporar resina a su composición:

- Liberación de flúor: en 1993 se observó que el flúor penetraba en la dentina y seguía el camino de los túbulos dentinarios. No hay una diferencia significativa en este apartado entre los ionómeros convencionales y éstos.(53)
- Radiopacidad: Es muy importante para diferenciarlos radiográficamente. Tiene que ser mayor que la de la dentina, para diferenciar uno y otro y así valorar la presencia de caries secundarias o gaps. Todos los ionómeros modificados con resina de última generación tienen una radiopacidad adecuada.
- Propiedades cromáticas: tienen una gran variedad de tonalidades, esto hace que pueda ser un material de elección no solo en molares sino también, en determinadas ocasiones, para el sector anterior. Existen algunos estudios que ponen de manifiesto que la estabilidad del color de los materiales no es la idónea, y tienden a oscurecerse, por lo que siempre habría que elegir tonos más claros que el color original.(54)
- Propiedades térmicas: la difusión y/o aislamiento térmico de estos materiales es inferior a la de los ionómeros convencionales, pero aun suficiente. Respecto a la liberación de calor durante el fraguado, alcanza su máxima temperatura a los 40sg pero siempre siendo temperaturas biocompatibles. (55)(56)
- Propiedades mecánicas y de adhesión: Presentan tanto a fuerzas de tensión y compresión unos valores mayores de los que ofrecen los

ionómeros convencionales y lo mismo ocurre con la adhesión a dentina (57)(58).

- Mayor tiempo de trabajo y de fraguado que los ionómeros convencionales (45).

Entre las aplicaciones clínicas de los ionómeros de vidrio modificados con resina:

- Fondos y bases cavitarias
- Restauraciones
- Selladores
- Cementación

2.5.4. RESINAS COMPUESTAS MODIFICADAS CON POLIÁCIDOS (COMPÓMEROS)

Respecto a este material existe una gran confusión para poder categorizarlo, en general podría describirse como un composite con vidrio ionómero entre las partículas de carga.

De forma tradicional se denomina a esos materiales “compómeros”, nombre obtenido de unir sus dos componentes “COMPOsite-ionMERO”. Los compómeros son materiales monocomponentes con una matriz formada por combinación de resinas (HEMA, TEGDMA,..) y moléculas policarboxílicas modificadas, en el relleno siempre llevan Ionómero de vidrio.

Este material es muy sensible a la humedad y requiere, además, de un material adhesivo para la interfase diente-restauración. Para que se produzca el fraguado de este material es necesaria la aplicación de luz, es fotopolimerizable.

Respecto a su uso clínico, básicamente tienen las mismas aplicaciones que los ionómeros de vidrio modificados con resina, pero el uso principal que se le da es para restauraciones en zonas de bajo nivel de carga oclusal, para el resto de utilidades no hay estudios a largo plazo que muestren alguna ventaja de usar compómeros respecto a otros productos.(59)(60)

2.5.5. CARBÓMEROS DE VIDRIO

Los Carbómeros de vidrio constituyen un nuevo material desarrollado por GCP Dental en Holanda. A pesar de su nombre pertenecen a la familia de los ionómeros de vidrio debido a su composición(61)(62) que esta formada por:

- Un vidrio en polvo con iones de calcio
- Un aceite siliconado con polimetilsiloxano con estructura lineal, que contiene grupos hidroxilo
- Un componente bioactivo que se comporta como un relleno secundario, que se ha descubierto que es hidroxiapatita. Se incorpora para promover la remineralización del esmalte.
- Y un ácido polimérico acuoso que mediante la reacción ácido-base reacciona con los componentes anteriores.

Hasta la fecha no hay estudios a largo plazo y solo se han publicado estudios preliminares, por lo que el comportamiento y las propiedades de este material son todavía una incógnita.

2.5.6. GIÓMEROS

En la lucha por encontrar un material que tenga las ventajas tanto del composite como de los ionómeros de vidrio, aparecen los giómeros desarrollados por Shofu Inc. (Kyoto, Japón). Es un material que tiene la estructura de un composite pero lleva en su matriz partículas de Ionómero de vidrio pre-reaccionadas (tecnología PRG)(63).

Respecto a su uso clínico, puede tener múltiples indicaciones:

- Restauraciones oclusales y proximales en dientes permanentes.
- Restauraciones de dientes temporales.
- Selladores de fosas y fisuras.
- Cementos de endodoncia.

Ocurre lo mismo que con los Carbómeros, no hay estudios a largo plazo que nos puedan asegurar una estabilidad y comportamiento de este material, se necesitan más estudios independientes para decidir incorporar este material en nuestra práctica habitual (64).

2.6. REACCIÓN DE FRAGUADO DE LOS IONÓMEROS DE VIDRIO

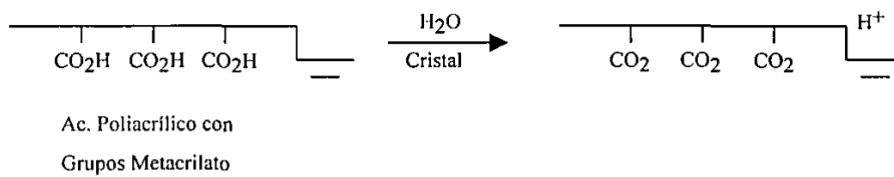
La reacción de fraguado de los ionómeros de vidrio es compleja, pero es muy importante entenderla para la correcta manipulación de este material y para entender su funcionamiento.

El Ionómero de vidrio resulta de una reacción ácido-base en la que el ácido poliacrílico reacciona con el polvo de vidrio que es la base, y se forma una matriz (sal) de agua y policarboxilato.

En la reacción tienen lugar 3 pasos:

1. Ionización del ácido policarboxílico (COOH) en agua en presencia del cristal, formando un polímero de carboxilato cargado negativamente (COO-) y protones (H+)
2. Ataque de los protones (H+) al cristal provocando la liberaciones de iones positivos (Ca^{++} , Al^{+++} y AlF^{++}) formando una matriz que envuelve el núcleo que todavía no ha reaccionado.
3. Entrecruzamiento de los iones de Ca^{++} y de Al^{+++} con 2 o 3 COO- del polímero de policarboxilato para formar una sal metálica. EL Ca^{++} se libera más rápidamente y al reaccionar con el polímero forma una matriz de policarboxilato de calcio que proporciona al cemento su fraguado inicial. Tiene lugar a los pocos minutos de la mezcla y da al material una apariencia de fraguado aunque no lo está. Los iones de Al^{+++} con más peso molecular y mayor valencia reaccionan de manera más lenta, formando sales en el interior de la matriz, hasta conseguir el fraguado completo. Esta segunda reacción empieza entre los 5 y 30 min de la mezcla y termina a las 24 horas. Esta reacción tan lenta es la que produce una red más estable y resistente, pero a su vez es la responsable del efecto negativo que la humedad ejerce sobre los ionómeros. A la vez, algunos iones policarboxilato sustituyen a los iones AlF^{++} y producen la liberación de iones de Flúor (F-). Esta capacidad de desprender iones de flúor permanece a lo largo de los meses e incluso periodos mayores.

Primero:



Segundo:



Tercero:

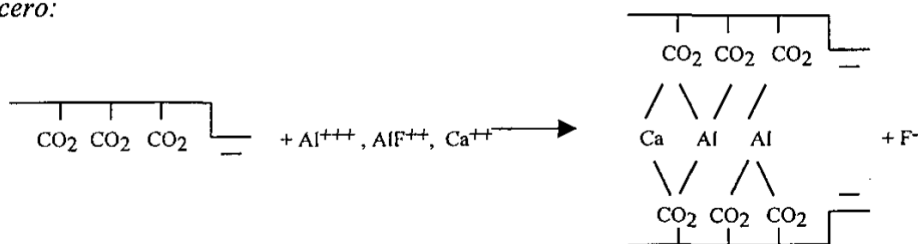


Figura 3: Reacción de fraguado de los Ionómeros de vidrio.

2.7. PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD PARA MATERIALES DENTALES.

Los materiales dentales se estudian generalmente en tres niveles biológicos. Inicialmente son sometidos a pruebas que evalúan su toxicidad. Los estudios del segundo nivel se realizan con animales de experimentación con el fin de evaluar cómo responden los tejidos a los que se somete este material. Las pruebas del tercer nivel recrean situaciones clínicas(65). De manera que existen:

1. Pruebas de citotoxicidad general:
 - Efecto citotóxico.
 - Efecto cancerígeno y mutagénico.
 - Efecto sensibilizante.

2. Pruebas de detección de citotoxicidad local:

- Aplicación de unos 15 minutos, corta duración, al tejido.
- Implantación del material a largo plazo, superior a 1 año, en tejido subcutáneo.

3. Estudios de uso y ensayos clínicos.

Para Orstavik las principales pruebas a las que se debe someter a un material antes de su uso en clínica son(66):

- Pruebas biológicas y microbiológicas: estudios donde el material a investigar se encuentra en contacto directo con los tejidos vivos. Se realizan para comprobar la aparición de síntomas y para comprobar de qué manera interfieren los ionómeros en la cicatrización de estos tejidos.
- Pruebas de uso: se realizan en animales, simulando situaciones clínicas.
- Pruebas en modelos funcionales: este grupo engloba pruebas de neurotoxicidad, filtración, alteración de la superficie radicular.
- Pruebas clínicas: dentro de éstas, existen varios subgrupos de pruebas que se pueden realizar con el material a estudiar. Cada una explora propiedades y características diferentes. El test final debería ser la supervivencia del diente al que se le aplica este material sin que presente síntomas o signos de patología. En este grupo también existen pruebas mucho más sencillas.

Para el comité de pruebas de toxicidad y evaluación de agentes medioambientales, los ensayos de citotoxicidad de un material debe incluir su caracterización química, necesaria para determinar el tipo de ensayo al que debe someterse o bien que no es necesario aplicarle ninguno. Las pruebas de toxicidad se dividen en dos parcelas⁴⁴:

- Líneas para estudiar la toxicidad: se basan en la respuesta celular y señales metabólicas de las células cuando son sometidas al contacto con el material. Se recomienda usar células humanas y realizar pruebas que incluyan la respuesta celular como la citotoxicidad, proliferación celular y apoptosis.
- Las pruebas sobre órganos o tejidos diana que podrán ser in vivo o in vitro.

El término citotoxicidad se utiliza para describir los eventos de la cascada molecular que por alguna causa se ven interrumpidos e interfieren en la síntesis de macromoléculas provocando daño celular, estructural y funcional.

La biocompatibilidad es la capacidad que tiene un material de ser funcional tras su aplicación específica en un huésped, teniendo también este una respuesta adecuada. Esto implica una interacción entre huésped, material y la función de este último, teniendo que estar estos tres factores en armonía para que un material sea considerado biocompatible.

Para realizar una evaluación biológica adecuada, el contacto entre células y material debe ser óptimo, se puede conseguir por: contacto directo, indirecto o a través de extractos(67).

En los test de citotoxicidad hay que valorar las reacciones celulares de manera morfológica o cuantitativa basándose en indicadores objetivos y evaluables como la viabilidad, la proliferación y la funcionalidad celular. Como es el caso de la apoptosis, la adhesión, la migración y la secreción de sustancias. Estas pruebas son útiles ya que clínicamente los tejidos dañados tienen un menor número de células viables y, por tanto, menor rango metabólico y de proliferación(67).

Los estudios de citotoxicidad “in vivo” e “in vitro” han sido utilizados en toda su extensión para evaluar la biocompatibilidad de los ionómeros de vidrio. Los ionómeros de vidrio presentan como monómero principal el HEMA así como diferentes ácidos en

su composición, que parcialmente polimerizados pueden llegar a contactar con la pulpa a través de los túbulos dentinarios, comportándose como agresivos y tóxicos para ésta. Los estudios de biocompatibilidad de los ionómeros de vidrio presenta una gran controversia (68)(69). La toxicidad de un ionómero de vidrio se evalúa mediante 3 pasos: el primer paso es comprobar su citotoxicidad con pruebas in vitro. Si se determina que no es citotóxico, se implanta en tejidos subcutáneos o musculares evaluando su reacción local. Finalmente, se realizan estudios in vivo en tejidos diana aplicando el material tanto en animales como en humanos(70).

Dentro de los distintos estudios del estado de proliferación de células expuestas a un material in vitro encontramos el ensayo MTT. El test colorimétrico de MTT [Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico], desarrollado por Mossman, indica los efectos en la viabilidad celular a través de las alteraciones en las actividades de la deshidrogenasa mitocondrial. Se basa en la conversión del metiltiazol tetrazolio, soluble, en formazán púrpura insoluble. Este formazán es solubilizado posteriormente y su concentración puede determinarse mediante espectrometría. Es un método rápido y barato para cultivos celulares monocapa(71).

Los ionómeros de vidrio se insertan en la cavidad oral cuando todavía no han fraguado y debido a ello, durante un periodo corto de tiempo sus componentes provocan una respuesta local cuando han reaccionado parcialmente o aún no han reaccionado. Tras el tiempo de fraguado, la liberación de parte de sus componentes aún puede ser potencialmente tóxica ya sea por contacto con los fluidos tisulares, por corrosión o debido a sus propiedades, siendo este el motivo por el que es tan importante investigarlos antes de ser empleados ampliamente en la clínica diaria (72).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Objetivo principal: Evaluar in vitro la citocompatibilidad de dos ionómeros de vidrio, frente a células madre de pulpa dental.

Objetivos secundarios:

- Evaluar la viabilidad celular frente a los distintos ionómeros vítreos
- Tipificar y valorar la apoptosis y el fenotipo celular en presencia de eluatos de ionómeros de vidrio.
- Estudiar la migración celular en presencia de eluatos de ionómeros de vidrio.
- Análisis de la morfología celular en presencia eluatos de ionómeros de vidrio.
- Valoración microscópica de las células al contacto directo con los ionómeros vítreos
- Observación y evaluación microscópica de la superficie y caracterización de los ionómeros vítreos.

Hipótesis nula: los ionómeros de vidrio estudiados no presentan diferencias en cuanto a citotoxicidad frente a células madre de pulpa dental.

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

Los materiales utilizados para este estudio fueron, **Equia Forte®** (Gc Dental, Tokyo, Japon), y **Ionostar Molar®** (Voco GmbH, Cuxhaven, Alemania). En la tabla 1, se muestra la composición de los mismos.

Materiales	Fabricante	Composición
Equia Forte®	GC Dental, Tokyo, Japon	Polvo: vidrio floro-silicoaluminoso, ácido poliacrílico, pigmentos. Líquido: ácido poliacrílico, agua destilada, ácido polibásico carboxílico.
Ionostar Molar®	Voco GmbH, Cuxhaven, Alemania	Polvo: vidrio floro-silicoaluminoso, ácido poliacrílico, pigmentos. Líquido: ácido poliacrílico, ácido tartárico, agua destilada.

Tabla 1 . Composición de los materiales utilizados.



Figura 7. Presentación comercial de IonoStar Molar® y Equia Forte®.

Para realizar la vibración de las cápsulas y su correcta mezcla, se siguieron las instrucciones de cada fabricante y se realizó mediante un vibrador universal, Ventura Mix 1 (MADESPA S.A. Toledo, España) (Figura 8).



Figura 8. Vibrador universal, Ventura Mix 1.

4.2. AISLAMIENTO CELULAR

El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia). Los donantes firmaron un consentimiento informado. Las extracciones dentales se realizaron en la Unidad de cirugía oral y maxilofacial del citado hospital. Se recogieron terceros molares sin afectación pulpar. 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) de 50ml con 25 ml de 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)
- Antifúngicos (250 unidades/ml de anfotericina; SIGMA).

Las muestras se conservaron entre 4°C y 8°C durante un máximo de 72 horas desde la extracción hasta poder ser procesadas.

Extracción pulpa dental humana (hDP):

- Se trabajó en condiciones de esterilidad en una cabina de seguridad biológica vertical tipo II con filtro HEPA (Telstar) (Figura 9).



Figura 9. Cabina de seguridad biológica vertical tipo II.

- 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 µg/ml de estreptomicina; SIGMA) y antifúngicos (250 unidades/ml de anfotericina B; SIGMA).
- Para obtener la pulpa dental el diente se seccionó transversalmente y con la ayuda de limas manuales y tiranervios se obtuvo el tejido pulpar.
- La pulpa dental (junto con el PBS) se traspasó por separado a un tubo (Falcon) donde se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se procedió a realizar la disgregación enzimática y mecánica.

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 re suspendió el precipitado celular en medio de cultivo celular MEM con anfotericina (250 unidades/ml).
5. Se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm (**Figura 10**).
6. Tras desechar el sobrenadante, se añadió medio de cultivo celular MEM con anfotericina (250 unidades/ml).



Figura 10. Centrifugadora.

Disgregación mecánica:

1. Con el fin de quitar los trozos más grandes de tejido remanente, se recogieron las células del tubo con una pipeta Pasteur y se depositaron sobre una malla estéril de 70µm (Falcon, BD Biosciences, Pharmingen, San Jose, CA, USA), 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 en el que se re suspendieron las células.

4.3. RECUENTO Y ESTIMACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Antes de cultivar las células obtenidas, se hizo un recuento y estimación de la viabilidad celular mediante la utilización de la cámara de Neubauer o hemocitómetro y azul tripán. Este método se basa en el principio de que las células vivas (viables) cuya membrana citoplasmática está intacta, no permite la entrada del colorante (azul tripán), permaneciendo refringentes. Mientras que las células muertas (no viables), debido a que su membrana citoplasmática se encuentra rota, permite el paso de colorante tiñéndolas de azul. La sistemática que se llevó a cabo se describe a continuación.

La suspensión celular se agitó y se depositaron 10µl de la misma en un tubo (Eppendorf), se añadió 10µl de la solución de azul tripán a la muestra anterior, agitándose 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 (0.1mm³), 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 como se observa en la **Figura 11**.

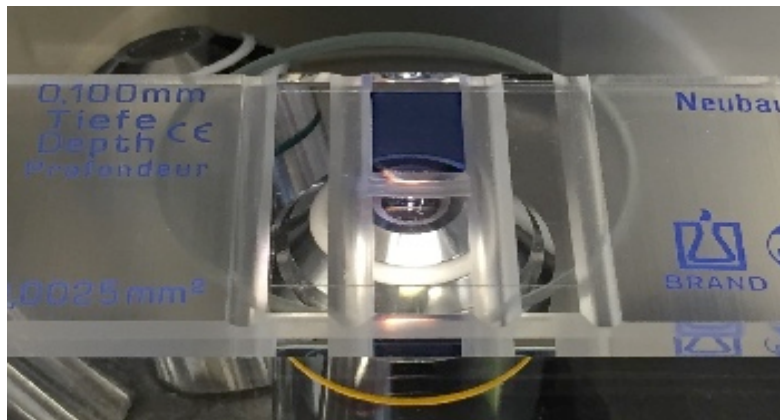


Figura 11. Cámara de Neubauer con azul tripan

Para un recuento más exacto pueden contarse las cuatro regiones de la cámara y obtener la media aritmética de los recuentos (**Figura 12**). Se calculó el número de células totales y viables de la muestra según las siguientes fórmulas:

Nº células viables/ml = nº células vivas contadas x 10000 x factor de dilución

Nº células totales/ml = (nº células vivas contadas + muertas contadas) x 10000 x factor de dilución.

$$\% Viabilidad = \frac{N^{\circ} \text{ células viables} \times 100}{N^{\circ} \text{ células totales}}$$

Se multiplica el número de células por 10.000, ya que el volumen correspondiente a la región contada en la cámara Neubauer es de 0.1mm³.

