



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

BIOCOMPATIBILIDAD *IN VITRO* DE UN  
CEMENTO DE IONÓMERO DE VIDRIO EXPERIMENTAL

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

P R E S E N T A:

**C.D. ALEJANDRO LUIS VEGA JIMÉNEZ**

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA  
DR. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNÁNDEZ





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# ÍNDICE GENERAL.

Tema.	Página.
Resumen	
Introducción.....	1
I. Antecedentes.....	1
1.1 Biomateriales.....	1
1.2 Biocompatibilidad.....	1
1.2.1 Pruebas de Biocompatibilidad para Biomateriales Dentales.....	3
1.2.1.1 Pruebas <i>in vitro</i> .....	4
1.2.1.1.1 Ensayos de Citotoxicidad.....	5
1.2.1.1.1.1 Numero y crecimiento células.....	6
1.2.1.1.1.2 Permeabilidad de membrana.....	6
1.2.1.1.1.3 Biosíntesis enzimática.....	7
1.3 Cemento de Ionómero de Vidrio (CIV).....	9
1.3.1 Definición.....	9
1.3.2 Composición.....	9
1.3.3 Reacción de Fraguado.....	11
1.3.4 Características del CIV convencional.....	12
1.2.4.1 Mecanismos de Adhesión.....	12
1.2.4.2 Propiedades Biológicas.....	13
1.2.4.3 Propiedades Físicas.....	14
1.2.4.4 Liberación de iones.....	15
1.3.5 Clasificación de CIV por Asociación Dental Americana (ADA).....	16
1.3.5.1 Agente Cementante.....	17
1.2.5.2 Base y forro cavitarios.....	18
1.2.5.3 Material restaurativo.....	19
1.4 Biocompatibilidad <i>in vitro</i> del cemento de ionómero de vidrio.....	19
1.4.1 Degradación de Productos.....	22
1.4.2 El pH.....	23
1.4.3 Citotoxicidad.....	24
1.4.4 Reacciones pulpares.....	25
II. Planteamiento del Problema.....	26
III. Justificación.....	26
IV. Hipótesis.....	28
V. Objetivos.	
5.1 Generales.....	28
5.2 Específicos.....	28

VI.	Materiales y Métodos.....	29
	6.1 Tipo de estudio.....	29
	6.2 Definición operacional de las variables.....	29
	6.2.1 Variables de estudio.....	29
	6.3 Universo de Estudio.....	29
	6.4 Selección de las muestras.....	29
	6.5 Criterios de selección.....	29
	6.5.1 Criterios de inclusión.....	29
	6.5.2 Criterios de exclusión.....	30
	6.6 Síntesis del CIV experimental.....	30
	6.7 Preparación de muestras.....	31
	6.7.1 CIV experimental.....	31
	6.7.2 CIV comercial.....	31
	6.8 Control de Calidad Norma ADA No. 96.....	32
	6.8.1 Prueba de espesor de película.....	32
	6.8.2 Prueba de resistencia a la compresión.....	32
	6.8.3 Prueba de erosión acida.....	33
	6.8.4 Prueba de tiempo de fraguado.....	33
	6.9 Análisis de superficie de CIV por Microscopia Electrónica de Barrido.....	34
	6.10 Medición de pH en CIV.....	34
	6.11 Análisis de Medio de cultivo por Espectroscopia de Absorción Atómica.....	
	(EAA).....	35
	6.12 Cultivo celular de fibroblastos gingivales humanos.....	36
	6.11.1 Conteo celular.....	37
	6.13 Ensayos de Biocompatibilidad <i>in Vitro</i> .....	38
	6.13.1 Contacto Directo.....	38
	6.13.2 Contacto Indirecto.....	39
	6.15 Análisis de cultivos celulares por Microscopia Óptica.....	41
	6.14 Análisis Estadístico.....	41
	6.16 Recursos.....	42
	6.16.1 Materiales.....	42
VII.	Resultados.....	43
	7.1 Control de Calidad de CIV según Norma No. 96 ADA.....	43
	7.2 Análisis de superficie por MEB de CIV.....	43
	7.3 Medición de pH.....	45
	7.4 Análisis de Medio de Cultivo por Espectroscopia de Absorción Atómica.....	
	(EAA).....	46
	7.5 Ensayos de Biocompatibilidad <i>in Vitro</i> .....	47
	7.5.1 Contacto Directo (Viabilidad).....	47
	7.5.1.1 Morfología y adhesión celular por contacto directo.....	48
	7.5.2 Contacto Indirecto (Citotoxicidad).....	51
	7.5.2.1 Determinación de citotoxicidad (extractos CIV).....	51
	7.5.2.2 Morfología y adhesión celular por contacto indirecto.....	55
	7.5.3- Metabolismo celular.....	66
VIII.	Discusión.....	59

Conclusiones y Perspectivas.....	63
Referencias.....	65

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Pruebas de Biocompatibilidad	3
Tabla 2. Componentes de polvo y líquido de CIV convencional	11
Tabla 3. Características del CIV Convencional	12
Tabla 4. Propiedades relativas de las restauraciones del Cemento de ionómero de vidrio	14
Tabla 5. Requerimientos de los cementos dentales de base acuosa	17
Tabla 6. Iones lixiviados de CIV	22
Tabla 7. Escala de Citotoxicidad Norma ISO 10993 – 5	41
Tabla 8. Control de calidad de CIV experimental	43
Tabla 9. Promedios de pH de CIV comercial y experimental	45
Tabla 10. Promedios de pH del Medio de cultivo con CIV	45
Tabla 11. Espectroscopia de Absorción Atómica en Medio de cultivo con CIV	46
Tabla 12. Porcentaje de extractos y absorbancias	51
Tabla 13. Citotoxicidad de extractos de CIV Experimental	54
Tabla 14. Citotoxicidad de extractos de CIV Comercial	54

## INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura de varios tipos de ácidos que componen a los CIV	10
Figura 2. Mecanismo de Adhesión de policarboxilato de zinc	12
Figura 3. Cuadros de cámara de Neubawer	38
Figura 4. Curva Patrón	40
Figura 5. Imágenes MEB CIV comercial y experimental	44
Figuras 6. Ensayo con Contacto Directo	47
Figuras 7. Fibroblastos gingivales en contacto con Alúmina y PVC	49
Figura 8. Fibroblastos gingivales en contacto con CIV Experimental y Comercial	50
Figura 9. Datos contacto indirecto en Curva patrón	52
Figura 10. Ensayo de Contacto indirecto (citotoxicidad)	53
Figura 11. Fibroblastos gingivales en contacto con Medio de Cultivo y Cloro al 13%	55
Figura 12. Fibroblastos gingivales en contacto con concentraciones de extractos de CIV experimental y Comercial	57
Figura 13. Biotransformación de Alamar Blue en ensayos de contacto directo e indirecto	58

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

CIV: Cemento de Ionómero de vidrio.

GIC: Glass ionomer cement

ADA: Asociación Dental Americana

ANSI/ADA: Instituto Estadounidense de estándares De la Asociación Dental Norteamericana

PVC: Policloruro de Vinilo

ISO: Organización Internacional para la Estandarización.

MTA: Mineral trióxidoagregado

DMEM: Medio de Eagle Modificado de Dubelcco

FBS: Suero Bovino Fetal

AB: Alamar Blue

MTT: Reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol.

MPa: Mega pascales

P/L: polvo liquido



## RESUMEN

**Objetivo:** Evaluar la respuesta biológica que presentan fibroblastos gingivales en contacto con el cemento de ionómero de vidrio (CIV) experimental y sus extractos en medio de cultivo comparándolo con un CIV comercial (Mirafill®). **Materiales y Métodos:** Se efectuó un estudio experimental y descriptivo, utilizando muestras de CIV experimental y comercial. Todas las muestras se prepararon bajo condiciones controladas ( $23^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$  y  $50\pm 5\%$  humedad relativa). De acuerdo a la con la Norma No. 96 de la ADA se llevo a cabo la evaluación física y posteriormente la evaluación biológica que consistió en hacer ensayos de contacto directo e indirecto apoyados con el uso de Microscopia óptica y Microscopia Electrónica de Barrido. Se uso el marcador Alamar Blue, que permite cuantificar la viabilidad celular *in vitro*. Se colocaron en contacto directo las muestras de Alúmina (Control negativo), Poli Cloruro de Vinilo (PVC) como control positivo, CIV experimental y comercial junto con Alamar Blue en cultivos fibroblastos gingivales durante 12, 24, 36, 48 y 72 horas obteniendo absorbancias que se traducen en actividad metabólica. Para evaluar el contacto indirecto, se colocaron Medio de cultivo (Control negativo), cloro (control positivo) y diluciones que van de 0.1% a 100% de extractos de ambos CIV en cultivos celulares y las mediciones se realizaron a las 24 horas. **Resultados:** El CIV experimental obtuvo en la prueba de tiempo de fraguado 4.19 minutos, en resistencia a la compresión 83.5 MPa, espesor de película 20  $\mu\text{m}$  y erosión acida 0.0087 mm/h. Por otro lado, en ensayo de contacto directo, se considera que la Alúmina favorece el 100% de actividad metabólica celular, bajo estas condiciones podemos determinar que el PVC presentó 25% de actividad celular, en contraste con el 81% de actividad metabólica que se observó en cultivos con CIV experimental con una perdida del 19%, del metabolismo celular mientras que en el en CIV comercial se determinó 87% del metabolismo celular y una pérdida de menos del 13% no mostrando diferencias significativas entre ambos cementsos. En contacto indirecto los cultivos con medio de cultivo hay mayor cantidad de células viables, en contraste los cultivos con cloro mostraron muerte celular considerable, mientras que al comparar cultivos con CIV experimental y comercial se observo una mayor supervivencia celular en el CIV comercial mostrando diferencias significativas entre ambos cementsos. **Conclusiones:** El CIV experimental cumple con los requisitos de la Norma No. 96 de la ADA. Por otro lado, los ensayos de citotoxicidad de contacto indirecto, mostraron que ambos ionómeros ocasionaron una disminución en la actividad metabólica que los ensayos de contacto directo, especialmente el CIV experimental, lo que implica que los elementos que liberan los CIV tienen un mayor efecto citotóxico en la viabilidad celular.