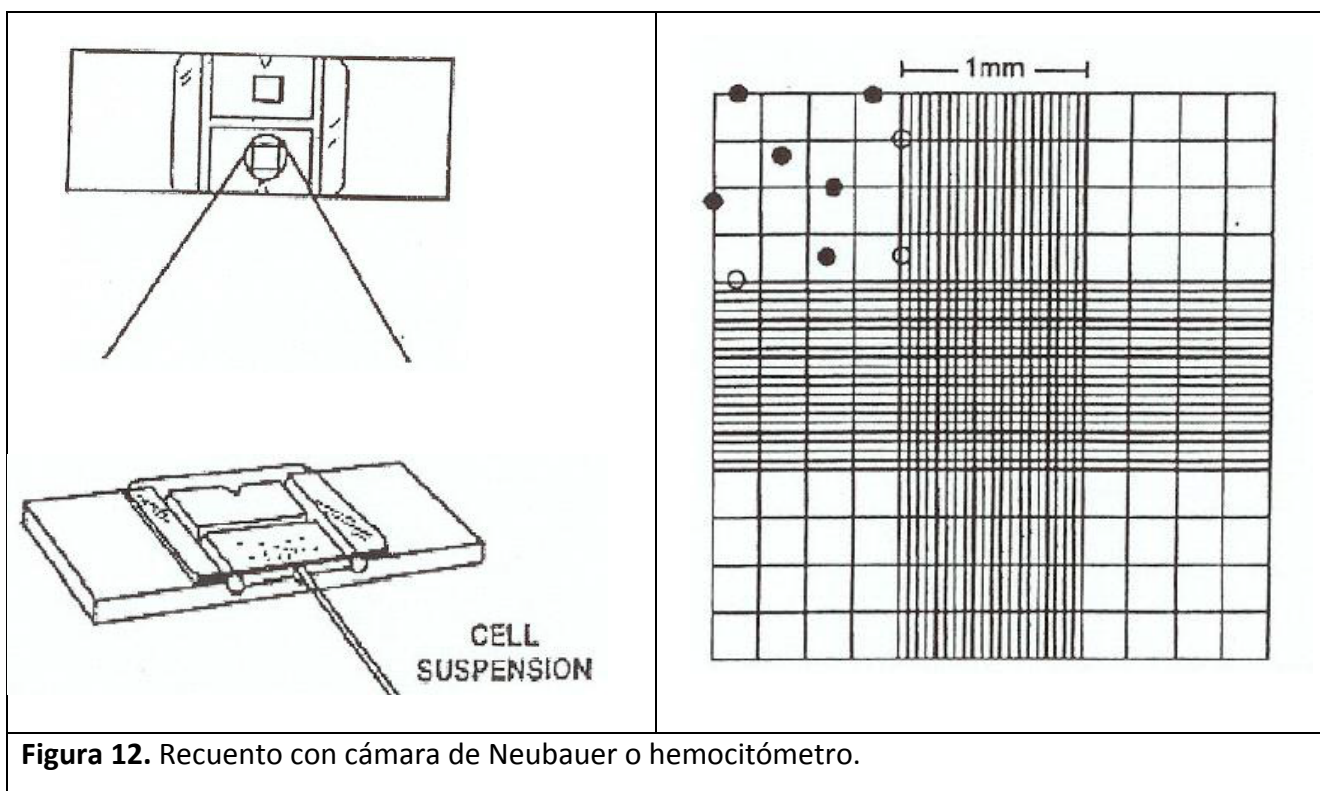


Figura 12. Recuento con cámara de Neubauer o hemocitómetro.

Tras hacer el recuento y la estimación de la viabilidad, se ajustó la solución celular a 1×10^5 células/ml y se sembró 3ml de la misma por frasco de cultivo de 25 cm² (Sarstedt). Las células se cultivaron a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad.

4.4. CULTIVO DE CÉLULAS DE PULPA DENTAL DE DIENTES PERMANENTES (DPSCs)

Las células aisladas de la pulpa dental crecen adheridas al plástico de la placa de cultivo. Para el cultivo primario de DPSCs, su expansión y mantenimiento, se utilizó un medio de cultivo celular que fue denominado medio basal (MB). El medio basal está compuesto por α -MEM al que se le añadirán los siguientes componentes que se presentan en la **Tabla 2** :

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
SBF (Gibco)	15%
P/E (Sigma)	100µg/ml
Glutamina (Sigma)	2mmol/l
Ácido ascórbico 2 fosfato (Sigma)	100µg/ml
Anfotericina (Sigma)	2,5µg/ml

Tabla 2.Componentes que se añaden al medio α -MEM

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 realizó el siguiente proceso:

- Se retiró el medio de cultivo del frasco que contenían las células, se añadió Tripsina 0.25% + EDTA 1mM (disgregación enzimática) en cantidad suficiente para cubrir la superficie del mismo y se incubó en una estufa para cultivos celulares a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad durante 5 minutos.
- Posteriormente, se procedió a la neutralización de la actividad enzimática con igual o mayor cantidad de medio de cultivo frío. La mezcla fue centrifugada durante 10 minutos a 1000 rpm, se desechó el sobrenadante y se re suspendieron las células en 1 ml de medio de cultivo basal. Tras estimar la viabilidad, se ajustó el número de células de la suspensión anterior, normalmente a 1×10^5 células/ml, y fueron sembradas en un frasco de cultivos de mayor superficie que el anterior. Las células se incubaron en una estufa para cultivos celulares a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. El medio de cultivo celular basal se cambió con una frecuencia de 3 veces por semana aproximadamente.

4.5 ENSAYO EXPERIMENTAL

4.5.1. Preparación de los Extractos

Para realizar el estudio se pretendió simular las condiciones en que los distintos materiales iban a interactuar con el tejido pulpar de los dientes. Puesto que son materiales destinados a fraguar dentro de la dentina y difunde o no hacia la pulpa, se eligió el método de elución, en el que se extrae una sustancia por elución, que llamaremos extracto o eluato, mediante un disolvente que entra en contacto con el material, que llamamos eluente.

El eluente es el medio de cultivo que se incubó durante 24 horas con el material de estudio, y el extracto resultante se aplicó en distintas concentraciones sobre las células.

En el ensayo se aplicó cada concentración de eluente a tres pocillos diferentes, y tres semanas más tarde se repitió todo el ensayo, por lo que se hizo por sextuplicado. Además de las diluciones, se empleó un control negativo (medio de cultivo), y un también un control en blanco (medio de cultivo sin células, para contrarrestar la contaminación colorimétrica del propio medio de cultivo).

La preparación de los extractos de los distintos materiales se realizó siguiendo el protocolo estándar establecido en las normas ISO 10993-5 para test de citotoxicidad in vitro. Para ello, 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 dejaron fraguar en una cámara de humedad (según el material) a temperatura ambiente durante 24 h. Una vez fraguados todos los materiales, se cubrieron con medio de cultivo, (DMEM; Sigma-Aldrich, Madrid, España), suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco Invitrogen, Paisley, Scotland), L-glutamine (PAA Laboratories, Pasching, Austria), penicilina

/estreptomycin (PAA Laboratories, Pasching, Austria) en una relación de 3 cm² 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 CO₂, a 37°C y humedad relativa del 95%.

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 µm (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 será la concentración total, a partir de la cual se prepararán las diluciones 1/2 y 1/4.

4.5.2. Análisis del pH, osmolalidad y espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) de los diferentes extractos

Se prepararon muestras de cada tipo de ionómero de 5 mm de diámetro y 2 mm de altura y luego se sumergieron en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) sin calcio ni magnesio durante 24 horas. El pH del HBSS antes y el HBSS después de la inmersión de los selladores de ensayo se evaluó por triplicado (GLP21 + de Crison, Barcelona, España). Los resultados corresponden al promedio y a la desviación estándar.

La osmolalidad de HBSS antes y HBSS después de la inmersión de los ionómeros de ensayo se determinó directamente en 10 µl de HBSS (Osmometer Vapro 5520, Wescor, Utah, EE.UU.). La presencia de silicio, fósforo, calcio y estroncio se evaluó mediante espectrometría de masa por plasma acoplado inductivamente (ICP-MS-Agilent 7900, Stockport, RU).

4.5.3 Ensayo de viabilidad celular (MTT)

La tasa de viabilidad celular en presencia de las diferentes eluciones de los materiales se evalúa utilizando un ensayo MTT (MTT Cell Growth Kit, Chemicon,

Rosemont, EE.UU.). Con esta técnica se quiere evidenciar de forma indirecta la proliferación de las DPSCs en presencia del extracto sin diluir y con las diluciones 1/2 y 1/4. Esta prueba permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas a través de la reducción metabólica que realiza la enzima mitocondrial succinato- deshidrogenasa sobre el sustrato bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Como resultado se genera formazán, un compuesto de color azul cuya cantidad generada es proporcional a la cantidad de células vivas en cultivo.

Para la realización de este ensayo se procedió del siguiente modo:

- a) Se sembraron DPSCs en placas de 96 pocillos, con una densidad de siembra de 3000 cel/pocillo (1×10^3).
- b) Tras 24 horas de incubación a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad, se aplicaron 100µl/ pocillo de diluciones 1/1, 1/2, 1/4, y se incubaron a 24, 48 y 72h a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad.
- c) Transcurrido el tiempo de incubación (24h, 48 ó 72 horas), se sustituyó el DMEM con rojo fenol por 400 µl de DMEM sin rojo fenol.
- d) El reactivo MTT se añadió a cada uno de los pocillos para quedar a una concentración final de 3,8 mg/ml y se incubó a 37°C y un 5% de CO₂ durante 4 horas. **(Figura 13)**
- e) Tras la incubación, se retiró el contenido de los pocillos y se añadió 400 µl de DMSO por pocillo.

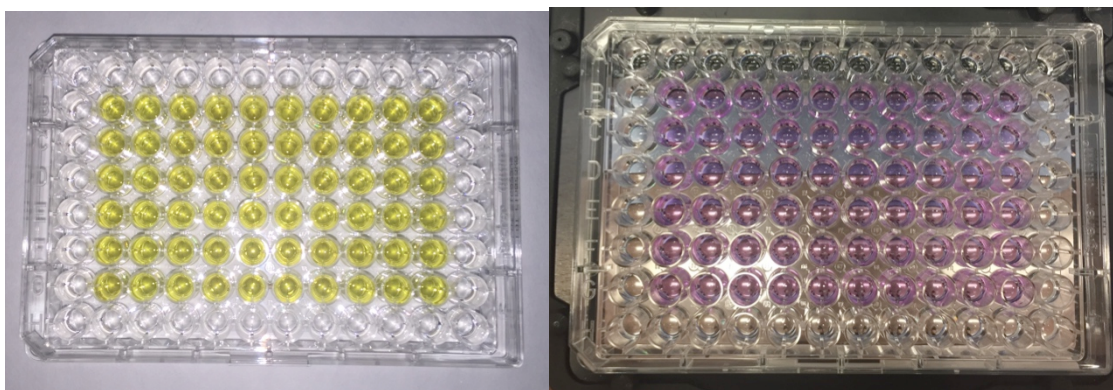


Fig 13. Formación de los cristales de formazan, tras 4 horas de incubación

f) Se trasvasaron 200 μ l del contenido de cada pocillo a una placa de lectura y se midió la absorbancia a 570 nm con medida de referencia a 620 nm utilizando un lector de microplacas automático (ELx800; Bio-Tek Instruments, Winooski, EE.UU.)

4.5.4 Análisis de la expresión de marcadores de superficie de células madre mesenquimales sobre DPSCs expuestas a los ionómeros de vidrio

La expresión de los marcadores de superficie de las células madre mesenquimales se analizaron en los cultivos de DPSCs por medio de la citometría de flujo. Las células fueron sembradas a una densidad de 3×10^4 cel/cm² en placas de 48 pocillos y tratadas con los diferentes eluatos durante 72 días a 37°C. Posteriormente, las células fueron despegadas usando una solución tripsina/ EDTA al 0.25%, lavadas dos veces con PBS e incubadas en la oscuridad a 4°C durante 30 min con anticuerpos monoclonales específicos conjugados con fluorescencia para CD73, CD90 y CD105 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), como recomienda la Sociedad internacional de Terapia Celular, para confirmar el fenotipo mesenquimal de las células¹³⁹. También se analizó, la falta de expresión de los marcadores hematopoyéticos CD14, CD20, CD34 y CD45. La fluorescencia no específica se midió utilizando anticuerpos monoclonales de isotipo específico. La fluorescencia celular se realizó usando un citómetro de flujo BD FACSCanto™ (BD Biosciences, Pharmingen,

San Jose,CA,USA) y analizadas mediante el análisis de software Kaluza (Beckman Coulter, Inc., Brea, California, USA)

4.5.5 Ensayo de apoptosis celular

En la fase temprana de la apoptosis, la integridad de la membrana celular se mantiene, pero se pierde la simetría de la membrana citoplasmática. Las anexinas son un grupo de proteínas calcio dependientes unidas a fosfolípidos. Estas se utilizan junto con tinciones vitales para identificar, mediante citometría de flujo, diferentes estados apoptóticos. Dentro de ellas, la anexina V es una proteína recombinante que se une específicamente a residuos de fosfatidil serina (PS), los cuales se encuentran expuestos en la cara externa de la membrana plasmática celular.

La PS, es una molécula que se encuentra orientada hacia el interior de la célula, y cuando ésta entra en el proceso de muerte por apoptosis, uno de los eventos tempranos es la exposición de la misma hacia el exterior de la membrana celular, pudiendo ser detectada mediante Anexina V conjugada con ficoeritrina (PE).

Cuando el proceso de apoptosis progresa la integridad de la membrana celular se pierde, el ADN se hace accesible y se emplean moléculas fluorescentes que actúan como agentes intercalantes en los ácidos nucleicos de doble cadena (y, por tanto, en el ADN) como el Yoduro de Propidio (PI) y la 7-aminoactinomicina D (7-AAD).

Se sembraron DPSCs en placas de 96 pocillos, con una densidad de siembra de 3000 cel/pocillo (1×10^3). Tras 24 horas de incubación a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad, se aplicaron 100µl/ pocillo, de diluciones 1/1, 1/2, 1/4, y se incubaron a 72h a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad.

Las DPSCs fueron sometidas a una tinción doble con Anexina-V conjugada con PE y 7-AAD mediante el kit de detección de apoptosis (BD Biosciences™) con el fin de

determinar la viabilidad celular mediante citometría de flujo. Los pasos a seguir fueron los siguientes:

- Las células se separaron de la superficie de cultivo empleando una solución de tripsina-EDTA al 0.25%
- Se lavaron con PBS 1X
- Se incubaron con Anexina-V conjugada con PE y 7-AAD en tampón de unión a temperatura ambiente durante 15 min.

El análisis de los resultados se realizó en el citómetro de flujo BD FACSCanto™, interpretándolos del siguiente modo:

- Células vivas: Anexina-V-/7-AAD-.
- Células en apoptosis temprana o tardía: Anexina+/7-AAD-.
- Células necróticas (Anexina-V+/7-AAD+).

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

4.5.6 Ensayo de migración celular

Para este ensayo, cultivamos DPSCs a una densidad adecuada (5×10^5) en placas de 6 pocillos hasta que alcancen la confluencia en presencia de eluatos. En ese momento, trazamos una línea utilizando una punta estéril de 200 µl de pipeta, creando una herida en el campo de visión al microscopio, dando lugar a una zona despejada de células. Cambiamos el medio de cultivo para retirar las células despegadas y administramos las diluciones por triplicado.

Tomamos imágenes de las zonas despejadas, teniendo como referencia la marca realizada en el exterior del pocillo con rotulador permanente, utilizándola como guía de la línea que hemos trazado anteriormente. Las imágenes se tomaron a las 0, a las 24 y a las 48 horas de tratamiento, utilizando un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000-U (Nikon Corp., Tokio, Japón).

Las imágenes obtenidas se corrigieron con Adobe Photoshop 7.0.1 (Adobe Systems, McLean, VA, EE.UU.), mientras que se utilizó el software ImageJ (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD, EE.UU.) para medir la superficie cubierta por las células.

Se determinó la distancia entre los frentes de migración a las 0,24 y 48 h.

4.5.7. Estudio microscópico de la morfología celular

Una de las formas para valorar el estado óptimo de la célula, es valorando su citoesqueleto, de tal modo que para este ensayo, se sembraron DPSCs en placas de 96 pocillos, con una densidad de siembra de 3000 cel/pocillo (1×10^3). Tras 24 horas de incubación a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad, se aplicaron 100µl por pocillo de diluciones 1/1, y se incubaron a 72h a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Después, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS y permeabilizadas con Tritón al 0.25%. Para la tinción del citoesqueleto y del núcleo, se utilizó Phalloidina conjugada (1:500) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) que se incubó durante 1h en oscuridad a temperatura ambiente. Los portas de microscopio se montaron con una solución anti-deslizamiento (Vecta shield mounting medium, Vector Laboratories, Hércules, CA, USA) que contiene 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (sonda molecular fluorescente, 0,2 mg/mL in PBS) y examinadas en un microscopio de fluorescencia (Leica DMI 4000B, Wetzlar, Germany).

4.5.8 Adhesión celular y superficie de los ionómeros de vidrio

Con la observación de las muestras al contacto con los cementos bajo microscopio electrónico de barrido (MEB), podemos determinar si se produce un fenómeno de adhesión celular al material que estamos estudiando, y a su vez analizar de manera microscópica la superficie de los cementos.

Se prepararon quince discos de cada material y se subdividieron en 3 grupos, de 5 muestras cada uno. Para eliminar posibles subproductos tóxicos, todos los discos se incubaron primero a 37°C en placas de cultivo de 24 pocillos que contenían 1 ml de agua destilada, que se cambió directamente durante 5 días. Después, las DPSCs se sembraron directamente sobre cada disco a una densidad de 5×10^4 células/ml.

Después de 4 días de cultivo, las muestras sembradas con DPSCs fueron retiradas de los pocillos de cultivo, se enjuagaron con PBS y se fijaron con 3% de glutaraldehído en 0,1 M tampón de cacodilato de 1,5 h a 4°C. Luego, se aclararon de nuevo y después fueron fijados en tetróxido de osmio durante 1 hora antes de ser deshidratados en una serie de soluciones de etanol graduadas (30, 50, 70, 90% vol/vol). El secado final se realizó por el método de punto crítico (CPDO2 Balzers Union). Finalmente, las muestras metalizadas con oro fueron examinadas por MEB.

4.5.9 Caracterización de los ionómeros de vidrio

El espectro de rayos X emitido por un espécimen permite llevar a cabo una medida cualitativa (medida del rango de cada rayo X emitido que es característico de cada elemento) y una medida cuantitativa (la medida de la cantidad de rayo X que se emite por segundo nos dice qué cantidad de elemento está presente). Así, podemos caracterizar un material sólido mediante espectrometría de rayos X.

El protocolo para la caracterización de los ionómeros de vidrio fue el siguiente:

Las muestras se prepararon en el edificio LAIB de la Universidad de Murcia, donde fueron sometidas a los siguientes procesos:

1. Se eliminó el sobrenadante de las muestras y se lavaron con PBS
2. Se fijaron con glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato de sodio con sacarosa 0,1M de 3-5 horas.

3. Se retiró el fijador en frío y se añadió el lavador (tampón cacodilato de sodio con sacarosa) durante una noche.

Posteriormente, las muestras se trasladaron al Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) en el Campus de Espinardo para ser procesadas y preparadas para su observación con el microscopio electrónico de superficie (MEB-EDX). El procesado fue el siguiente:

1. Contrastado de la muestra con tetróxido de osmio al 1% durante 1-2h.
2. Lavado con tampón cacodilato con sacarosa y su asentamiento durante 12h (Una noche).
3. Deshidratación en acetona al 30%, 50%, 70%, 90% y 100% durante 20' con cada concentración de forma sucesiva.
4. Se llevaron al punto crítico con acetona al 100% y CO₂ líquido en una cámara de secado de punto crítico Leica EM CPD030.
5. Se aplicó un recubrimiento de carbón en la unidad CC7650 SEM Carbon Coater.
6. Las muestras fueron analizadas por el sistema de captación de rayos X incorporado en el microscopio electrónico de barrido Jeol 6100 EDAX (USA).

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos procedentes del ensayo MTT y del ensayo de migración celular se analizaron usando el paquete de software estadístico SPSS versión 15.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Se evaluó la distribución normal de los datos usando el test de Kolmogorov-Smirnov, y las diferencias entre grupos fueron estudiadas mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de un test de Bonferroni. Todos los

valores han sido expresados como media $\pm$ desviación estándar (DS). Un valor con una $p < 0.05$ se consideró significativo.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Análisis del pH, osmolalidad y espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) de los diferentes extractos.

Los extractos de Ionostar Molar® y Equia Forte® exhibieron un pH ligeramente menor que la solución salina (HBSS). La osmolalidad de los materiales de estudio fue de 8.33 ± 2.08 para Equia Forte® y 9.00 ± 1.00 para Ionostar Molar®. Los resultados del ICP-MS de las mismas muestras se muestran en la **Tabla 3**.

	Concentración de elementos (mg/L)					
	pH	Presión osmótica	Silicio	Fósforo	Calcio	Estroncio
HBSS	7.98 ± 0.15	287 ± 2	62.38	27314.22	36.44	5.73
Equia Forte®	6.71 ± 0.14	8.33 ± 2.08	2,00	0,45	0,26	0,36
Ionostar Molar®	6.71 ± 0.10	9.00 ± 1.00	7,09	4,13	0,52	0,75

Tabla 3. Análisis del pH, osmolalidad y espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) de los diferentes extractos.

5.2. Aislamiento y cultivo celular

Como se pueden observar en la **Figura 14**, a las 72h, apreciamos células de tipo fibroblástico que van formando pequeñas colonias **(A)**. A la semana el número de células ha aumentado ostensiblemente, hasta que alcanzan la confluencia, aproximadamente al mes de cultivo **(B)**. Una vez expandidas las células el tiempo suficiente para conseguir varios millones de células, se procedió al ensayo experimental.

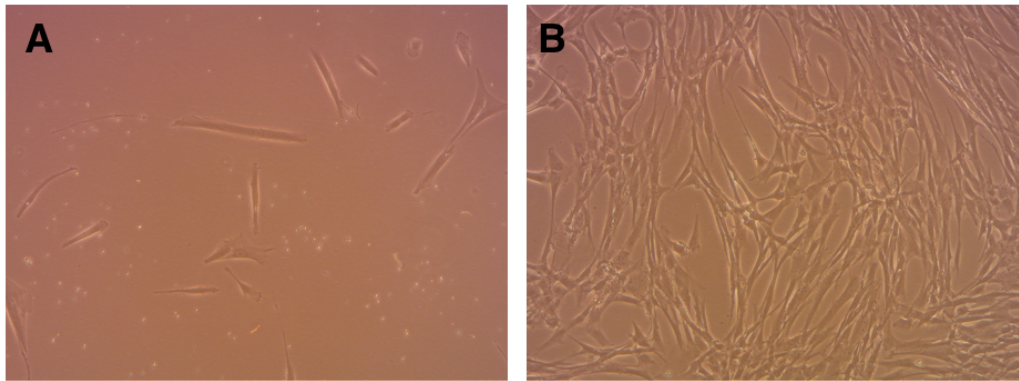


Figura 14. Cultivo primario de células procedentes de pulpa dental a las 72h **(A)** y al mes de estar en cultivo **(B)**.

5.3. Caracterización fenotípica de la línea celular

Tras expandir la línea celular hasta el pase 4, con el fin de que el cultivo primario fuera lo más homogéneo, se realizó la caracterización celular mediante citometría de flujo. Como se puede observar en la **Figura 15**, las células procedentes de la pulpa dental expresaron los marcadores mesenquimales CD73, CD90 y CD105. Por otra parte no expresaron los marcadores hematopoyéticos CD14, CD20, CD34 y CD45. Dicho análisis confirma que dichas células, son células madre de origen mesenquimal.

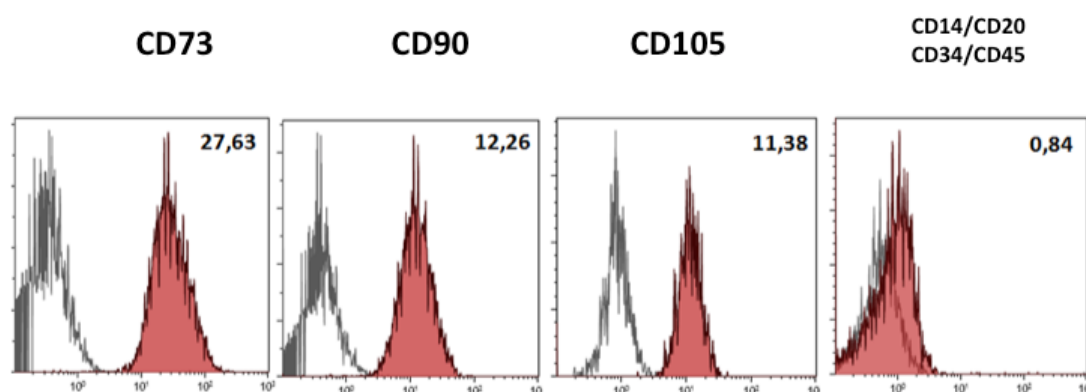
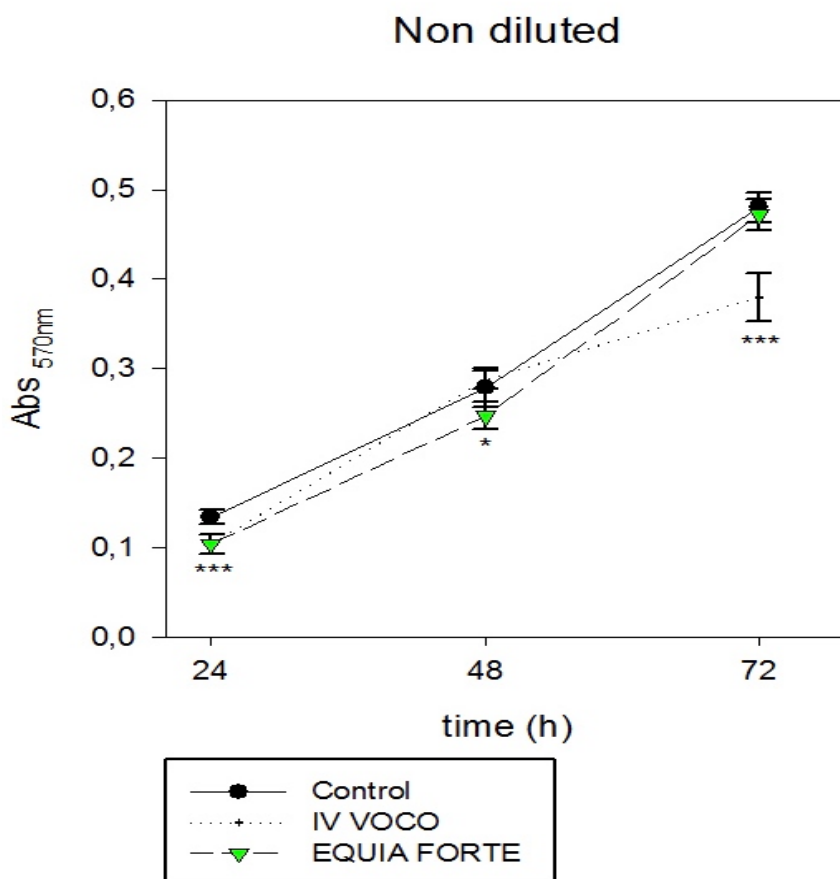


Figura 15. Análisis por citometría de flujo de la expresión de marcadores mesenquimales y hematopoyéticos CD73, CD90, CD105, CD14, CD20, CD34 y CD45.

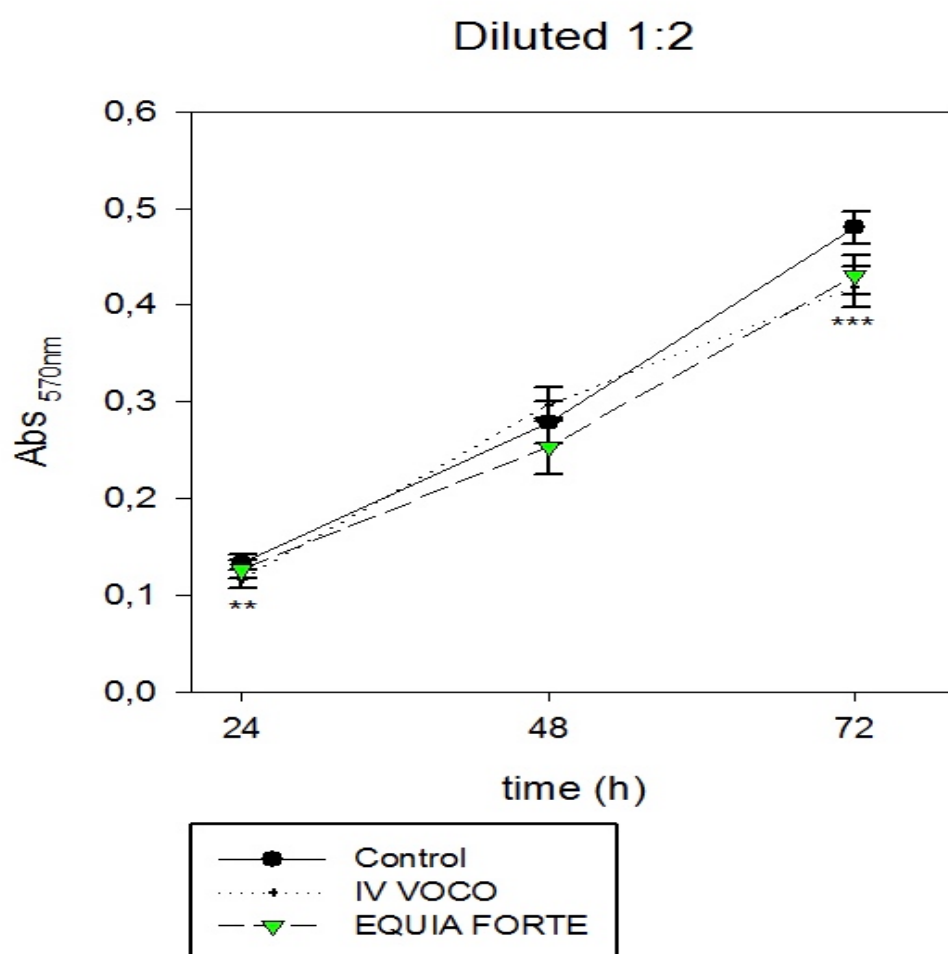
5.4. Ensayo de viabilidad celular (MTT)

Se midió la viabilidad celular de las células madre de pulpa dental (DPSCs) tras la exposición a diferentes diluciones de los ionómeros de vidrio estudiados (sin diluir; dilución 1/2, dilución 1/4), a las 24, 48 y 72 horas de incubación como se observa en las **Gráficos 1, 2 y 3**. En el **Gráfico 1**, tras las 72 horas de exposición con ionómeros sin diluir, se pudo observar una clara disminución de la viabilidad celular en el caso de Ionostar Molar® de forma estadísticamente significativa ($p < 0.001$); mientras que en el caso de Equia Forte®, la viabilidad se asemejó bastante al grupo control. A las 24 y 48 los grupos de estudio (Ionostar Molar® y Equia Forte®) mostraron una menor actividad metabólica que en el caso control, que resultó ser estadísticamente significativa (24h: $p < 0.001$; 48h: $p < 0.05$).



Gráfica 1. Proliferación celular de los diferentes materiales aplicados sin diluir.

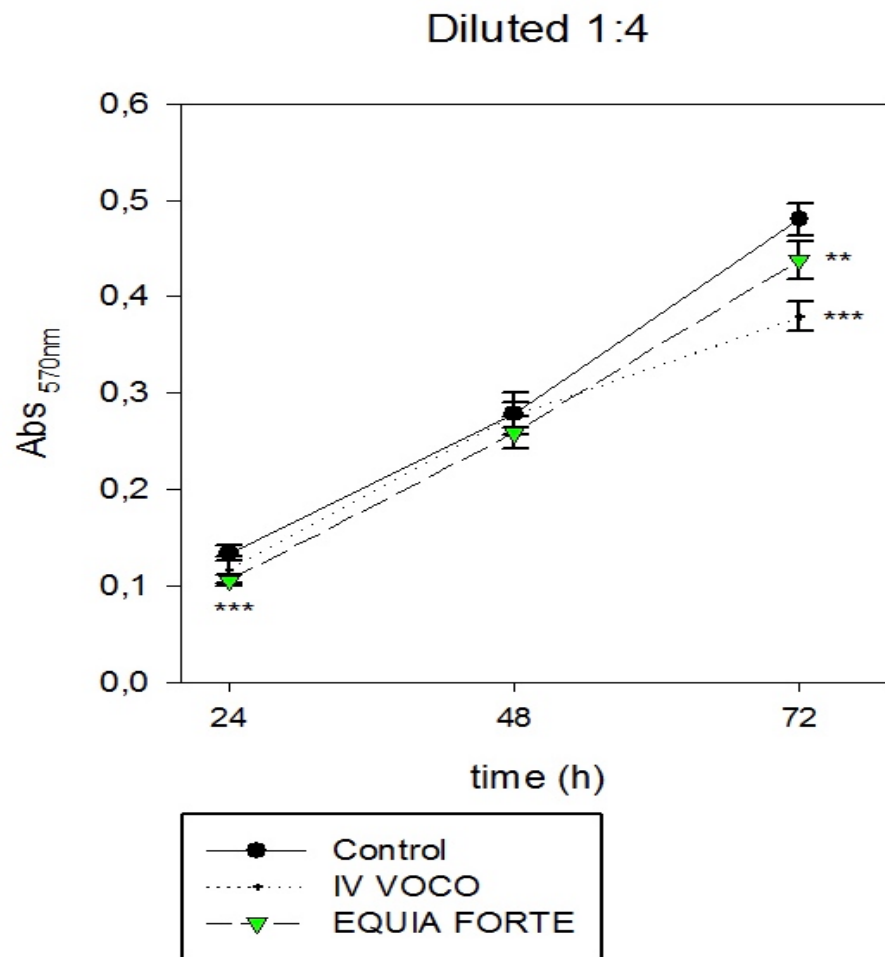
En presencia de las diluciones 1:2, la **Gráfica 2** muestra una reducción de la actividad metabólica o viabilidad celular a las 72h estadísticamente significativa para Ionostar Molar® y Equia Forte® en relación al grupo control ($p<0.001$). Sin embargo a las 48h existe un pequeño incremento de la viabilidad celular con Ionostar Molar®, aunque no resulta estadísticamente significativo. A las 24h la reducción celular ya se observa estadísticamente significativa en ambos grupos ($p<0.01$).



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

Con la dilución 1:4 de cada uno de los materiales de estudio, se observó a las 24h una reducción estadísticamente significativa de la viabilidad celular en ambos materiales

($p < 0.01$) la cual se hizo más evidente a las 72h principalmente con Ionostar Molar® ($p < 0.001$).



Gráfica 3. Proliferación celular de los diferentes materiales aplicados a dilución 1:4

5.5. Análisis del fenotipo mesenquimal en presencia de los eluatos

Realizamos un análisis mediante citometría de flujo, para confirmar el fenotipo mesenquimal de las células madre de pulpa dental (DPSCs), aisladas de un cultivo de

pulpa dental de dientes permanentes, y para determinar posibles cambios fenotípicos, tras el cultivo con los eluatos de los diferentes materiales utilizados a las 72h.

Más del 95% de las células DPSCs, presentaron resultados positivos de los marcadores mesenquimales, CD73, CD90 y CD105, mientras que sólo un 5% presentaron resultados positivos de los marcadores hematopoyéticos CD14, CD20, CD34 y CD45 como se puede observar en la **Figura 16**.

Un aspecto importante es el hecho de que tras la incubación de las DPSCs con las diferentes diluciones de los extractos eluidos (sin dilución, 1:1, 1:2, y 1:4), el porcentaje de resultados positivos de los marcadores mesenquimales no presentó cambios significativos frente al grupo de DPSCs no tratadas (control). Con lo que podemos concluir que la presencia de los materiales no afecta a la condición de células indiferenciadas, manteniendo sus propiedades de células madre.