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the biological response of gingival fibroblasts which were in contact with the glass ionomer cement (GIC), evaluating cell viability in direct and indirect contact essays. **Materials and Methods:** We have performed an experimental and descriptive study, using samples of experimental and commercial GIC. All samples were prepared under controlled conditions ( $23^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$  and  $50 \pm 5\%$  relative humidity). According to the ADA Regulation No. 96, took out the physical evaluation and further assessment was to make biological tests supported direct and indirect contact with the use of optical microscopy and SEM. Placed in direct contact Alumina samples (negative control), PVC (positive control), experimental and commercial GIC with cultured gingival fibroblasts for 12, 24, 36, 48 and 72 hours obtaining absorbance that result in metabolic activity (measured with Alamar Blue). Indirect contact experiments were performed, using extracts from both culture medium GIC dilutions (commercial and experimental), ranging from 0.1% to 100%, placing them in cell cultures and the absorbance was measured at 24 hours. **Results:** GIC experimental obtained 4.19 minutes setting time, 83.5 MPa in compressive strength, 20  $\mu\text{m}$  of film thickness and acid erosion 0.0087 mm / h. In addition Alumina was considered as 100% of cellular metabolic activity, which let us to determine that PVC presented at 25% of cell activity while the metabolic activity in culture cells with GIC experimental was 81% and 87% GIC commercial with a loss 19 and 13% of cellular metabolism respectively showing no significant differences between the two. In indirect contact, cell culture with medium there is the greatest proportion of viable cells, in contrast with chlorine cultures showed considerable cell death, while comparing cell cultures with GIC experimental and commercial, the increased cell survival observed in the GIC commercial showing significant differences between the cements. **Conclusions:** The experimental CIV meets the requirements of Regulation No. 96 of the ADA. The extracts of both ionomers showed a significant damage on metabolic activity compared to direct contact experiment, especially the experimental GIC, which implies that the elements that release of GIC have presented a greater cytotoxic effect on cell viability.

## I. ANTECEDENTES.

### 1.1 Biomateriales.

Durante el último tercio del siglo XX, los biomateriales eran esencialmente materiales industriales seleccionados con el criterio de que fueran capaces de cumplir ciertos requisitos de aceptabilidad biológica. Sin embargo, hoy en día muchos biomateriales son diseñados, sintetizados y procesados con el único fin de tener una aplicación en el campo médico <sup>1</sup>.

En la segunda reunión de consenso sobre definiciones en el campo de Biomateriales en 1992, un biomaterial se definió como "un material destinado a hacer una interfase con sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar algún tejido, órgano o función del cuerpo" <sup>2</sup>.

Para que un material sea aceptado en su aplicación como biomaterial tiene que superar toda una serie de ensayos, rígidamente controlados, que exigen el cumplimiento de normas muy estrictas relacionadas con el carácter no tóxico, no carcinogénico, biocompatible y no generador de efectos adversos en el organismo. Por ello, cuando se analizan las posibilidades de utilizar un producto como biomaterial, hay que tener en cuenta tres conceptos clave: biocompatibilidad, biofuncionalidad y biodegradación <sup>3</sup>.

### 1.2 Biocompatibilidad.

La biocompatibilidad parecería ser un tema de poca importancia dentro del campo de la odontología, pero en realidad es vital tener un amplio conocimiento sobre la complejidad y naturaleza de éste tópico, ya que afecta directa e indirectamente aspectos éticos, legales, sociales y técnicos de la práctica odontológica, principalmente en el campo de la rehabilitación, en donde las terapias dependen en gran parte de los biomateriales dentales <sup>4</sup>.

La biocompatibilidad se define como la capacidad de un material de generar una respuesta biológica apropiada al ser aplicado sobre un tejido (ya que no existe un material inerte), dependiendo de la función física y de la respuesta biológica que deseamos de un material. Esta definición implica la interacción entre un huésped, el material y la función esperada del material <sup>4</sup>.

Asimismo, cualquier diseño debe presentar buenas características biofuncionales, pues debe ofrecer la suficiente estabilidad e integridad para mantener condiciones óptimas, para favorecer el proceso de regeneración. Por último, la biodegradación considera la descomposición del material (con ruptura de los enlaces, lo cual puede causar su modificación e incluso su destrucción), en un medio tan agresivo como lo es el organismo humano <sup>4</sup>.

La biocompatibilidad es un proceso dinámico y continuo ya que la respuesta del cuerpo a los materiales dentales cambia con el paso del tiempo. Al mismo tiempo todos los materiales en contacto con el medio interno sufren cambios, ya sea por procesos de corrosión, degradación ó fatiga, entre otros. Para explicar lo anterior se puede tomar como ejemplo un implante dental osteointegrado, que con el paso del tiempo puede llegar a fracasar, lo cual puede estar asociado a mala higiene, enfermedades sistémicas o una sobrecarga oclusal, entre otros muchos factores <sup>1</sup>.

Estudios comparativos han demostrado que algunos materiales, tales como la amalgama y el Mineral Trióxido Agregado (MTA), pueden presentar mayor citotoxicidad cuando están recién preparados y que algunos otros pueden serlo al paso del tiempo. Como ejemplo de esto tenemos a la amalgama la cual presenta una mayor toxicidad recién elaborada, mientras que el menos citotóxico bajo esta condición es el MTA.. Sin embargo, al evaluar estos mismos materiales después de 24 horas, observamos que la amalgama disminuye su citotoxicidad y el MTA la aumenta <sup>5</sup>.

### 1.2.1 Pruebas de Biocompatibilidad para Materiales dentales

Anteriormente, los “nuevos” materiales eran simplemente evaluados en humanos para observar su biocompatibilidad. Desde hace muchos años esto ha ido cambiando, en la actualidad los nuevos materiales deben pasar por varias pruebas antes de ser utilizados en humanos. Estas pruebas se clasifican en: *In Vitro*, *In vivo* y *Pruebas de uso*. Actualmente, los investigadores en el área reconocen que la manera más eficiente, económica y relevante para evaluar la biocompatibilidad de los materiales es realizando estudios que combinen los tres grandes grupos <sup>6</sup>.