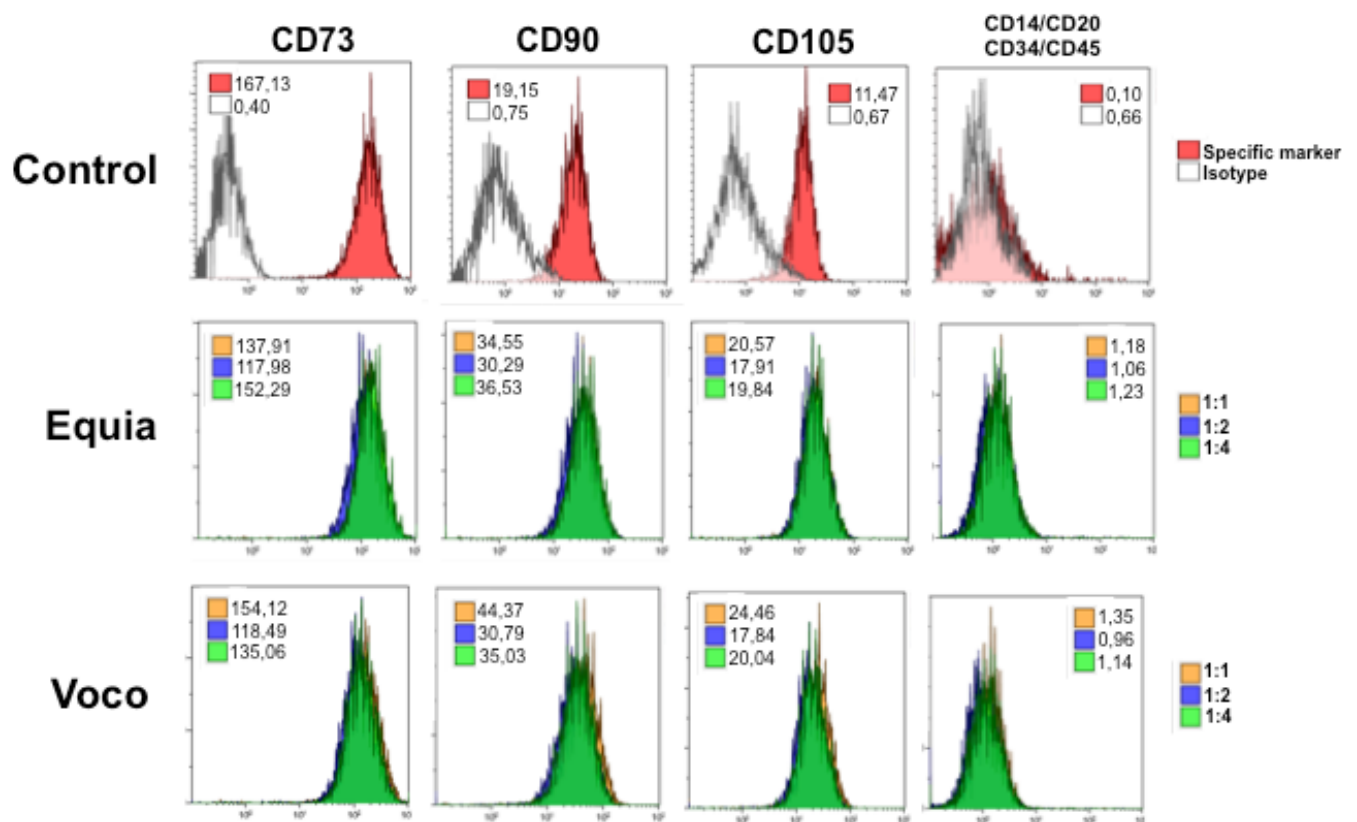


Figura 16. Expresión de marcadores específicos mediante citometría de flujo.

5.6. Análisis de la apoptosis/necrosis celular

Las DPSCs se cultivaron sobre eluatos de Equia Forte®, Ionostar Molar® y plástico (control) durante un periodo de 72h. Transcurrido este tiempo, las células fueron marcadas con Anexina-V y 7-AAD y analizadas mediante citometría de flujo.

Se representó mediante diagrama de puntos bidimensional, la distribución de las células vivas (Anexina- V⁻/7-AAD⁻), células en apoptosis temprana (Anexina-V⁺/7-AAD⁻) y células en apoptosis tardía y necróticas (Anexina-V⁺/7-AAD⁺ y Anexina-V⁻/7-AAD⁺) en DPSCs no tratadas, o en las expuestas a las diferentes diluciones de los eluatos de los agentes para restauración dental, como se observa en la **Figura 17**. El porcentaje de células vivas de los grupo Ionostar Molar® y Equia Forte® fue cercano al 95% para todas las diluciones como en caso del grupo control. Este resultado sugiere una buena biocompatibilidad de los materiales, lo que los hace indicados para restauración dental, incluso en caso de poca dentina remanente, muy cercanos a pulpa.

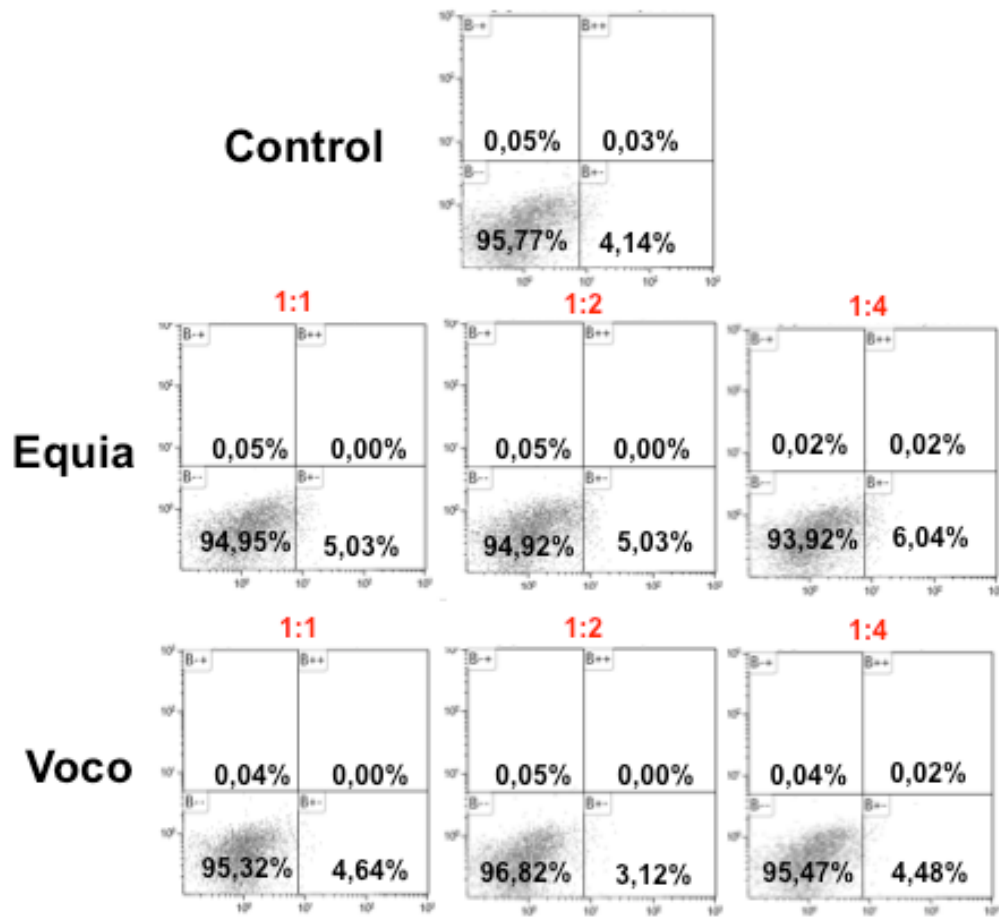


Figura 17. Porcentaje de células vivas, en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necróticas mediante citometría de flujo.

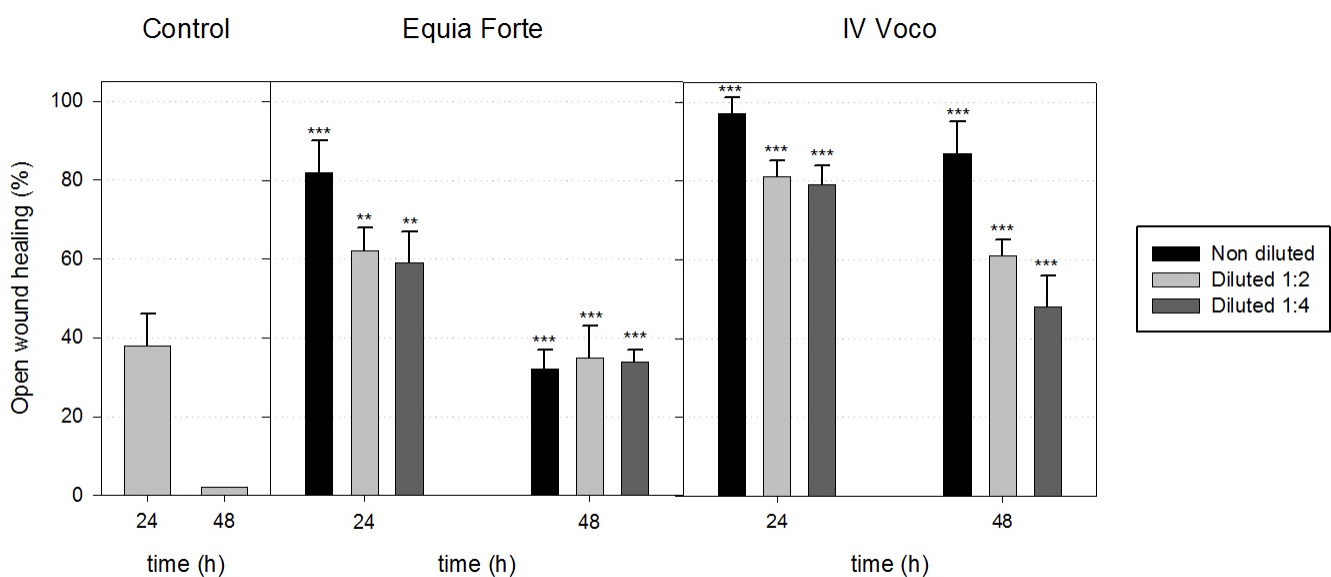
5.7. ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR

Para evaluar si los diferentes materiales utilizados para restauraciones y/o bases cavitarias podían influenciar el proceso de migración celular, se utilizó un modelo de curación de herida (wound healing). Se basa en la observación del comportamiento de una monocapa de células a la que previamente se le ha hecho una “herida”, área libre de células. Las células en el borde de la “herida” se moverán hacia la abertura, pudiendo evaluar la migración celular que se produce en presencia o ausencia de los extractos de los ionómeros de vidrio empleados.

En el grupo control se observa, que a medida que aumenta el tiempo de cultivo, se produce una mayor migración celular, produciéndose el 50% del cierre de la herida a las 24h y el cierre completo a las 48 h.

El tratamiento con diferentes diluciones del eluato de Equia Forte® a las 24 h induce una tasa de migración celular, algo menor, pero estadísticamente significativa ($p<0.001$) en relación a la del grupo control. A las 48h se produce un cierre parcial de la herida, pero sin ser completa (sin dilución, 1:2, 1:4).

El tratamiento con los eluatos de Ionostar Molar® a las 24 h, presentaron los menores valores de migración celular con respecto al resto de los grupos. Tras 48 h de incubación, la migración celular fue significativamente menor que en el grupo control ($p<0.001$) (**Gráfica 4**).



Gráfica 4. Porcentaje de migración celular a las 24 y 48h en presencia de los diferentes eluatos

5.8. Análisis de la morfología celular

Extractos sin diluir de los diferentes ionómeros, provocaron cambios en la morfología celular de las DPSCs (**Figura 18**). En presencia de Equia Forte®, las células adquirieron morfología de tipo fibroblástico con una adecuada organización del citoesqueleto (**Figura 18A**). En cambio en presencia de Ionostar Molar®, el número de células decreció con una morfología irregular del citoesqueleto, sugiriendo menos actividad metabólica que en el caso de Equia Forte (**Figura 18B**). Dichos resultados se encuentran en la misma línea de los obtenidos en el ensayo de viabilidad celular.

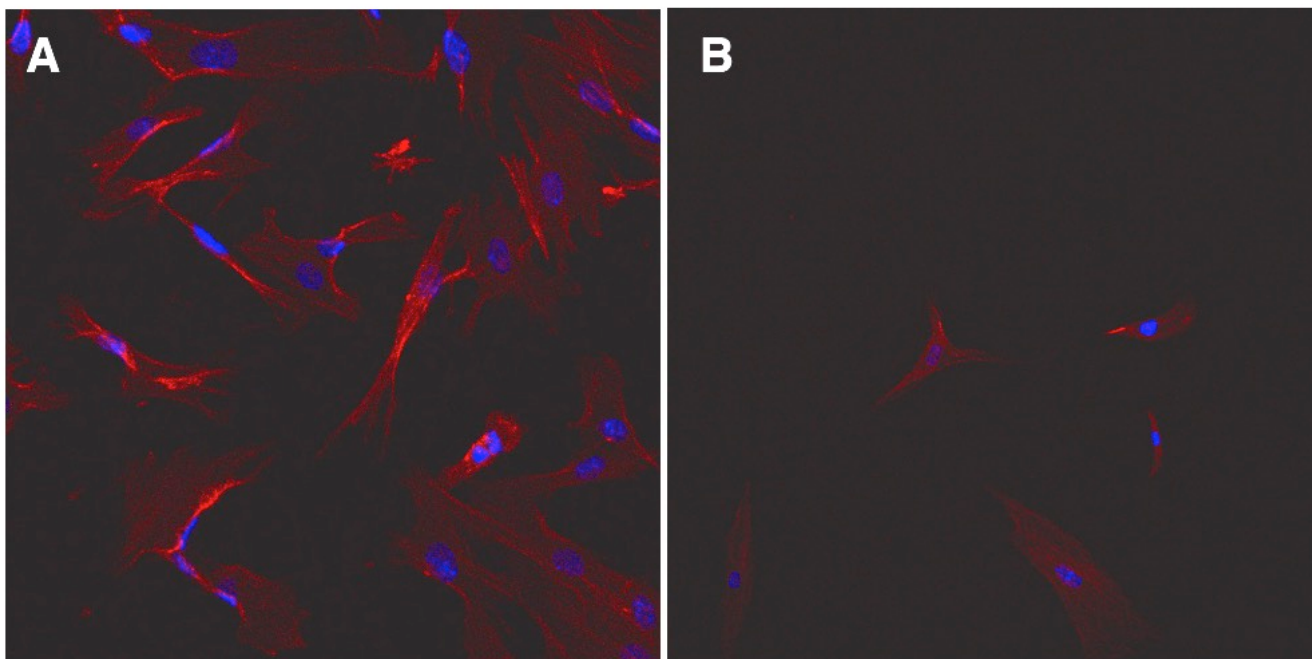


Figura 18. Morfología del citoesqueleto y del núcleo de las DPSCs a las 72 horas de cultivo en Equia® (**A**) y Ionostar Molar® (**B**).

5.9. Ensayo de la adhesión celular

La morfología y adhesión de las hDPSCs sobre la superficie de los discos de Equia Forte® y Ionostar Molar® tras un cultivo de 72 h se muestran en la **Figura 19**. El

análisis mediante SEM muestra un mayor crecimiento y extensión celular sobre Equia Forte® comparado con lo observado sobre Ionostar Molar® (**Figura 19 A y B respectivamente**). La morfología celular y la disposición en monocapa de las células procedentes de pulpa dental sugiere que el material Equia Forte® posee una superficie que favorece la adhesión celular. Sin embargo, la fijación celular sobre los discos de Ionostar Molar® fue limitada, mostrando sólo unas pocas células estiradas y aisladas sobre la superficie de los discos de material. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en el ensayo de viabilidad celular.

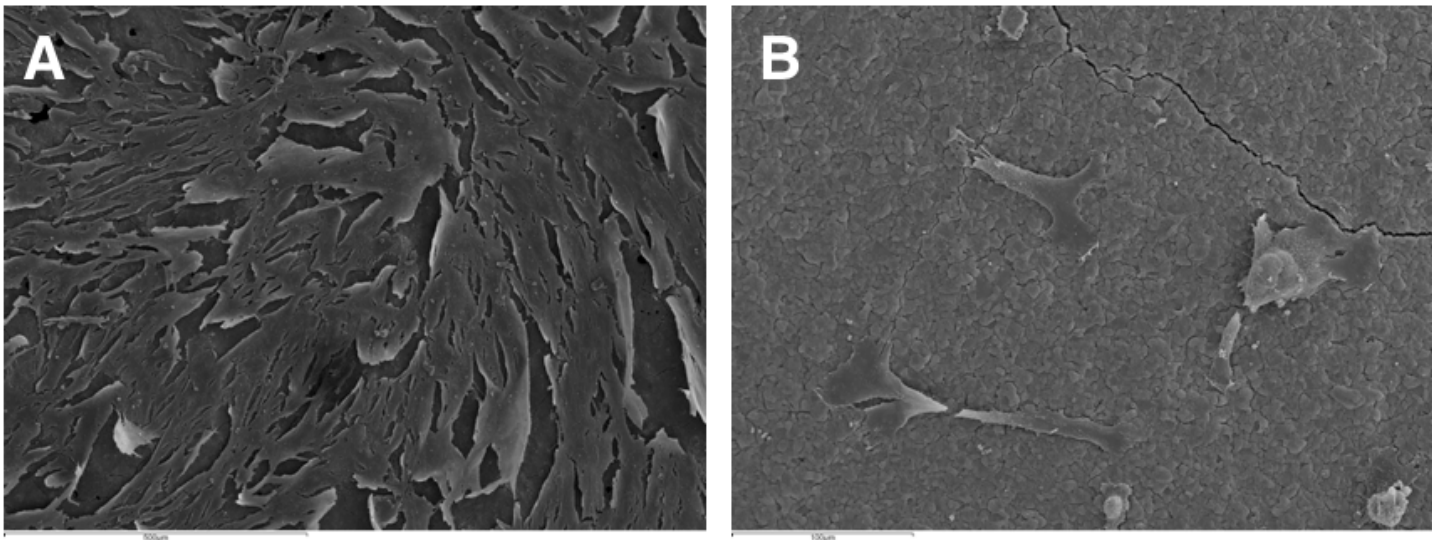


Figura 19. Morfología de la adhesión de las DPSCs a las 72 horas de cultivo en Equia Forte® (**A**) y Ionostar Molar® (**B**)

5.10. Caracterización de la superficie de los materiales mediante espectrometría dispersiva de rayos x (EDX).

Dado que la espectrometría de Rayos X es una técnica que se utiliza para el análisis de elementos de forma cuantitativa y cualitativa, se analizó la composición elemental de la superficie de discos de Ionostar Molar® y Equia Forte®.

5.10.1. Equia Forte®

Tal y como muestran las **Figuras 20 y 21**, morfológicamente se observan grietas en el ionómero, lo que nos sugiere que son materiales que deben ser polimerizados con tiempos pequeños y repetidos, ya que tienden a la formación de grietas. En cuanto a la composición se observó que los compuestos en mayor proporción fueron oxígeno (O), aluminio (Al), silicio (Si), estroncio (Sr) y flúor (F) (**Tabla 4**). La presencia de estos componentes sugieren una buena bioactividad de este material.

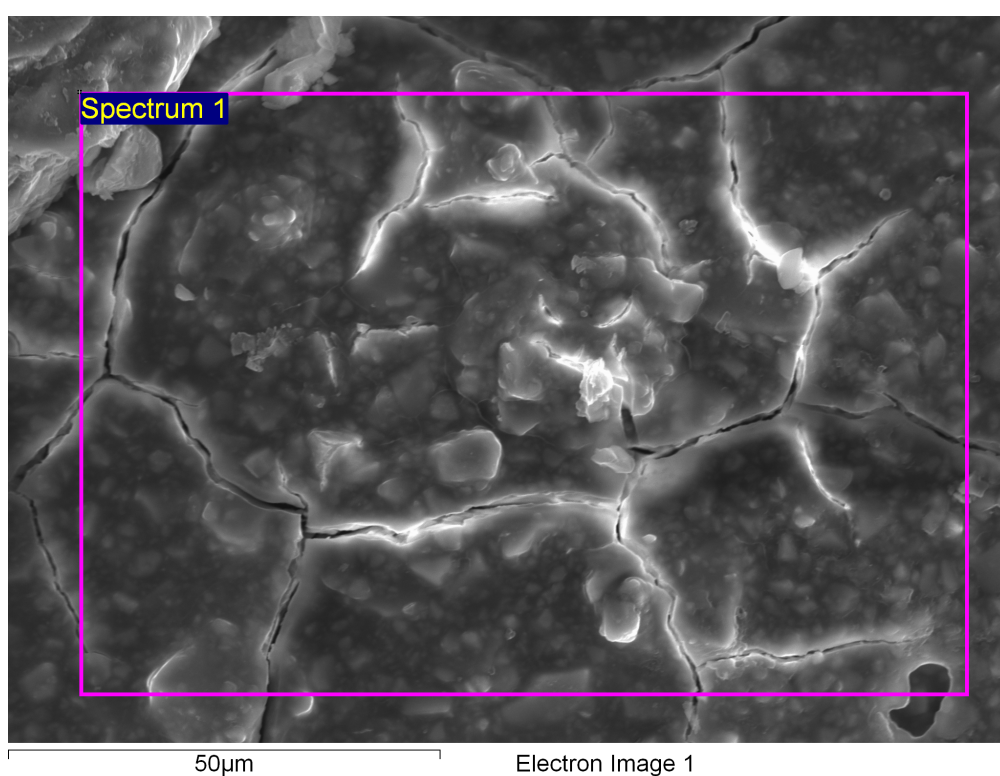


Figura 20. Observación de la superficie de Equia Forte®.

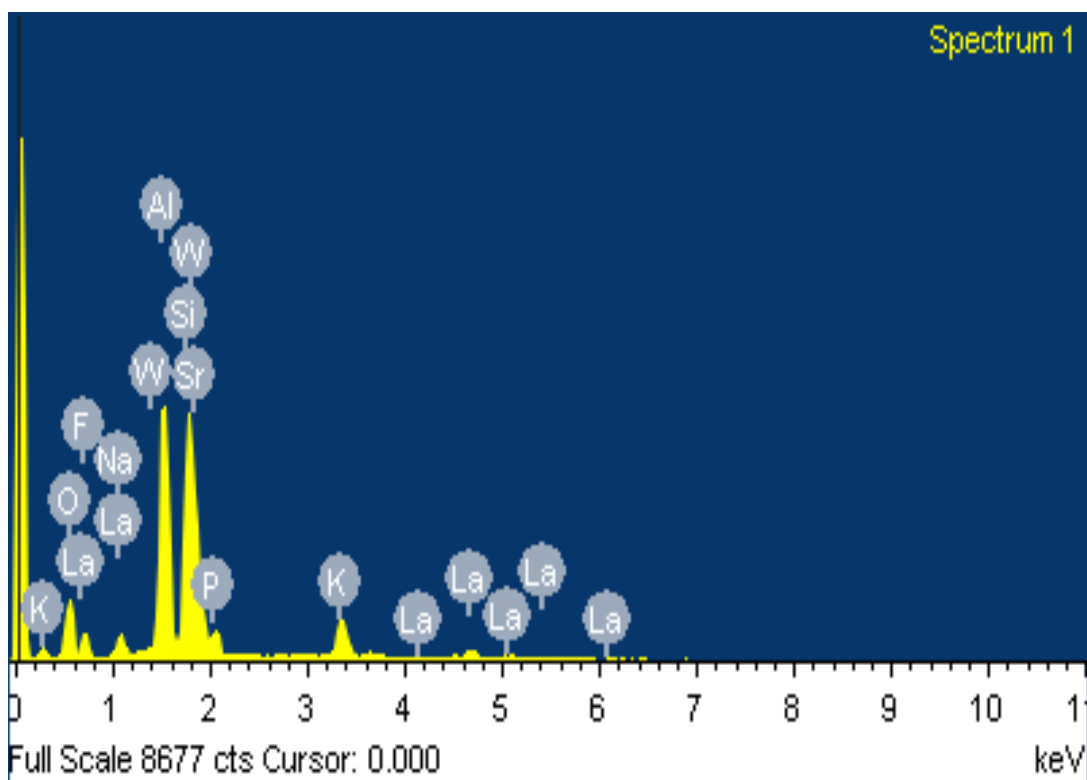


Figura 21. Mapa elemental de Equia Forte®

Element	Weight%	Atomic%
O K	24.43	40.27
F K	11.19	15.54
Na K	2.11	2.43
Al K	15.88	15.52
Si K	15.98	15.00
P K	3.27	2.79
K K	4.46	3.01
Sr L	12.93	3.89
La L	3.28	0.62
W M	6.47	0.93
Totals	100.00	

Tabla 4. Distribución en porcentajes de peso y átomos de Equia Forte®

5.10.2 Ionostar Molar®

La superficie de Ionostar Molar®, presentaba más irregularidades que la de Equia Forte® (Fig. 22). En cuanto a su composición química, la mayor proporción de elementos fueron de Carbono (C), Oxígeno (O), Silicio (Si) y estroncio (Sr) (Tabla 5). A diferencia de Equia Forte® la presencia de Flúor(F) fue muy baja.

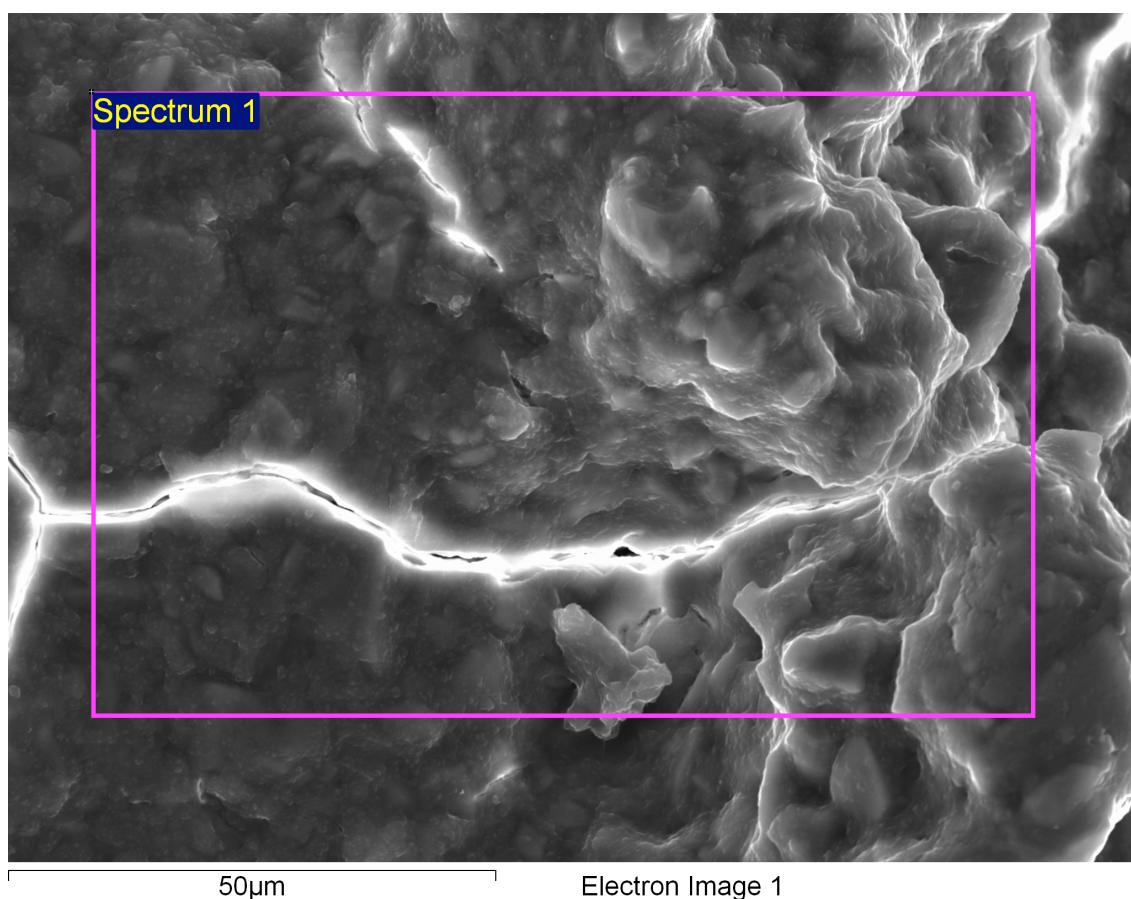


Figura 22. Observación de la superficie de Ionostar Molar®.

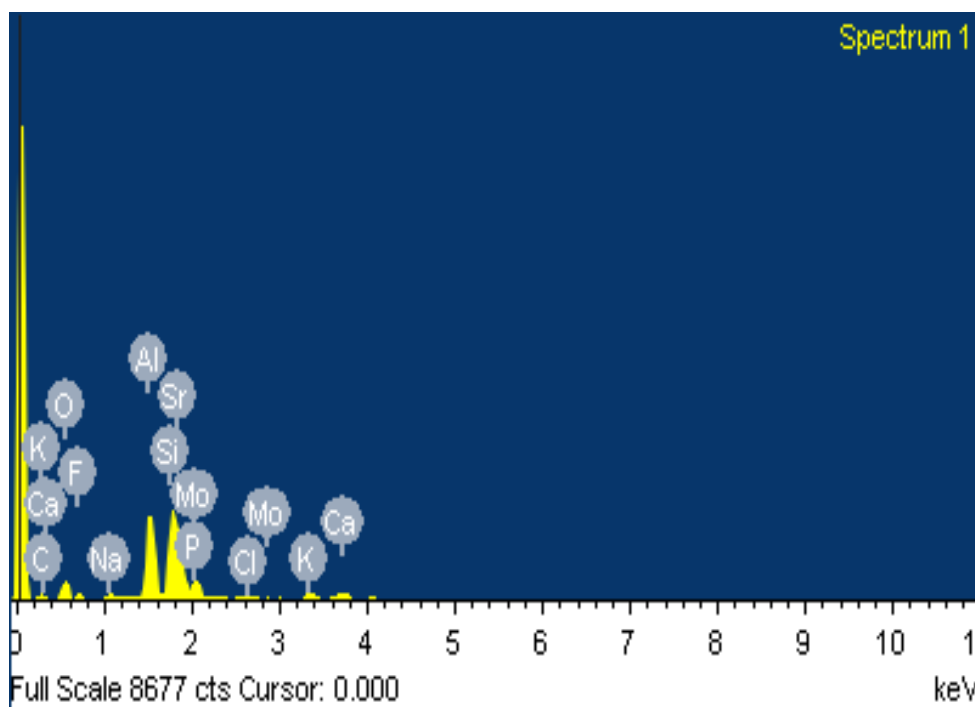


Figura 23. Mapa elemental de Ionostar Molar®.

Element	Weight%	Atomic%
C K	47.25	64.69
O K	17.88	18.38
F K	4.11	3.56
Na K	0.66	0.47
Al K	6.87	4.19
Si K	7.27	4.25
P K	2.69	1.43
Cl K	0.39	0.18
K K	1.01	0.42
Ca K	0.99	0.41
Sr L	10.05	1.89
Mo L	0.83	0.14
Totals	100.00	

Tabla 5. Distribución en porcentajes de peso y átomos de Ionostar Molar®

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1. SOBRE LOS MATERIALES

El Ionómero de vidrio es un material ampliamente utilizado en la práctica clínica desde hace varias décadas. Este hecho hace que se haya potenciado su desarrollo, apareciendo materiales que intentan mejorar sus propiedades como los cermets, los compómeros, los carbómeros de vidrio o los ionómeros de vidrio modificados con resina. Sobre estos últimos trata nuestro estudio (73).

Los ionómeros de vidrio modificados con resina presentan en su composición un monómero que destaca sobre los demás, el 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) que parece ser uno de los componentes que afecta más negativamente a la biocompatibilidad.

Hay una gran variabilidad de resultados respecto a la biocompatibilidad, y parece que cuando estos materiales se estudian “in vivo” tienen unos resultados mejores que cuando el estudio es “in vitro” (73).

Diversos estudios “in vivo” han demostrado que al aplicar diferentes ionómeros de vidrio, en los primeros días en contacto con los distintos tejidos se produce una reacción inflamatoria leve que disminuye o desaparece al cabo de 30 días. (69)

En el trabajo de Souza et al. (68) se observó el comportamiento de estos materiales sobre el tejido celular subcutáneo de ratas. Estos autores evidenciaron un proceso inflamatorio inicial debido a diferentes causas. El primer factor es el trauma quirúrgico que supone la colocación de los ionómeros de vidrio en el tejido celular subcutáneo, el segundo causante corresponde a la lenta reacción de endurecimiento ácido-base de los ionómeros, que ocasionan un bajo PH en esa zona, y por último se atribuye al HEMA ser el causante de la inflamación a distancia del sitio de colocación del material. En este estudio, los autores destacan que la inflamación inicial disminuye

a los 90 días, y se justifica debido a que el edema adyacente a los materiales neutraliza la toxicidad del bajo pH. En el caso del HEMA, debido a su bajo peso molecular, puede ser eliminado fácilmente por el drenaje linfático próximo a la zona, permitiendo obtener a los 90 días un tejido conectivo sano. Por todas estas razones, es por las que estos materiales, cuando son estudiados “in vivo” tienen una aceptable compatibilidad biológica, aun siendo irritantes leves para el complejo dentinopulpar.

La citotoxicidad de los materiales dentales es uno de los temas más estudiados actualmente, ya que todos los meses aparecen materiales nuevos que están en contacto con células de la cavidad oral. En la siguiente tabla (**Tabla 6**) podemos observar como hay una gran cantidad de estudios comprobando la biocompatibilidad de ionómeros de vidrio :

Autor y año	Título	Conclusiones
John W Nicholson (2008) (74)	The biocompatibility of resin – modified glass-ionomer cements for dentistry.	El HEMA puede llegar a ser citotóxico en determinadas ocasiones
Chen S (2016)(75)	Cytotoxicity of modified glass ionomer cement on odontoblast cells.	Los ionómeros de vidrio modificados con MTA presentan mejor biocompatibilidad que los modificados con resina
Michel A (2017)(76)	In vitro evaluation of different materials used for the treatment of extensive cervical root defect using human periodontal cells.	GC Fuji II puede ser considerado un material de elección para reabsorciones extensas con implicación estética.
Mohd Zainal Abidin (2015)(77)	Cytotoxicity of Fast-Set Conventional and Resin.modified Glass Ionomer Cement Polymerized at Different Times on SHED	La polimerización de 20 segundos mostró una viabilidad celular menos favorable que a 40 segundos.

Kanjevac T (2012)(78)	Cytotoxic effect of glass ionomer cements on human dental pulp stem cells correlate with fluoride release.	Los ionómeros que liberan menos flúor resultaron ser menos citotóxicos.
TamilSilvan S (2013)(79)	Biocompatibility of a conventional glass ionomer, ceramic reinforced glass ionomer, giomer and resin composite to fibroblasts: in vitro study	Los ionómeros de vidrio reforzados con cerámica tienen una biocompatibilidad superior a los ionómeros convencionales
Lan WH (2003)(80)	Cytotoxicity of conventional and modified glass ionomer cements.	No es recomendable aplicar directamente sobre la pulpa los ionómeros de vidrio modificados con resina.

Tabla 6. Estudios sobre biocompatibilidad de ionómeros de vidrio.

6.2. SOBRE LA METODOLOGÍA

Los estudios “in vitro” son uno de los métodos más útiles para la evaluación de los efectos biológicos de los diferentes biomateriales, y además nos aportan una serie de ventajas: la relación coste/efectividad, no requieren la utilización de animales de experimentación y la rapidez con que se realizan los estudios. Aunque no siempre las respuestas “in vitro” son extrapolables a las reacciones “in vivo” como hemos visto anteriormente, ya que las condiciones que pueden reproducirse “in vitro” son solo una parte de las que pueden representarse “in vivo”, aun así, los cultivos de células son modelos toxicológicos alternativos de gran sensibilidad (81).

Uno de los mayores beneficios del uso de cultivo de células madre, es la posibilidad de observar el comportamiento de tipos específicos de células vivas en un ambiente controlado (82). Por esta razón es por la que se ha diseñado el estudio con células humanas procedentes de pulpa dental. Como hemos observado en la literatura,

es imprescindible que los materiales que están en contacto con la pulpa o muy cercanos y no produzcan una reacción adversa de esta, ya que lo que buscamos con materiales de este tipo es ayudar a la pulpa ante una agresión externa que haya sufrido.

El aislamiento celular fue realizado mediante una técnica que combina disgregación enzimática y mecánica descrita por Seo y cols. (14) en vez de con la técnica de explante o cultivo ya que existe más riesgo de contaminación última del cultivo primario con esta. El recuento y la viabilidad celular se realizó con la cámara de Neubauer y el azul tripán, que es más sensible que usar el lector automático (TC20 Automatic Cell Counter de BioRad).