Tabla 1. Pruebas de Biocompatibilidad. (Agregar como pie de pagina)

<b>PRUEBAS <i>IN VITRO</i></b>	<b>PRUEBAS <i>IN VIVO</i> EN ANIMALES</b>	<b>PRUEBAS DE USO</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Citotoxicidad:</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Número y crecimiento celular.</li> <li>2. Permeabilidad de la membrana celular.</li> <li>3. Biosíntesis enzimática: MTT, AB</li> <li>4. Pruebas indirectas (uso de barreras).</li> <li>5. Pruebas de barrera dental.</li> </ol> </li> <li>• <b>Mutagénesis</b></li> <li>• <b>Carcinogénesis:</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Irritación de mucosas</li> <li>• Sensibilidad cutánea</li> <li>• Implantación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• En animales</li> <li>• En humanos</li> </ul>

Fuente: Villegas M. Angela. Tests of biocompatibility for dental materials. Review of the literature. Rev. Estomat. 2008; 16(2):38-44

Tanto en el campo de la medicina como en el de la odontología, el objetivo es proteger la integridad, la funcionalidad y actualmente la estética del paciente u órgano dentario. En ambos casos esto sólo se logra con el empleo de materiales que sean biocompatibles <sup>4</sup>.

Es por ello, que a continuación se describirán los diferentes procedimientos, métodos y técnicas de investigación de la biocompatibilidad de los materiales de uso odontológico, de acuerdo con los protocolos descritos en las normas ISO 10993 (Organización Internacional para la Estandarización).

#### 1.2.1.1 Pruebas *In vitro*.

Se llevan acabo en tubos de ensayo o en placas de cultivo, fuera de un organismo vivo. Son ensayos muy diversos, pero en general se realizan colocando el material en contacto directo ya sea con poblaciones celulares o con bacterias. Estos pueden medir entre otras cosas: el grado de citotoxicidad o crecimiento celular, algunas funciones metabólicas de la célula, el efecto del material sobre el material genético de la célula (mutagénesis) <sup>7</sup>, etc.

Los cultivos celulares más usados en estudios *in vitro* sobre la citotoxicidad de cementos selladores son: fibroblastos humanos, fibroblastos de ratón, células epiteliales. Estas células son escogidas ya que son fáciles de conseguir, se cultivan con facilidad y son consistentes en cuanto a su calidad <sup>8-10</sup>.

El Instituto Americano Nacional de Estandarización (ANSI), La Asociación Dental Americana (ADA), La Organización Internacional de Estandarización (ISO) y La Federación Dental Internacional (FDI, han publicado lineamientos para la evaluación de materiales que fomentan el uso de métodos *in vitro*. Estos lineamientos pueden ser utilizados como pruebas filtro, minimizando así la necesidad de pruebas *in vivo*. Sin embargo los protocolos de citotoxicidad especifican la necesidad de utilizar ambos métodos por la diferencia de respuestas que puede haber entre ellas<sup>11</sup>.

Dentro de las ventajas que ofrecen estas pruebas es que son rápidas, fáciles de realizar y menos costosas en comparación a los ensayos *in vivo*. Estos

permiten el tamizaje a gran escala, ya que se logra obtener un excelente control experimental y además son altamente reproducibles. La desventaja principal es que la relevancia clínica es cuestionable, debido a que solo evalúan una condición en cada tipo de experimento, siendo muy diferentes a las condiciones del medio en el cual se encuentran dentro del organismo. Uno de los factores más cuestionables, es que no hay presencia de una respuesta inflamatoria o alguno de los múltiples mecanismos de protección por parte de los tejidos, por lo cual este tipo de ensayos solo se considera como un acercamiento al problema <sup>9</sup>.

#### 1.2.1.1.1 Ensayos de Citotoxicidad.

La evaluación de la citotoxicidad de un material en cultivos celulares es uno de los estudios *in vitro* usados más comúnmente para determinar la biocompatibilidad del material. Es un estudio que proporciona una valiosa información de los materiales que deben ser descartados o aquellos que pueden ser sometidos a más estudios <sup>6</sup>.

Los resultados de las pruebas de citotoxicidad *in vitro* pueden no correlacionarse con datos *in vivo*. Sin embargo, si un material de estudio consistentemente induce reacciones citotóxicas fuertes en pruebas de cultivos celulares, es muy probable que también ejerza efectos citotóxicos sobre tejidos vivos. La reducción en el número de pruebas en animales y su costo produce un beneficio adicional <sup>12,13</sup>.

Estos ensayos evalúan el efecto de los materiales sobre diferentes poblaciones celulares midiendo el número o crecimiento celular luego de la exposición a los materiales. Además estas pruebas determinan daños a nivel de la membrana celular, biosíntesis o actividad enzimática <sup>6</sup>.

La evaluación citotóxica tiene la ventaja de ser una manera rápida y económica de filtrar un gran número de materiales antes de su evaluación *in vivo*<sup>13</sup>.

Villegas M. <sup>6</sup> señala que la orientación general para las pruebas de biocompatibilidad *in vitro* se presenta en la norma ISO 10993 y citotoxicidad en los apartados 5 y 12. Así mismo la norma ISO 7405 indica técnicas complementarias para la evaluación de materiales dentales.

#### 1.2.1.1.1.1 Número y crecimiento celular.

Para evaluar el crecimiento o el número celular, una de las técnicas mas empleadas es el contacto directo en el cual se coloca el material a evaluar directamente en contacto con un cultivo celular; si el material no es citotóxico, las células permanecen en contacto con el material y continúan creciendo normalmente, por otra parte si el material es citotóxico, el crecimiento celular se detiene y empieza haber muerte celular. Por otro lado, la densidad celular es otro factor importante, la cual puede ser descrita de forma: cualitativa, semi-cualitativa, o cuantitativamente. Es importante siempre tener un punto de referencia tanto positivo como negativo de acuerdo al tipo de ensayo. En los experimentos de citotoxicidad, pueden emplearse una gran variedad de materiales como referencia, como ejemplos tenemos al el teflón o alúmina que son comúnmente utilizados como control negativo por ser un materiales estables e inertes y por otra parte el Cloruro de polivinilo plastificado es utilizado como control positivo ya que es un material altamente citotóxico<sup>6, 7</sup>.