Como recomienda la Sociedad Internacional de Terapia Celular y con el objetivo de conocer la población celular con la que estamos trabajando, se llevó a cabo la identificación del tipo celular usado (83). La técnica utilizada fue la citometría de flujo, que se usa habitualmente para la identificación de marcadores que tienen diferentes líneas celulares. (84)

Los materiales usados en este trabajo fueron dos ionómeros de vidrio modificados con resina: **Equia Forte®** (Gc Dental, Tokyo, Japon), y **Ionostar Molar®** (Voco GmbH, Cuxhaven, Alemania). Los ionómeros de vidrio tienen diferencias tanto en su composición, como en las características y sus indicaciones. Para llevar a cabo el estudio se eligieron estos ionómeros que han aparecido en el mercado en los últimos años y sobre los que no existen estudios de citotoxicidad con células de la pulpa dental.

Para test de citotoxicidad “in vitro”, hemos usado el método indirecto de elución mediante extractos, siguiendo las normas ISO 10993(82) para estos test. Esta evaluación de biocompatibilidad es la que se usa comúnmente (85)(86) en vez de por contacto directo. Aunque según algunos autores, el ensayo de contacto material/célula, llamado test directo, replica mejor las condiciones que se dan “in vivo” (87). Nosotros, al tener en cuenta que no existen en los modelos experimentales

ninguna de las defensas que posee el organismo, podrían aparecer reacciones diferentes en forma y magnitud, con respecto a lo que ocurriría en la misma situación clínica. Además, también hemos realizado observación con microscopio de barrido, para evaluar la fijación de las células es decir, que hemos aplicado ambas técnicas (test indirecto + test directo).

Para cuantificar la proliferación celular en presencia de las diferentes diluciones de los materiales se utilizó la técnica MTT. Es la prueba básica de citotoxicidad *in vitro*, al ser una prueba de bajo coste, que aporta mucha información, muy sensible y que necesita poca cantidad de células para obtener los resultados. En el ámbito de los ionómeros de vidrio el MTT suele ser la prueba de elección en la mayoría de los artículos encontrados. (88)(89)(90)(91)(92)

El procedimiento para valorar la apoptosis celular, se realizó mediante citometría de flujo. Hay numerosas técnicas que nos permiten evaluar la apoptosis como podrían ser la inmunofluorescencia, la detección *in situ* mediante la técnica de TUNEL, el *western blot*, la electroforesis de ADN o la ya citada citometría de flujo (93)(81). Hemos usado la citometría de flujo ya que nos permite cuantificar mejor los valores obtenidos, además de que ya se ha usado en el campo dental por otros autores con buenos resultados (94).

Para evaluar la migración celular, realizamos la técnica de creación de una “herida” conocido como “wound healing”, en la que medimos como se recoloniza la zona dañada por las células(95). Esta técnica ya ha sido usada por otros investigadores para evaluar la capacidad de migración celular. Hemos considerado esta prueba fundamental ya que el Ionómero de vidrio en proximidad a la pulpa debe facilitar la migración celular y estimular la neoformación dentinaria. (96)

Otro aspecto que puede tener una repercusión en la biocompatibilidad de los ionómeros de vidrio es el fenómeno de la adhesión celular. Cuanto mayor sea la adhesión celular a un determinado material más efecto podría ejercer sobre las mismas. La técnica usada es un método con una relación coste/beneficio muy alta,

reproducible y un método sencillo. Esta técnica ha sido usada por otros autores para evaluar la capacidad de adhesión celular(96).

La morfología celular es otro de los parámetros a tener en cuenta, para saber cuál es su estado. Con la microscopia de barrido podemos detectar si las células están correctamente fijadas al disco, ya que poseen una morfología de tipo fibroblástica, mientras que una célula mal adherida o en estado de apoptosis tiene una morfología redondeada que termina despegándose del material y muriendo(97).

6.3. SOBRE LOS RESULTADOS

La biocompatibilidad y las propiedades antibacterianas de los nuevos materiales que están apareciendo en el mercado han sido objeto de numerosos estudios clínicos y experimentales. Los materiales de restauración deben provocar una respuesta apropiada en el huésped. Esto significa que los tejidos que se pongan en contacto con los materiales, no deben mostrar ninguna respuesta tóxica, irritante, inflamatoria, alérgica, genotóxica o carcinogénica. Los materiales que utilizamos para recubrimientos pulpaes o restauraciones deben actuar como una barrera que proteja la vitalidad del tejido pulpar recubriendo cualquier mínima exposición tisular posible para prevenir un futuro tratamiento endodóncico.

6.3.1. Relacionado con el aislamiento y la caracterización celular

El uso de células humanas dentales en estudio de citotoxicidad, permite poder extrapolar los resultados obtenidos in vitro a una posible situación clínica in vivo. Es por ello que hemos usado células humanas de pulpa dental procedentes de un cultivo primario. Al igual que otros autores, la forma de obtener fue mediante disgregación mecánica y enzimática, ya que existe evidencia de que es la forma más eficiente de obtener un cultivo primario (98).

Por otro lado, en situaciones de caries muy profundas, donde hay un espesor dentinario de 0.25 a 0.01 mm o pequeñas exposiciones pulpares, las células madre pulpares proliferan y migran hacia la herida con el fin de estimular la diferenciación odontoblástica(99). Así pues, consideramos relevante el uso de células procedentes de pulpa dental como línea de elección para tratamientos “in vitro” de citotoxicidad con ionómeros de vidrio.

Las células procedentes de la pulpa dental, frecuentemente fibroblastos y células mesenquimales indiferenciadas (MSCs), son capaces de crecer en placas de cultivo y han sido utilizadas para estudiar su diferenciación en células similares a los odontoblastos. Estas células han sido consideradas dentro de las células madre como células de origen mesenquimal(100). En nuestro estudio, encontramos que nuestras células expresaron los marcadores mesenquimales CD73, CD90 y CD105, con lo que cumplen los criterios para ser consideradas células madre de origen mesenquimal.

Miura y cols. evidenciaron que la pulpa dental remanente de dientes temporales exfoliados contenía una población células madre multipotentes, a las que denominaron “stem cells from human exfoliated deciduous teeth” (SHED). Verificaron que estas células expresaban los marcadores STRO-1 y CD146, que son marcadores de células madre mesenquimales, que habían sido encontrados previamente en células madre procedentes de la médula ósea y células madre procedentes de la pulpa dental de dientes permanentes. Las células madre procedentes de dientes primarios mostraron una proliferación celular mas alta que aquellas que procedían de dientes permanentes. Estos autores también confirmaron que las SHED parecen ser un tipo de células mas inmaduras que las DPSCS, presentando un gran índice de proliferación y potencial de diferenciación en múltiples líneas celulares(13).

En un estudio previo realizado por Insausti y cols., en el cual aislaron células mesenquimales procedentes de otras fuentes como la membrana amniótica o el tejido adiposo, encontraron resultados similares, presentando resultados positivos para los marcadores CD54,CD29,CD73,CD90,CD13,CD44,CD105 y CD106. Nuestros

resultados sugieren que los perfiles morfológicos y inmunofenotípicos de las DPSCs son similares a aquellos procedentes de las MSCs aisladas de médula ósea(101).

6.3.2. Relacionado con la viabilidad celular y la citotoxicidad

Un material que favorezca la viabilidad celular, favorecerá que las células puedan migrar para reparar la zona dañada(102). Es por ello que hemos usado el test de MTT para analizar la tasa de viabilidad celular. Además, como una de las funciones de la dentina es hacer de barrera de aquellos materiales que puedan difundir y llegar a dañar la pulpa(89), hemos realizado diferentes diluciones (1:1, 1:2 y 1:4) para intentar simular la situación clínica in vivo.

Chen y cols. compararon la toxicidad in vitro de ionómero de vidrio modificado con MTA con otros agentes utilizados como materiales para protección pulpar, como son el ionómero de vidrio convencional, MTA y ionómero de vidrio con wollastonita(75). Se utilizó alamarBlue para el ensayo de viabilidad celular. Los autores concluyeron que el MTA presentó los valores de toxicidad más bajos de los materiales evaluados, siendo el ionómero de vidrio convencional el que presentaba los valores más altos. En nuestro estudio Equia Forte® también presentó unos valores más altos de viabilidad celular.

En otro estudio se comparó si había diferencias de citotoxicidad entre un ionómero de vidrio convencional, un ionómero de vidrio reforzado con cerámica, un giómero y un composite. Se comprobó que el giómero que es un ionómero de vidrio pre-reaccionado en superficie y que libera únicamente 6 iones (flúor, sodio, estroncio, aluminio, silicato y borato), presentaba mejor citocompatibilidad que los demás. Además el ionómero de vidrio convencional, mostró peores tasas de viabilidad celular que el reforzado con cerámica(79).

Otro estudio comparó la viabilidad, adhesión y morfología celular de fibroblastos de ratón 3T3 en presencia de MTA, Biodentine™ y como control se usó un ionómero de vidrio (Fuji IX™). Para el estudio de la viabilidad celular se usó AlamarBlue. Se pudo

observar que tanto MTA como Biodentine™ exhibieron unas tasas de viabilidad celular adecuada mientras que Fuji IX™ obtuvo una reducida viabilidad celular (103).

Rodríguez y cols. evaluaron las diferencias de biocompatibilidad entre un ionómero de vidrio como es Ketac-Molar Easymix™ y un ionómero modificado con resina como es el Vitrebond™. Para dicho estudio se usaron fibroblastos gingivales humanos y se midieron las diferencias de viabilidad celular, alteraciones morfológicas y la presencia de calcio intracelular. Al igual que en nuestro estudio se valoró a las 72 horas de incubación con diferentes eluatos. Los resultados de este estudio muestran que Ketac-Molar Easymix™ mostró menos alteraciones en los fibroblastos gingivales humanos que Vitrebond™ (104).

También han sido comparados a nivel citotóxico como materiales de relleno apical Fuji II™, ProRoot MTA™, IRM™ y Ortho MTA™. Lee y cols., usando células de osteosarcoma MG-63, compararon la viabilidad celular y alteraciones morfológicas de estos cuatro materiales. Mediante el ensayo MTT determinaron que el material más citotóxico fue IRM™, seguido de Fuji II™ y Ortho MTA™. El material más biocompatible resultó ser ProRoot MTA™(105).

La adicción de nanopartículas a los ionómeros de vidrio convencionales, para mejorar sus propiedades antibacterianas, también ha provocado la aparición de estudios que han analizado cambios en su biocompatibilidad. Siqueira y cols. determinaron si la adicción de nanopartículas de plata a ionómeros de vidrio podría modificar la biocompatibilidad de dichos ionómeros(90). Para dicho estudio se usó el ensayo de MTT y azul de tripán y se utilizó la línea celular de odontoblastos MDPC-23. Al igual que nosotros se usaron extractos para determinar la viabilidad celular. Concluyeron que la adicción de nanopartículas de plata no mejoró la tasa de viabilidad celular de los ionómeros de vidrio.

La incorporación de cristales bioactivos en los ionómero de vidrio, también ha sido motivo de estudio, para evaluar una mejora en cuanto a la bioactividad y biocompatibilidad de estos materiales. Recientemente usando fibroblastos de piel se

ha analizado si la incorporación de los cristales bioactivos 45S5F y CF9 proporcionaba mejores propiedades fisicoquímicas y biológicas(106). La presencia de estos cristales favoreció la formación de una capa de apatita, que simultáneamente permitió una mejor respuesta celular en cuanto a proliferación.

La presencia de clorhexidina en los ionómeros de vidrio, también ha sido objeto de estudio en cuanto biocompatibilidad “in vitro”. Iz y cols. en un estudio con ionómeros de vidrio, evaluaron si la adicción de clorhexidina, proporcionaba mejor o peor tasas de viabilidad celular en los ionómeros de vidrio. Para este estudio usaron la línea celular murina L929. Al igual que nosotros, para el ensayo usaron el test de colorimetría MTT y obtuvieron que la adicción de clorhexidina al ionómero de vidrio, proporcionaba una peor tasa de crecimiento celular que si no lo incorporaba(107). Este estudio va en línea con el de Tu y cols. que pudieron comprobar que la clorhexidina a diferentes concentraciones es capaz de inhibir el crecimiento celular en células procedentes de dientes deciduos(108).

6.3.3. Relacionado con la migración celular

En este estudio se evaluó la migración celular de las DPSCs en presencia de los eluatos de dos ionómeros de vidrio. Equia Forte® mostró una migración celular muy buena a las 48h en relación a Ionostar Molar®, especialmente en la dilución 1:1, mientras que los eluatos de Ionostar Molar® estimularon en menor medida la migración celular de las DPSCs. Una de las limitaciones de este estudio es la ausencia de estudios con el mismo diseño para analizar la migración “in vitro”. Sin embargo, encontramos un estudio “in vivo” que tras implantar materiales de restauración analizan la capacidad migratoria de mastocitos y la formación de fibrosis. Usando ratas wistar, analizan la respuesta inmune e inflamatoria a tres materiales, como son una resina adhesiva, hidróxido de calcio y un ionómero de vidrio, evidenciando que el material con mejor respuesta fue el hidróxido de calcio, seguido del ionómero de vidrio y finalmente el adhesivo(109).

La técnica de wound healing o cierre de herida, es importante en aquellos materiales que se presuponen bioactivos, ya que facilitarán la reparación pulpar o formación de dentina, puesto que permitirán que las células madre migren para reparar la herida(110).

En otro estudio se evaluó la migración de células madre dentales con MTA, virutas de dentina y Bio-oss. Se realizaron cavidades en terceros molares extraídos mediante un molde y se llenaron con los diferentes materiales. Las células fueron sembradas sobre la superficie de la cavidad. Los autores concluyeron que tras 24h, tanto el MTA como las virutas de dentina promovían la migración de las células madre dentales, mientras que el Bio-Oss parecía inhibirla (111). Esto coincide con el estudio de D'Antó y cols, que observaron que el MTA favorecía la migración de las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (hMSCs), siendo ésta significativamente mayor que la encontrada con el cemento Portland(112).

6.3.4. Relacionado con la adhesión celular

En el presente estudio, el SEM mostró un nivel limitado de adhesión celular sobre los discos de Ionostar Molar®, mientras que Equia Forte® permitió una colonización celular extensa sobre sus discos, formando de esta manera, una monocapa celular que cubría la totalidad de la superficie.

La adhesión celular constituye un elemento de análisis en muchos estudios de citotoxicidad, incluyendo los de ionómeros de vidrio(99)(113)(114).

Subbarao y cols. observaron mediante microscopia electrónica de barrido, la adhesión de fibroblastos a ionómeros de vidrios impregnados con cristales bioactivos o con colágeno. Los autores concluyeron que la mejora de biocompatibilidad con la adición de cristales bioactivos o colágeno, fue dosis-dependiente. De tal modo que aquellos ionómeros de vidrio con 10% de cristales bioactivos, obtuvieron mejor adhesión celular que en otros ionómeros de vidrio con 0.01% de colágeno(113).

En otro estudio comparativo entre Geristore™ (ionómero de resina reforzado), MTA y ionómero de vidrio convencional, las PDLSCs mostraron adherencia a los discos tanto con MTA como con Geristore™. Las células sobre los materiales Geristore™ mostraron una apariencia similar a los fibroblastos con un citoesqueleto alargado((115).

Widbiller y cols. analizaron la adhesión celular entre los materiales Biodentine™, MTA, Ketac Molar™ y discos de dentina humana. Para este estudio usaron hDPSCs al igual que en nuestro estudio. Las tasas de mayor adhesión celular la obtuvieron con Biodentine™ y MTA, mientras que las más bajas fueron con Ketac Molar™ y discos de dentina humana(116).

6.3.5. Relacionado con la morfología celular

La adhesión celular y la migración requieren de la reorganización del citoesqueleto y la de expresión de la molécula de adhesión focal. Por lo tanto, el estado óptimo de las células de la pulpa dental es un aspecto crítico que contribuye a la migración celular y finalmente a la reparación de la pulpa dental(110)(117)(118). En el presente estudio, la tinción por inmunofluorescencia reveló que los extractos no diluidos exhibían diversas características morfológicas y patrones de organización del citoesqueleto cuando las células de hDPSCs se trataban con diferentes materiales. De hecho, en presencia del extracto sin diluir Equia Forte® las células mantenían la organización del citoesqueleto y presentaban un número de prolongaciones numerosas, mientras que en presencia de Ionostar Molar® la morfología de las células fue más redondeada y en menor número. Estos resultados obtenidos son acordes con lo visto con el microscopio electrónico de barrido, de tal modo que tanto por contacto directo (discos) como indirecto (eluatos) el patrón de biocompatibilidad de estos materiales sobre las hDPSCs se mantiene.

Pontes y cols. determinaron que los ionómeros de vidrio modificados con resina sobre las líneas HDPSCs y de odontoblastos provocaban mayores alteraciones morfológicas, que en el caso de cemento de resina convencional o de autograbado(119).

Aranha y cols evaluaron la reacción celular a VitrebondTM y Fuji lining LC. Analizaron con el microscopio electrónico de barrido el aspecto de cultivos de odontoblastos “inmortalizados” incubados en presencia de los materiales durante distintos periodos de tiempo. Observaron que las células incubadas con Fuji Lining LC presentaron una morfología normal (planas y adheridas al cemento), lo cual demuestra la biocompatibilidad del cemento, mientras que con VitrebondTM, las células aparecen redondeadas y en menor número, lo que indica mayor toxicidad de este último material(120).

6.3.6. Relacionado con la caracterización de la superficie de los materiales y de los extractos

Debido a la composición de estos materiales y su posible influencia en la citotoxicidad de los hDPSCs, se analizó la composición química de la superficie de los materiales establecidos. La evaluación del pH y la liberación iónica de los eluatos también se llevó a cabo. Pensamos que esta investigación debe realizarse, puesto que puede haber una diferencia en la respuesta celular cuando se compara la interacción celular con eluatos versus material superficial(121)(122). Hay estudios previos i que los iones de silicio abundantes podrían ser liberados de las biocerámicas basadas en silicato cálcico tras la exposición a un ambiente acuoso, y mejorar significativamente el desempeño biológico de los osteoblastos y las células del ligamento periodontal(123).

Con el fin de comprender las razones que podrían causar la diferencia de citotoxicidad entre Equia Forte® e Ionostar Molar®, se examinaron dos factores: el pH y las concentraciones iónicas de los extractos provenientes de los discos de ionómeros. Aunque Ionostar Molar® y Equia Forte® mostraron un pH más bajo frente al control, el

valor estaba todavía por encima de 6,6. Estudios previos han demostrado que un pH entre 6 y 7 no conduce a la muerte celular significativa de fibroblastos gingivales humanos durante las tres primeras horas de exposición(124). Otro estudio mostró que la variación del pH entre seis y siete no afecta significativamente a la viabilidad de los fibroblastos y osteoblastos después de 1 y 7 días (75). Por lo tanto, el pH ligeramente inferior causado por el ionómero de vidrio no debería ser señalado como la razón principal de la baja viabilidad celular entre los extractos de Ionostar Molar®.

Con respecto a las concentraciones de iones presentes en el medio de los extractos, mediante la espectrometría de masas analizamos la presencia de los iones Ca, Si, Sr y P. Estudios previos han demostrado que la presencia en materiales dentales de algunos iones como el cinc (Zn), podrían estar relacionados con una mayor citotoxicidad(125). Diferentes autores han sugerido que la presencia de Calcio (Ca) juega un rol importante en la adhesión celular (126). En ambos materiales, la presencia de Ca fue baja en los extractos, lo cual hace suponer a priori que la biocompatibilidad tanto de Equia Forte® como de Ionostar Molar® pudiera verse comprometida, aunque como hemos podido comprobar, la citocompatibilidad de Equia Forte® fue bastante mejor que la de Ionostar Molar®.

En relación a la concentración del ión Sr, un estudio previo demostró que concentraciones menores de 880 mg/L no resultaban ser tóxicas (127). En nuestro estudio, la concentración de P y Sr estaban muy por debajo de 880mg/L con lo que no parecen ser la causa de la posible peor citocompatibilidad de Ionostar Molar®.

Por lo tanto, la citotoxicidad de los ionómeros de vidrio es poco probable que sea causada por estos iones inorgánicos. En consecuencia, se puede aventurar que los efectos citotóxicos de ionómeros de vidrio pudieran ser causados por compuestos orgánicos liberados por estos productos(80). De tal modo que la concentración de compuestos orgánicos en los extractos, así como su umbral de citotoxicidad para las células dentales, debería evaluarse en futuros estudios.

Para analizar la superficie de los dos ionómeros, se eligió la espectrometría dispersiva de rayos X (EDX). Esta técnica es fiable, precisa y reproducible para analizar los diferentes compuestos de un material o de una mezcla(128)(129). La identificación de la mayoría de elementos del material es importante para comprender las propiedades físicas, químicas, mecánicas y en nuestro caso las biológicas. Sin embargo este método presenta limitaciones con aquellos elementos de bajo peso molecular(130)(131)(132). La proporción de eventos ionizantes que resultan en la emisión de rayos X disminuye a medida que el número atómico del elemento se hace más pequeño. Por lo tanto, la cuantificación de compuestos orgánicos, que tienen carbono, hidrógeno y oxígeno, no se puede realizar con precisión (133).

No existen demasiados estudios que analicen los componentes de ionómeros de vidrio. En nuestro estudio, los dos ionómeros presentaron principalmente Si, Al, Sr y O, pero con diferentes proporciones. Yap y cols. caracterizaron el polvo del ionómero de alta viscosidad (fast-set) (Fuji IX GP Fast y Fuji IX GP) con respecto al tamaño de partícula, distribución de tamaño y composición(134). El análisis EDX reveló que los tres elementos principales presentes en Fuji IX GP Fast fueron oxígeno (66,75%), silicio (13,18%) y aluminio (12,82%). En nuestro estudio la proporción de oxígeno fue 24,43% para Equia Forte® y 47,25 para Ionostar Molar® ; la presencia de Silicio fue de 15,98% para Equia Forte® y 7,27% para Ionostar Molar®. En cambio se detectó aluminio en un porcentaje de 15,88 para Equia Forte® y 7,87 para Ionostar Molar®.

La capacidad del ionómero para liberar Flúor (F), ha sido el gran motivo, para que los ionómeros de vidrio se usen cada vez más en la odontología(135). Estudios previos han documentado el efecto protector de caries resultante la liberación de F a largo plazo. La incorporación de fluoruro al ionómero de vidrio, además del efecto protector de la caries, mejora su resistencia y sus propiedades de manejo(136)(106)(78)(137)(138)(135). Idealmente, el flúor debe liberarse constantemente en pequeñas cantidades para proporcionar niveles altos y consistentes(139). En el presente estudio, el componente F fue detectado en un 11,19% en el caso de Equia Forte® y un 4,11 en Ionostar Molar®.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. El método de evaluación “in vitro” propuesto, constituye un sistema experimental idóneo para evaluar la citotoxicidad de los ionómeros de vidrio “in vitro”.
2. La viabilidad celular fue mayor en presencia de Equia Forte® que con Ionostar Molar®, principalmente en la dilución (1:1).
3. Ionostar Molar® y Equia Forte® no producen apoptosis y mantienen el fenotipo de las células madre de pulpa dental.
4. La migración celular fue significativamente menor con Ionostar Molar® que con Equia Forte®.
5. La morfología de las células sembradas sobre Equia Forte® fue correcta. Ionostar Molar® presentó una fijación celular muy limitada, sugiriendo afectación de la viabilidad.
6. La adhesión celular fue significativamente mayor a Equia Forte que a Ionostar Molar®.
7. La hipótesis nula se cumple parcialmente, ya que Equia Forte® no produce citotoxicidad, pero Ionostar Molar® sí presenta un cierto grado citotoxicidad sobre células madre de pulpa dental.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFIA

1. Carda C, Peydró A. Ultrastructural patterns of human dentinal tubules, odontoblasts processes and nerve fibres. *Tissue Cell*. 2006;38(2):141-50.
2. Studervant C. *Operatoria Dental. Arte y Ciencia*. Tercera Edición. Mosby; 1996. 18-28 p.
3. Hebling J CC. Biología del Complejo Dentino-Pulpar en relación a su protección mediante Adhesivos. *Adhesión En Odontología Restauradora*. Primera Edición. Curitiba, Brasil: MAIO; 2003. 162-193 p.
4. Pashley DH. The effects of acid etching on the pulpodentin complex. *Oper Dent*. 1992;17(6):229-42.
5. Fitzgerald M. Cellular mechanics of dentinal bridge repair using 3H-thymidine. *J Dent Res*. 1979;58(Spec Issue D):2198-206.
6. de Ferraris MEG, Muñoz AC. Histologa, embriologa e ingeniera tisular bucodental/Histology, embryology and oral tissue engineering [Internet]. Ed. Médica Panamericana; 2009
7. Nowicka A, Łagocka R, Lipski M, Parafiniuk M, Grocholewicz K, Sobolewska E, et al. Clinical and Histological Evaluation of Direct Pulp Capping on Human Pulp Tissue Using a Dentin Adhesive System. *BioMed Res Int* 2016;2016:2591273.
8. Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*. 2008;132(4):567-82.
9. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000;100(1):157-68.
10. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
11. Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2009;114:185-99.
12. Gronthos S, Mankani M, Brahimi 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.

13. 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.
14. Seo B-M, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004;364(9429):149-55.
15. Rodríguez-Lozano F-J, Insausti C-L, Iniesta F, Blanquer M, Ramírez M-C, Meseguer L, et al. Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012;17(6):e1062-7.
16. Morsczeck 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.
17. Morsczeck 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.
18. Morsczeck 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 J Int Soc Matrix Biol*. 2005;24(2):155-65.
19. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo B-M, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PloS One*. 2006;1:e79.
20. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of Apical Papilla and its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth –A Pilot Study. *J Endod*. 2008;34(2):166-71.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.

25. Davies LC, Locke M, Webb RDJ, 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.

26. 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.

27. Murdoch-Kinch CA, McLean ME. Minimally invasive dentistry. *J Am Dent Assoc* 1939. 2003;134(1):87-95.

28. Ericson D. The concept of minimally invasive dentistry. *Dent Update.* 2007;34(1):9-10, 12-4, 17-8.

29. Tyas MJ, Anusavice KJ, Frencken JE, Mount GJ. Minimal intervention dentistry--a review. FDI Commission Project 1-97. *Int Dent J.* 2000;50(1):1-12.

30. Paris S, Meyer-Lueckel H. Masking of labial enamel white spot lesions by resin infiltration--a clinical report. *Quintessence Int* 2009;40(9):713-8.

31. Yamaguchi K, Miyazaki M, Takamizawa T, Inage H, Moore BK. Effect of CPP-ACP paste on mechanical properties of bovine enamel as determined by an ultrasonic device. *J Dent.* 2006;34(3):230-6.

32. Oshiro M, Yamaguchi K, Takamizawa T, Inage H, Watanabe T, Irokawa A, et al. Effect of CPP-ACP paste on tooth mineralization: an FE-SEM study. *J Oral Sci.* 2007;49(2):115-20.

33. Paris S, Schwendicke F, Seddig S, Müller W-D, Dörfer C, Meyer-Lueckel H. Micro-hardness and mineral loss of enamel lesions after infiltration with various resins: influence of infiltrant composition and application frequency in vitro. *J Dent.* 2013;41(6):543-8.

34. Paris S, Hopfenmuller W, Meyer-Lueckel H. Resin infiltration of caries lesions: an efficacy randomized trial. *J Dent Res.* 2010;89(8):823-6.

35. Mejäre I, Källest I C, Stenlund H. Incidence and progression of approximal caries from 11 to 22 years of age in Sweden: A prospective radiographic study. *Caries Res.* 1999;33(2):93-100.

36. Mueller J, Meyer-Lueckel H, Paris S, Hopfenmuller W, Kielbassa AM. Inhibition

of lesion progression by the penetration of resins in vitro: influence of the application procedure. *Oper Dent*. 2006;31(3):338-45.

37. Meyer-Lueckel H, Paris S, Kielbassa AM. Surface layer erosion of natural caries lesions with phosphoric and hydrochloric acid gels in preparation for resin infiltration. *Caries Res*. 2007;41(3):223-30.

38. Olegário IC, Hesse D, Bönecker M, Imparato JCP, Braga MM, Mendes FM, et al. Effectiveness of conventional treatment using bulk-fill composite resin versus Atraumatic Restorative Treatments in primary and permanent dentition: a pragmatic randomized clinical trial. *BMC Oral Health*. 2016;17(1):34.

39. Smales RJ, Yip H-K. The atraumatic restorative treatment (ART) approach for the management of dental caries. *Quintessence Int* 2002;33(6):427-32.

40. Frencken JE, Holmgren CJ. How effective is ART in the management of dental caries? *Community Dent Oral Epidemiol*. 1999;27(6):423-30.

41. Tedesco TK, Calvo AFB, Lenzi TL, Hesse D, Guglielmi CAB, Camargo LB, et al. ART is an alternative for restoring occlusoproximal cavities in primary teeth - evidence from an updated systematic review and meta-analysis. *Int J Paediatr Dent*. 2017;27(3):201-9.

42. ISO 9917–1: Dental Water Based Cements; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2003.

43. McLean JW, Nicholson JW, Wilson AD. Proposed nomenclature for glass-ionomer dental cements and related materials. *Quintessence Int* 1994;25(9):587-9.

44. Wilson AD, Kent BE, Mesley RJ, Miller RP, Clinton D, Fletcher KE. Formation of dental silicate cement. *Nature*. 1970;225(5229):272-3.

45. Chemistry of Glass-Ionomer Cements: A Review 1998 Mar;19(6):485-94.46.
Wilson AD, Kent BE. Dental silicate cements. IX. Decomposition of the powder. *J Dent Res*. 1970;49(1):7-13.

47. Crisp S, Lewis BG, Wilson AD. Glass ionomer cements: chemistry of erosion. *J Dent Res*. 1976;55(6):1032-41.

48. McLean JW, Wilson AD. The clinical development of the glass-ionomer cement. III. The erosion lesion. *Aust Dent J*. 1977;22(3):190-5.

49. McLean JW, Gasser O. Glass-cermet cements. *Quintessence Int* 1985;16(5):333-43.

50. Chung KH. The properties of metal-reinforced glass ionomer materials. *J Oral Rehabil.* 1993;20(1):79-87.
51. Cattani-Lorente MA, Godin C, Meyer JM. Early strength of glass ionomer cements. *Dent Mater.* 1993;9(1):57-62.
52. Xu HH, Eichmiller FC, Antonucci JM, Schumacher GE, Ives LK. Dental resin composites containing ceramic whiskers and precured glass ionomer particles. *Dent Mater* 2000;16(5):356-63.
53. Mukai M, Ikeda M, Yanagihara T, Hara G, Kato K, Nakagaki H, et al. Fluoride uptake in human dentine from glass-ionomer cement in vivo. *Arch Oral Biol.* 1993;38(12):1093-8.
54. Inokoshi S, Burrow MF, Kataumi M, Yamada T, Takatsu T. Opacity and color changes of tooth-colored restorative materials. *Oper Dent.* 1996;21(2):73-80.
55. Panagiotouni E, Karanika-Kouma A. Comparative study of heat release of various cement base materials during their setting. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol.* 1995;38(1-2):45-50.
56. Brantley WA, Kerby RE. Thermal diffusivity of glass ionomer cement systems. *J Oral Rehabil.* 1993;20(1):61-8.
57. Patil SG, Sajjan MS, Patil R. The effect of temperature on compressive and tensile strengths of commonly used luting cements: an in vitro study. *J Int Oral Health JIOH.* 2015;7(2):13-9.
58. Miyazaki M, Iwasaki K, Soyamura T, Onose H, Moore BK. Resin-modified glass ionomers: dentin bond strength versus time. *Oper Dent.* 1998;23(3):144-9.
59. Berg JH. The continuum of restorative materials in pediatric dentistry--a review for the clinician. *Pediatr Dent.* 1998;20(2):93-100.
60. Croll TP, Berg J. Simplified adhesion of compomers in pediatric dentistry. *Quintessence Int* 2000;31(8):563-9.
61. Cehreli SB, Tirali RE, Yalcinkaya Z, Cehreli ZC. Microleakage of newly developed glass carbomer cement in primary teeth. *Eur J Dent.* 2013;7(1):15-21.
62. Zainuddin N, Karpukhina N, Law RV, Hill RG. Characterisation of a remineralising Glass Carbomer® ionomer cement by MAS-NMR spectroscopy. *Dent Mater* 012;28(10):1051-8.
63. Tanthanuch S, Kukiattrakoon B, Siriporananon C, Ornprasert N, Mettasitthikorn

W, Likhitpreeda S, et al. The effect of different beverages on surface hardness of nanohybrid resin composite and giomer. *J Conserv Dent* 2014;17(3):261-5.

64. Tamilselvam S, Divyanand MJ, Neelakantan P. Biocompatibility of a conventional glass ionomer, ceramic reinforced glass ionomer, giomer and resin composite to fibroblasts: in vitro study. *J Clin Pediatr Dent*. 2013;37(4):403-6.

65. Tronstad L, Wennberg A. In vitro assessment of the toxicity of filling materials. *Int Endod J*. 1980;13(3):131-8. 2005;12(1):25-38.

67. Gibb S. Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy. *Reprod Toxicol Elmsford N*. 2008;25(1):136-8.

68. Souza PPC, Aranha AMF, Hebling J, Giro EMA, Costa CA de S. In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements. *Dent Mater* 2006;22(9):838-44.

69. Six N, Lasfargues JJ, Goldberg M. In vivo study of the pulp reaction to Fuji IX, a glass ionomer cement. *J Dent*. 2000;28(6):413-22.

70. Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL. Cytotoxicity of endodontic materials. *J Endod*. 1998;24(2):91-6.

71. Moharamzadeh K, Brook IM, Van Noort R. Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. *Materials*. 2009;2(2):514-48.

72. Browne RM. The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials--does it have a role? *Int Endod J*. 1988;21(2):50-8.

73. Oilo G. Luting cements: a review and comparison. *Int Dent J*. 1991;(11):134.

74. Nicholson JW, Czarnecka B. The biocompatibility of resin-modified glass-ionomer cements for dentistry. *Dent Mater* 2008;24(12):1702-8.

75. Chen S, Mestres G, Lan W, Xia W, Engqvist H. Cytotoxicity of modified glass ionomer cement on odontoblast cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2016;27(7):116.

76. Mohd Zainal Abidin R, Luddin N, Shamsuria Omar N, Mohamed Aly Ahmed H. Cytotoxicity of Fast-set Conventional and Resin-modified Glass Ionomer Cement Polymerized at Different Times on SHED. *J Clin Pediatr Dent*. 2015;39(3):235-40.

77. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res*. 2005;8(3):191-9.

78. Kanjevac T, Milovanovic M, Volarevic V, Lukic ML, Arsenijevic N, Markovic D,

- et al. Cytotoxic effects of glass ionomer cements on human dental pulp stem cells correlate with fluoride release. *Med Chem Shariqah United Arab Emir*. 2012;8(1):40-5.
79. Tamilselvam S, Divyanand MJ, Neelakantan P. Biocompatibility of a conventional glass ionomer, ceramic reinforced glass ionomer, giomer and resin composite to fibroblasts: in vitro study. *J Clin Pediatr Dent*. 2013;37(4):403-6.
 80. Lan W-H, Lan W-C, Wang T-M, Lee Y-L, Tseng W-Y, Lin C-P, et al. Cytotoxicity of conventional and modified glass ionomer cements. *Oper Dent*. 2003;28(3):251-9.
 81. Rodríguez-Lozano FJ, Serrano-Belmonte I, Pérez Calvo JC, Coronado-Parra MT, Bernabeu-Eslapez 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.
 82. ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices. Part 5. Test for in vitro cytotoxicity. 2009.
 83. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
 84. Rodríguez-Lozano FJ, García-Bernal D, Ros-Roca M de LÁ, Algueró M del C, Oñate-Sánchez RE, Camacho-Alonso F, et al. Cytoprotective effects of melatonin on zoledronic acid-treated human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cranio-Maxillo-fac Surg* 2015;43(6):855-62.
 85. Bin CV, Valera MC, Camargo SEA, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2012;38(4):495-500.
 86. Silva EJNL, Rosa TP, Herrera DR, Jacinto RC, Gomes BPFA, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. *J Endod*. 2013;39(2):274-7.
 87. Cao T, Saw TY, Heng BC, Liu H, Yap AUJ, Ng ML. Comparison of different test models for the assessment of cytotoxicity of composite resins. *J Appl Toxicol JAT*. 05;25(2):101-8.
 88. Moshaverinia M, Borzabadi-Farahani A, Sameni A, Moshaverinia A, Ansari S. Effects of incorporation of nano-fluorapatite particles on microhardness, fluoride releasing properties, and biocompatibility of a conventional glass ionomer cement

(GIC). Dent Mater J. 2016;35(5):817-21.

89. Jiang RD, Lin H, Zheng G, Zhang XM, Du Q, Yang M. In vitro dentin barrier cytotoxicity testing of some dental restorative materials. J Dent. 2017;58:28-33.

90. Siqueira P-C, Magalhães A-P-R, Pires W-C, Pereira F-C, Silveira-Lacerda E-P, Carrião M-S, et al. Cytotoxicity of glass ionomer cements containing silver nanoparticles. J Clin Exp Dent. 2015;7(5):e622-627.