#### 1.2.1.1.1.2 Permeabilidad de la membrana.

Existen otro grupo de pruebas que miden la citotoxicidad de un material y consiste en evaluar los cambios de la permeabilidad de membrana celular. Esto se realiza observando la facilidad con que un colorante pueda atravesar la membrana



celular, estas pruebas se basan en el principio de que la pérdida de la permeabilidad de la membrana es equivalente a un daño celular severo o a la muerte celular. La gran ventaja de estas pruebas es que identifican tanto células vivas como muertas, esto es importante debido a que las células pueden estar físicamente presentes pero muertas <sup>6,7</sup>.

Existen dos tipos de tinciones utilizados para realizar estos ensayos:

Colorantes vitales: estos son transportados activamente al interior de la célula y queda retenido cuando la célula está viva y el material no ha generado un efecto citotóxico sobre esta. Por otra parte, si el material es citotóxico, el colorante sale del interior de la célula, indicando así muerte celular. Dentro de los colorantes vitales utilizados se encuentran la Naranja de Acridina, Na<sub>51</sub>CrO<sub>4</sub> (51Cr) y el Rojo neutro (RN) <sup>6, 12</sup>

Colorantes no vitales: estos no son transportados activamente al interior de una célula viva, por otra parte si un material es citotóxico, genera daños a nivel de la membrana celular, ocasionando así que el colorante sea transportado al interior de la célula indicando muerte celular por ejemplo azul de tripan <sup>6, 12</sup>.

#### 1.2.1.1.1.3 Biosíntesis enzimática.

Algunas pruebas *in Vitro* utilizan la biosíntesis enzimática de las células para evaluar la respuesta citotóxica. Pruebas que miden la síntesis de DNA o la síntesis protéica son un ejemplo de este tipo de pruebas, estas se llevan acabo agregando precursores de radioisótopos marcados (3H-timidina o 3H-leucina) al cultivo celular, de este modo los que son incorporados al DNA o proteína, son cuantificados. De esta forma se determina la influencia del material sobre la síntesis de proteínas en un cultivo celular <sup>6,7</sup>.

El ensayo con MTT es otra prueba enzimática comúnmente utilizada para medir la citotoxicidad de los materiales, tiene como propósito medir la actividad de la deshidrogenasa celular. Es una prueba simple debido a que no requiere de radioisótopos, es rápida y precisa ya que permite cuantificar exactamente el número de células viables <sup>14</sup>.

MTT se basa en producir formazán a partir de la escisión de la sal de tetrazolio por las mitocondrias funcionales. La técnica de la prueba de MTT hace necesario matar a las células, por lo que no es sencillo dar un seguimiento de la viabilidad de los cultivos celulares <sup>15</sup>.

Se han empleado diferentes métodos para determinar la citotoxicidad de los materiales dentales. Estos métodos consisten en observar la inhibición del crecimiento celular o registrar el daño o muerte celular.

El Alamar Blue (AB) es un medio de contraste soluble en agua que ha sido previamente utilizado para cuantificar la viabilidad *in vitro* de diferentes células. Cuando se añade a los cultivos celulares, la forma oxidada de la AB entra en el citosol y se convierte en su forma reducida (por actividad de la enzima mitocondrial) al aceptar electrones del NADPH, FADH, FMNH, NADH, así como de los citocromos. Esta reacción *redox* es acompañado por un cambio en la color del medio de cultivo de color añil a fluorescentes rosa, que puede ser fácilmente medido por colorimetría o lectura fluorométrica <sup>15</sup>

Debido al hecho de que es muy estable y no tóxico, lo cual permite el monitoreo continuo de los cultivos celulares a través del tiempo. Por esta razón, esta prueba ha sido considerada superior a las pruebas clásicas de viabilidad celular como la prueba de MTT. Por otro lado la desventaja del AB es el establecimiento del tiempo de su biotransformación ya que varía dependiendo del tipo de célula que se emplea <sup>15</sup>.

### 1.3. CEMENTO DE IONOMERO DE VIDRIO.

#### 1.3.1 Definición.

También llamado polialquelonato de vidrio es un cemento de base acuosa que presenta una reacción ácido – base cuando se mezclan sus componentes. El término ionómero proviene de la unión de los términos ión y polímero debido a que el líquido es una solución acuosa de ácido ionizado y puede considerarse que contiene el ión de un polímero, la estructura del polvo que se combina con el líquido y forma una estructura cerámica amorfa conocida como vidrio, esta estructura vítrea puede ser transparente o translúcida <sup>16, 18</sup>.

En un principio, el cemento pretendía ser un material para restauración estética en dientes anteriores pero debido a su adhesión a la estructura dentaria y su potencial para la prevención de caries, su utilización se extendió como agente cementante, adhesivo ortodóncico, sellador de surcos y fisuras, recubrimiento y base cavitarios, reconstrucción de muñones y restauraciones intermedias <sup>19</sup>.

Su modulo elástico y coeficiente de expansión térmica son muy similares a los de la dentina y tiene menos contracción que los materiales compuestos.

#### 1.3.2 Composición.

La mayor parte de los cementos se suministran en forma de dos componentes polvo y líquido. El líquido suele ser una sustancia ácida donante de protones y el polvo es de naturaleza básica, consistente tanto en vidrios como en partículas de óxido metálico. Dependiendo del tamaño de partícula y la relación entre polvo – líquido (P/L), cuando se mezclan los componentes se alcanza una consistencia fluida o espesa, que endurece (fragua) en un tiempo razonable. La reacción entre polvo – líquido es esencialmente una reacción ácido – base. Después del fraguado estos cementos adquieren una resistencia adecuada como

para que puedan ser empleados como base, restauración permanente o temporal, y como un agente cementante. El tipo de aplicación del cemento depende de su consistencia, que oscila desde una viscosidad baja a una muy alta y que depende en gran parte de la distribución del tamaño de las partículas y la relación P/L <sup>19</sup>.

Líquido. Usualmente es poliácido acrílico al 50% puede contener polímeros o copolímeros de ácido itacónico y maleico<sup>17</sup>. El ácido itacónico reduce la viscosidad del líquido poliacrílico, mientras que el ácido tartárico mejora el tiempo de trabajo permitiendo una mejor manipulación <sup>20</sup>.

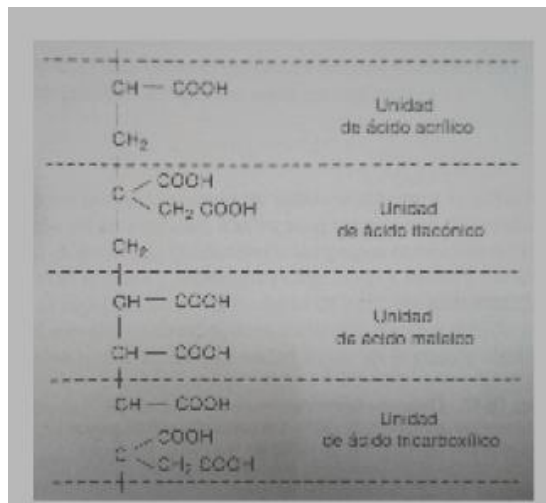


Figura 1. Estructura de varios tipos de ácidos que componen a los CIV

Polvo: Constituido por sílice, alúmina, fluoruro de calcio, fluorita, y en menor cantidad encontramos, fosfato de aluminio, fluoruro de aluminio, y fluoruro de sodio, así como otras sustancias opacadoras. Estos componentes se funden o sinterizan entre 1100 - 1500°C obteniéndose un vidrio que se tritura hasta conseguir cristales muy pequeños. Este material es capaz de liberar gran cantidad de iones calcio, y aluminio, al ser atacado por el ácido. La presencia de flúor, facilita el manejo del material, al retardar la gelación, pues reacciona más rápido que los iones más pesados. Si estos iones reaccionaran más rápido que los iones más pesados, la gelación sería rapidísima y el material sería una pasta inmanejable <sup>20</sup>.

Tabla 2. Componentes de Polvo y líquido del CIV convencional

Polvo	Líquido
SiO <sub>2</sub> – 29 %	Ácido Poliacrílico 47.5%
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> – 16.6%	Ácido Itacónico
CaF <sub>2</sub> – 34.3%	Ácido Tartárico
AIF	Agua
NaF <sub>3</sub>	
AlPO <sub>4</sub>	
} pequeñas cantidades	

Agua. Es un componente esencial de la fórmula. Su función es proporcionar el medio en que se realizan los intercambios iónicos. La falta o exceso produce alteraciones estructurales con tendencia al resquebrajamiento al desecarse. <sup>20</sup>.

### 1.3.3 Reacción de fraguado.

Los cementos de Ionómero de vidrio (CIV) convencionales llevan acabo una reacción ácido – base cuando entran en contacto los cristales de vidrio y el ácido poliacrílico. Al unir el polvo y el liquido, el ácido ataca al complejo de vidrio, liberando Al<sup>+3</sup>, Ca<sup>+2</sup> y Na<sup>+</sup> en forma iónica al igual que fluoruros. Posteriormente se forman polisales de calcio y aluminio mismas que forman la matriz de gel que envuelve a los núcleos de vidrio que no han reaccionado <sup>20</sup>.

La mezcla endurecida esta constituida por:

- Núcleos del complejo de vidrio que no reacciona con el ácido.
- Una matriz de gel que envuelve dichos núcleos
- Una matriz amorfa hidratada de Ca<sup>+2</sup> y Al<sup>+4</sup>

Aquí el agua sirve tanto como medio reactivo y como componente esencial del gel salino requerido para la hidratación de los complejos metal – carboxilato formados <sup>22</sup>.

### 1.3.4 Características del CIV convencional.

Tabla 3. Características del CIV Comercial

<ul style="list-style-type: none"><li>• Adhesión física y química a tejidos dentarios</li><li>• Adhesión a algunas aleaciones como (Ni – Cr, Ag – Pd)</li><li>• Biocompatibilidad</li><li>• Baja reacción exotérmica</li><li>• Liberación de fluoruros y otros iones</li><li>• Propiedades aislantes térmicas y eléctricas</li><li>• Sensibilidad en fases tempranas del fraguado</li><li>• Difícil pulido</li><li>• Limitaciones estéticas <sup>3-5,9-12,18,20</sup></li></ul>
---