91. da Fonseca Roberti Garcia L, Pontes ECV, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA, Soares DG. Transdental cytotoxicity of resin-based luting cements to pulp cells. Clin Oral Investig. 2016;20(7):1559-66.

92. Trumpaite-Vanagiene R, Bukelskiene V, Aleksejuniene J, Puriene A, Baltriukiene D, Rutkunas V. Cytotoxicity of commonly used luting cements -An in vitro study. Dent Mater J. 2015;34(3):294-301.

93. Meehan TL, Yalonetskaya A, Joudi TF, McCall K. Detection of Cell Death and Phagocytosis in the Drosophila Ovary. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2015;1328:191-206.

94. Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Ortolani-Seltenerich PS, Álvarez-Muro T, Lozano A, et al. Cytotoxicity and bioactivity of various pulpotomy materials on stem cells from human exfoliated primary teeth. Int Endod J. 2017.

95. Weinreb M, Nemcovsky CE. In vitro models for evaluation of periodontal wound healing/regeneration. Periodontol 2000. 2015;68(1):41-54.

96. Zhu L, Yang J, Zhang J, Peng B. A comparative study of BioAggregate and ProRoot MTA on adhesion, migration, and attachment of human dental pulp cells. J Endod. 2014;40(8):1118-23.

97. Güven EP, Yalvaç ME, Kayahan MB, Sunay H, Şahin F, Bayirli G. Human tooth germ stem cell response to calcium-silicate based endodontic cements. J Appl Oral Sci Rev FOB. 2013;21(4):351-7.

98. Viña-Almunia J, Borrás C, Gambini J, El Alamy M, Peñarrocha M, Viña J. Influence of different types of pulp treatment during isolation in the obtention of human dental pulp stem cells. Med Oral Patol Oral Cirugia Bucal. 79. 2016;1;21(3).

99. Lutfi AN, Kannan TP, Fazliah MN, Jamaruddin MA, Saidi J. Proliferative activity of cells from remaining dental pulp in response to treatment with dental materials. Aust Dent J. 2010;55(1):79-85.

100. Rodríguez-Lozano FJ, Bueno C, Insausti CL, Meseguer L, Ramírez MC, Blanquer M, et al. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *Int Endod J*. 2011;44(9):800-6.
101. Insausti CL, Blanquer M, Bleda P, Iniesta P, Majado MJ, Castellanos G, et al. The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histol Histopathol*. 2010;25(1):91-8.
102. Nikfarjam F, Beyer K, König A, Hofmann M, Butting M, Valesky E, et al. Influence of Biodentine® - A Dentine Substitute - On Collagen Type I Synthesis in Pulp Fibroblasts In Vitro. *PLoS One*. 2016;11(12):e0167633.
103. Corral Nuñez CM, Bosomworth HJ, Field C, Whitworth JM, Valentine RA. Biodentine and mineral trioxide aggregate induce similar cellular responses in a fibroblast cell line. *J Endod*. 2014;40(3):406-11.
104. Rodríguez IA, Ferrara CA, Campos-Sánchez F, Alaminos M, Echevarría JU, Campos A. An in vitro biocompatibility study of conventional and resin-modified glass ionomer cements. *J Adhes Dent*. 2013;15(6):541-6.
105. Lee B-N, Son H-J, Noh H-J, Koh J-T, Chang H-S, Hwang I-N, et al. Cytotoxicity of newly developed ortho MTA root-end filling materials. *J Endod*. 2012;38(12):1627-30.
106. De Caluwé T, Vercruysse CWJ, Ladik I, Convents R, Declercq H, Martens LC, et al. Addition of bioactive glass to glass ionomer cements: Effect on the physico-chemical properties and biocompatibility. *Dent Mater* 2017;33(4):e186-203.
107. Iz SG, Ertugrul F, Eden E, Gurhan SID. Biocompatibility of glass ionomer cements with and without chlorhexidine. *Eur J Dent*. 2013;7(Suppl 1):S89-93.
108. Tu Y-Y, Yang C-Y, Chen R-S, Chen M-H. Effects of chlorhexidine on stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi*. 2015;114(1):17-22.
109. Mussel RLDO, De Sá Silva E, Costa AMA, Mandarim-De-Lacerda CA. Mast cells in tissue response to dentistry materials: an adhesive resin, a calcium hydroxide and a glass ionomer cement. *J Cell Mol Med*. 2003;7(2):171-8.
110. Lv F, Zhu L, Zhang J, Yu J, Cheng X, Peng B. Evaluation of the in vitro biocompatibility of a new fast-setting ready-to-use root filling and repair material. *Int Endod J*. 2016;
111. Lymperi S, Taraslia V, Tsatsoulis IN, Samara A, Velentzas AD, Agrafioti A, et al. Dental Stem Cell Migration on Pulp Ceiling Cavities Filled with MTA, Dentin Chips, or

Bio-Oss. *BioMed Res Int.* 2015;2015:189872.

112. D'Antò V, Di Caprio MP, Ametrano G, Simeone M, Rengo S, Spagnuolo G. Effect of mineral trioxide aggregate on mesenchymal stem cells. *J Endod.* 2010;36(11):1839-43.

113. Subbarao C, Neelakantan P, Subbarao CV. In vitro biocompatibility tests of glass ionomer cements impregnated with collagen or bioactive glass to fibroblasts. *J Clin Pediatr Dent.* 2012;36(3):269-74.

114. Müller J, Bruckner G, Kraft E, Hörz W. Reaction of cultured pulp cells to eight different cements based on glass ionomers. *Dent Mater* 1990;6(3):172-7.

115. Gupta SK, Saxena P, Pant VA, Pant AB. Adhesion and biologic behavior of human periodontal fibroblast cells to resin ionomer Geristore: a comparative analysis. *Dent Traumatol Off Publ Int Assoc Dent Traumatol.* 2013;29(5):389-93.

116. Widbiller M, Lindner SR, Buchalla W, Eidt A, Hiller K-A, Schmalz G, et al. Three-dimensional culture of dental pulp stem cells in direct contact to tricalcium silicate cements. *Clin Oral Investig.* 2016;20(2):237-46.

117. Zhang J, Zhu LX, Cheng X, Lin Y, Yan P, Peng B. Promotion of Dental Pulp Cell Migration and Pulp Repair by a Bioceramic Putty Involving FGFR-mediated Signaling Pathways. *J Dent Res.* 2015;94(6):853-62.

118. Zhu L, Yang J, Zhang J, Lei D, Xiao L, Cheng X, et al. In vitro and in vivo evaluation of a nanoparticulate bioceramic paste for dental pulp repair. *Acta Biomater.* 2014;10(12):5156-68.

119. Pontes ECV, Soares DG, Hebling J, Costa CADS. Cytotoxicity of resin-based luting cements to pulp cells. *Am J Dent.* 2014;27(5):237-44.

120. Aranha AMF, Giro EMA, Souza PPC, 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.

121. Gong V, França R. Nanoscale chemical surface characterization of four different types of dental pulp-capping materials. *J Dent.* 2017;58:11-8.

122. Schembri-Wismayer P, Camilleri J. Why Biphasic? Assessment of the Effect on Cell Proliferation and Expression. *J Endod.* 2017;

123. Zhou H, Du T, Shen Y, Wang Z, Zheng Y, Haapasalo M. In vitro cytotoxicity of calcium silicate-containing endodontic sealers. *J Endod.* 2015;41(1):56-61.

124. Lan WC, Lan WH, Chan CP, Hsieh CC, Chang MC, Jeng JH. The effects of extracellular citric acid acidosis on the viability, cellular adhesion capacity and protein synthesis of cultured human gingival fibroblasts. *Aust Dent J.* 1999;44(2):123-30.
125. Lee J-H, Lee H-H, Kim K-N, Kim K-M. Cytotoxicity and anti-inflammatory effects of zinc ions and eugenol during setting of ZOE in immortalized human oral keratinocytes grown as three-dimensional spheroids. *Dent Mater Off Publ Acad Dent Mater.* 2016;32(5):e93-104.
126. Akbulut MB, Uyar Arpacı P, Unverdi Eldeniz A. «Effects of novel root repair materials on attachment and morphological behaviour of periodontal ligament fibroblasts: Scanning electron microscopy observation». *Microsc Res Tech.* 2016;79(12):1214-21.
127. Stanislawski L, Daniau X, Lauti A, Goldberg M. Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements. *J Biomed Mater Res.* 1999;48(3):277-88.
128. Collado-González M, Tomás-Catalá CJ, Oñate-Sánchez RE, Moraleta JM, Rodríguez-Lozano FJ. Cytotoxicity of GuttaFlow Bioseal, GuttaFlow2, MTA Fillapex, and AH Plus on Human Periodontal Ligament Stem Cells. *J Endod.*; 2017;43(5):816-822.
129. Dammaschke T, Gerth HUV, Züchner H, Schäfer E. Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. *Dent Mater Off Publ Acad Dent Mater.* 2005;21(8):731-8.
130. Gandolfi MG, Sauro S, Mannocci F, Watson TF, Zanna S, Capoferri M, et al. New tetrasilicate cements as retrograde filling material: an in vitro study on fluid penetration. *J Endod.* j 2007;33(6):742-5.
131. Islam I, Chng HK, Yap AUJ. X-ray diffraction analysis of mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Int Endod J.* marzo de 2006;39(3):220-5.
132. Khan S, Kaleem M, Fareed MA, Habib A, Iqbal K, Aslam A, et al. Chemical and morphological characteristics of mineral trioxide aggregate and Portland cements. *Dent Mater J.* 2016;35(1):112-7.
133. Guedes OA, Borges ÁH, Bandeca MC, Nakatani MK, de Araújo Estrela CR, de Alencar AHG, et al. Chemical and structural characterization of glass ionomer cements indicated for atraumatic restorative treatment. *J Contemp Dent Pract.* 2015;16(1):61-7.
134. Yap AUJ, Pek YS, Cheang P. Physico-mechanical properties of a fast-set highly

viscous GIC restorative. *J Oral Rehabil.* 2003;30(1):1-8.

135. Williams JA, Billington RW, Pearson GJ. The influence of sample dimensions on fluoride ion release from a glass ionomer restorative cement. *Biomaterials.* 1999;20(14):1327-37.

136. Almuhaiza M. Glass-ionomer Cements in Restorative Dentistry: A Critical Appraisal. *J Contemp Dent Pract.* 2016;17(4):331-6.

137. Salmerón-Valdés EN, Scougall-Vilchis RJ, Alanis-Tavira J, Morales-Luckie RA. Comparative study of fluoride released and recharged from conventional pit and fissure sealants versus surface prereacted glass ionomer technology. *J Conserv Dent JCD.* 2016;19(1):41-5.

138. Sidhu SK, Nicholson JW. A Review of Glass-Ionomer Cements for Clinical Dentistry. *J Funct Biomater.* 2016;7(3).

139. Dionysopoulos P, Kotsanos N, Pataridou A. Fluoride release and uptake by four new fluoride releasing restorative materials. *J Oral Rehabil.* 2003;30(9):866-72.

ANEXOS

ANEXO I

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

D., y con DNI nº y Doña, con DNI nº..... como tutores de, menor de edad, manifiestan que han sido informados sobre los beneficios que podría suponer la extracción y donación de un diente deciduo para cubrir los objetivos del Proyecto de Investigación titulado “CITOCOMPATIBILIDAD DE DOS NUEVOS CEMENTOS DE IONÓMERO DE VIDRIO (GICS) SOBRE CELULAS MADRE DE PULPA DENTAL”, dirigido por D. Francisco Javier Rodríguez Lozano, teléfono de contacto: 609406624 y correo electrónico: fcojavier@um.es, con el fin de mejorar los tratamientos de regeneración o reparación en dientes con la pulpa afectada.

He sido informado/a de las pruebas que van a ser realizadas pretenden determinar la biocompatibilidad de distintos ionómeros de vidrio con células madre de dientes permanentes.

He sido informado de que los datos y la información que se recojan y traten durante la investigación serán disociados.

He sido también informado de que puedo abandonar en cualquier momento mi participación en el estudio sin dar explicaciones y sin que ello me suponga perjuicio alguno.

Tomando ello en consideración, OTORGO mi CONSENTIMIENTO a esta extracción y donación y a que sea utilizada para cubrir los objetivos especificados en el proyecto.

XXX, a XX de XXXXX de 20XX.

Fdo. D/Dña.

ANEXO II

HOJA DE INFORMACIÓN A LA PERSONA PARTICIPANTE

Sobre el proyecto “CITOCOMPATIBILIDAD DE DOS NUEVOS CEMENTOS DE IONÓMERO DE VIDRIO (GICS) SOBRE CELULAS MADRE DE PULPA DENTAL”

Estimado Sr. o Sra.:

Le invitamos a participar en un estudio de investigación sobre CITOTOXICIDAD.

Objetivos

El estudio “CITOCOMPATIBILIDAD DE DOS NUEVOS CEMENTOS DE IONÓMERO DE VIDRIO (GICS) SOBRE CELULAS MADRE DE PULPA DENTAL” pretende determinar la biocompatibilidad de dos ionómeros de vidrio con células madre de dientes permanentes.

Datos de los investigadores

Ante cualquier duda o renuncia que pueda surgir en relación con su participación en la presente investigación, pueden dirigirse a la persona responsable de la misma, cuyos datos son los siguientes:

- Nombre: Miguel Ramón Pecci Lloret
- Cargo: Doctorando
- Dirección de contacto: C/ José Ballester Nº6 4D
- Correo electrónico: miguelr.pecci@gmail.com
- Teléfono de contacto: 630492610

Uso confidencial de los datos:

Los datos personales serán protegidos e incluidos en un fichero que estará sometido a y con las garantías de la ley 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos personales.

Derecho de la persona a retirarse del estudio

Puede abandonar en cualquier momento su participación en el estudio sin tener que dar explicaciones y sin que ello suponga perjuicio alguno.

En consecuencia, le solicitamos que firme y entregue la hoja de consentimiento informado que se adjunta.

En Murcia, a de de 201_

En nombre del equipo investigador

El interesado,

Fdo. Miguel Ramón Pecci Lloret.

Fdo.

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

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Vicerrectorado de
Investigación

CEI Comisión de
Ética de
Investigación

CAMPUS MARE NOSTRUM

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

Emilio Ginés Martínez Navarro, Catedrático de Universidad en funciones de Secretario de la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia

CERTIFICA:

Que D. Miguel Ramón Pecci Lloret ha presentado la Tesis Doctoral titulada "*Citocompatibilidad de dos nuevos cementos de ionómeros de vidrio (GICS) en células madre de pulpa dental*", dirigida por el Dr. D. Francisco Javier Rodríguez Lozano y el Dr. D. José María Moraleda Jiménez, a la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia.

Que dicha Comisión analizó toda la documentación presentada, y de conformidad con lo acordado el día 24 de abril de 2017¹, por unanimidad, se emite INFORME FAVORABLE, desde el punto de vista ético de la investigación.

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

Vº Bº

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

Fdo.: Antonio Juan García Fernández

Firmado con certificado electrónico reconocido.
La información sobre el firmante, la fecha de firma y el
código de verificación del documento se encuentra
disponible en los márgenes izquierdo e inferior.

ID: 1462/2017

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



Código seguro de verificación: RUXFMkRx-v5S9Sx+r-2VFXir8o-jSRtaFJF

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

11. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de Méjare de la caries dental (35). Pág. 7.

Figura 2. Esquema representativo de una molécula de ionómero de vidrio modificada con resina. Pág. 12.

Figura 3. Esquema representativo de la reacción de fraguado de los ionómeros de vidrio. Pág. 17.

Figura 4. Tinción de hematoxilina-eosina donde se muestran diferentes zonas entre la pulpa y la dentina. D: dentina, P: pulpa, Ol: zona odontoblástica. Pág. 20.

Figura 5. Modelo de autorrenovación y capacidad de diferenciarse de células madre. Pág. 22.

Figura 6. Células madre orofaciales y su origen. Pág. 26.

Figura 7. Presentación comercial de Ionostar Molar[®] y Equia Forte[®]. Pág. 33.

Figura 8. Vibrador universal, Ventura Mix 1. Pág. 34.

Figura 9. Cabina de seguridad biológica vertical tipo II. Pág. 35.

Figura 10. Centrifugador. Pág. 36.

Figura 11. Cámara de Neubauer con azul tripán. Pág. 38.

Figura 12. Esquema del recuento con cámara de Neubauer con azul tripan. Pág 39.

Figura 13. Formación de los cristales de formazan, tras 4 horas de incubación. Pág. 44.

Figura 14. Cultivo primario de células procedentes de pulpa dental a las 72h (A) y al mes de estar en cultivo (B). Pág. 53.

Figura 15. Análisis por citometría de flujo de la expresión de marcadores mesenquimales y hematopoyéticos CD73, CD90, CD105, CD14, CD20, CD34, CD45. Pág. 53.

Figura 16. Expresión de marcadores específicos mediante citometría de flujo. Pág. 57.

Figura 17. Porcentaje de células vivas, en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis mediante citometría de flujo. Pág. 58.

Figura 18. Morfología del citoesqueleto y del núcleo de las DPSCs a las 72 horas de cultivo en Equia Forte[®] (A) e Ionostar Molar[®] (B). Pág. 61.

Figura 19. Morfología de la adhesión de las DPSCs a las 72 horas de cultivo en Equia Forte[®] (A) e Ionostar Molar[®] (B). Pág. 62.

Figura 20. Observación de la superficie de Equia Forte[®]. Pág. 63.

Figura 21. Mapa elemental de Equia Forte[®]. Pág. 63.

Figura 22. Observación de la superficie de Ionostar Molar[®]. Pág. 64.

Figura 23. Mapa elemental de Ionostar Molar. Pág. 65.

12. ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS

Tabla 1. Composición de Ionostar Molar® y Equia Forte® . Pág. 33.

Tabla 2. Componentes que se añaden al α -MEM. Pág. 40.

Tabla 3. Análisis de PH, osmolalidad y espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) de los diferentes extractos. Pág. 52.

Tabla 4. Distribución en porcentajes de peso y átomos de Equia Forte®. Pág. 64.

Tabla 5. Distribución en porcentajes de peso y átomos de Ionostar Molar®. Pág. 65.

Tabla 6. Estudios sobre biocompatibilidad de ionómeros de vidrio. Pág. 69.

Gráfica 1. Proliferación celular de los diferentes materiales aplicados sin diluir. Pág. 54.

Gráfica 2. Proliferación celular de los diferentes materiales aplicados a dilución 1:2. Pág. 55.

Gráfica 3. Proliferación celular de los diferentes materiales aplicados a dilución 1:4. Pág. 56.

Gráfica 4. Porcentaje de migración celular a las 24 y 48 horas en presencia de los diferentes eluatos. Pág. 60.