#### 1.3.4.1 Mecanismos de Adhesión.

Los mecanismos por los que el ionómero de vidrio se adhiere a la estructura dentaria aún no se han identificado en su totalidad. Sin embargo, no parece haber dudas en que, el mecanismo primario interviene la quelación de los grupos carboxilos de los poliácidos con el calcio de la apatita del esmalte y la dentina. El mecanismo de adhesión del ionómero de vidrio es comparable al cemento de policarboxilato de zinc. La fuerza adhesiva al esmalte es siempre mayor a la dentina debido al mayor contenido inorgánico del primero y a la homogeneidad desde un punto de vista morfológico <sup>19</sup>

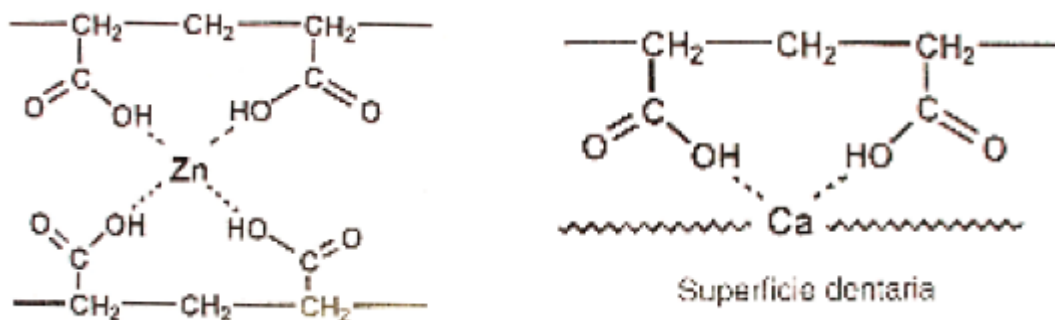


Figura 2. Mecanismo de adhesión de policarboxilato de zinc

#### 1.3.4.2 Propiedades Biológicas.

El CIV libera cantidades de fluoruros comparables a las que se desprenden inicialmente de los cementos de silicato, y se mantienen durante un tiempo prolongado. Aun no se han definido la cantidad mínima de fluoruro liberado, así como la posterior absorción por el esmalte, necesaria para que produzca inhibición de la caries. Se han realizado diferentes estudios clínicos para valorar el empleo del CIV en restauraciones o como sellador de foseas; los resultados han mostrado que hay una alta incidencia de caries secundarias en el grupo control estudiado. Expertos afirman que la frecuencia de caries secundarias en dientes restaurados con CIV en comparación con dientes posteriores restaurados con resinas compuestas es menor, mientras que otros autores reportan un mayor número de casos. Aun así existen estudios que demuestran que la liberación de fluoruro del CIV inhibe la progresión de la caries secundaria <sup>17,19, 20</sup>.

Los estudios histológicos realizados para valorar la biocompatibilidad de CIV han mostrado que son relativamente biocompatibles. Se ha demostrado que la reacción pulpar al cemento es mayor comparada con la observada con el Óxido de zinc y eugenol (ZOE) pero menor que los cementos de fosfato de zinc <sup>35</sup>. El CIV empleado como agente cementante presenta una proporción P/L menor, esta proporción hace que el pH se mantenga más bajo durante un tiempo mayor<sup>17</sup>. Con cualquier CIV, especialmente en las preparaciones cavitarias profundas (a menos de 0,5 mm de la pulpa), es deseable colocar una capa delgada de un recubrimiento cavitario protector como el Hidróxido de calcio  $\text{Ca(OH)}_2$  <sup>19, 20</sup>.

### 1.3.4.3 Propiedades Físicas.

Tabla 4. Propiedades relativas de las restauraciones de cemento de ionómero de vidrio

	<b>Resistencia a la compresión (MPa)</b>	<b>Resistencia diametral a la compresión (MPa)</b>	<b>Dureza Knoop (KHN)</b>	<b>Solubilidad (Pruebas ANSI/ADA)</b>	<b>Anticariogénico/ respuesta pulpar</b>
Cemento de silicato de*	180	3,5	70	0,7	Sí/grave
Ionómero de vidrio (restaurador) de*	150	6,6	48	0,4	Sí/ leve
Cermet	150	6,7	39	~	Sí/ leve
Ionómero híbrido	105	20	40	~	Sí/ leve

\*American National Standar/American Dental Association Specification No. 96 for Dental Water Based Cements Water Based Cements<sup>21</sup>

La dureza del ionómero aumenta con el tiempo, la reacción exotérmica es baja, la contracción al fraguar es escasa y la estabilidad dimensional se alcanza en un ambiente húmedo. Hay una interacción química entre la matriz y el relleno así como poca sensibilidad al desbalance hídrico en las primeras fases del fraguado, por lo que los excesos o defectos de agua no son recomendables en estas fases<sup>22, 23</sup>.

Una de las características más sobresalientes es su capacidad de adherirse a la fase mineral del esmalte o la dentina, lo cual puede deberse a una unión irreversible de los iones de poliacrilato a la superficie de la hidroxiapatita. En dicha superficie desplazan a los iones fosfato, de manera que en la superficie tisular hay policarboxilato incluido y en la superficie de cemento hay iones calcio y fosfato desplazados del diente. Para una buena adhesión es necesario que el material abarque la superficie dentaria en forma suficiente y esto depende de la cantidad de grupos carboxílicos, por esta razón el cemento debe aplicarse sobre la estructura dentaria antes de que la reacción de fraguado haya progresado mucho, esto es, mientras existen suficientes grupos COOH disponibles. Cualquier demora



en la colocación del cemento reducirá la posibilidad de hidratar la superficie, y por consiguiente disminuirá su adhesión <sup>19, 23</sup>.

Un concepto ligado específicamente a estos materiales y en relación a su capacidad adhesiva, es el acondicionamiento de la superficie a la que se va a adherir. Antes de colocar un cemento ionómero sobre una cavidad, debe eliminarse los contaminantes de su superficie a fin de permitir el intercambio iónico del cemento con la estructura dentaria. Wilson y McClean están a favor por el ácido poliacrílico a una concentración de 30 a 35 %, durante 10 seg, la cual contribuye a crear una interfase de unión entre el cemento y el diente. Además, produce una desmineralización ligera y elimina los restos superficiales. <sup>23</sup>.

#### 1.3.4.4 Liberación de iones.

La liberación del flúor en su entorno inmediato está bien documentada; se produce al sufrir el material un ataque ácido y es detectable durante un período largo de tiempo. Se ha descrito que la capa intermedia entre el cemento y la dentina, formada por carbonatoapatita fluorada, es de alta resistencia y escasa solubilidad, resultando en una barrera a la disolución de la dentina o el esmalte por el ácido láctico, pudiendo así explicarse la acción cariostática de este material <sup>19</sup>.

La capacidad de adhesión y de liberación del flúor ha permitido su amplia utilización como base, sellador, material para muñones o cavidades clase II o V, tratamientos endodóncicos, cemento de restauraciones rígidas o adhesión de bandas ortodóncicas. Entre sus inconvenientes podemos mencionar que: presentan tendencia al agrietamiento al desecarse pues debido a la lentitud de completar el proceso de fraguado, son muy sensibles al desbalance hídrico en las primeras fases, lo que quiere decir que no deben desecarse ni humedecerse en las primeras horas. El efecto no es el mismo al secarlos en exceso que al mojarlos ya que el agrietamiento de los ionómeros puede explicarse, por el stress interno

de contracción que se produce en el seno de un material que debe fraguar adherido a paredes rígidas (las de la cavidad) <sup>19, 24</sup>.

Como se menciona anteriormente la capacidad de los cementos de ionómero de vidrio para liberar fluoruro ha sido muy significativo en su uso en la odontología. Muchas investigaciones de la liberación del ión fluoruro se han llevado a cabo tanto *in vivo* como *in vitro*, usando una amplia variedad de cementos. Sin embargo, el fluoruro no es sólo el ion que es liberado del cemento. Muchos de los vidrios utilizados contienen otros iones monovalentes, como el sodio, además de iones bivalentes como el calcio y el ion trivalente que es el aluminio. <sup>25 - 28</sup>.

#### 1.3.5 Clasificación del CIV por la Asociación Dental Americana.

En 1966 se estableció el consejo sobre materiales y dispositivos dentales de la ADA (actualmente Consejo de Asuntos Científicos), este asumió las responsabilidades sobre la creación de normas e inicio los procedimientos de certificación de los productos que cumplían con los requisitos de dichas especificaciones <sup>21, 29</sup>.

Estas especificaciones son normas mediante las cuales se pueden medir la calidad y las propiedades de determinados materiales dentales. Además, identifican los requisitos que deben de cumplir las propiedades físicas y químicas de un material para certificar que su uso sea satisfactorio cuando se utilice por el técnico del laboratorio dental o el dentista (cumpliendo siempre con las especificaciones). Para lo anterior los productos dentales se someten a pruebas para cumplir con los requisitos de especificación. Cuando se clasifica un producto como aceptado, el fabricante esta autorizado a incluir en su etiqueta el rotulo de "aceptado por la ADA" <sup>29</sup>.

Tabla 5. Requeridos en Cementos de Base Acuosa, No. 96 de la ADA <sup>21</sup>

Tipo Químico	Aplicación	Espesor de Película máx. $\mu\text{m}$	Tiempo de Fraguado		Resistencia a la Compresión mín. MPa	Erosión Ácida máx. mm/h	Opacidad $C_{0.70}$		Contenido de Arsénico mg/kg	Contenido de Plomo mg/kg
			min	máx			min	máx		
Fosfato de Zn	Cementante	25	2.5	8	70	0.1	-	-	2	100
Policarboxilato de Zinc	Cementante	25	2.5	8	-	2.0	-	-	2	100
Polialquenoato de vidrio	Cementante	25	2.5	8	70	0.05	-	-	2	100
Fosfato de Zn	Base / Liner	-	2	6	70	0.1	-	-	2	100
Policarboxilato de Zinc	Base / Liner	-	2	6	70	2.0	-	-	2	100
Polialquenoato de vidrio	Base / Liner	-	2	6	70	0.05	-	-	2	100
Silicato	Restaurador	-	2	6	170	0.05	0.35	0.55	2	100
Silicofosfato	Restaurador	-	2	6	170	0.05	0.35	0.90	2	100
Polialquenoato de vidrio	Restaurador	-	2	6	130	0.05	0.35	0.90	2	100

La especificación No. 96 de la Asociación dental americana es la que regula todos los cementos de base acuosa y dentro de ellos clasifica al CIV de acuerdo a su uso en:

- Agente cementante
- Bases y forros cavitarios
- Material restaurativo <sup>19, 29</sup>

#### 1.3.5.1 Agente Cementante.

El CIV como agente cementante permite la unión de prótesis u otros dispositivos con el diente. Entre ellos existen las restauraciones de metal, metal – cerámicas y cerámicas; dispositivos ortodóncicos, pins y pernos utilizados para la retención de las restauraciones. Este cemento debe ser moldeable que selle el espacio y que una dos componentes entre si <sup>29</sup>.

Las propiedades de los cementos varían de uno de otro. Por ellos la elección del cemento se realiza en gran medida por las demandas biológicas y funcionales de una situación clínica en concreto. Si se requiere un aprovechamiento óptimo, a la hora de elegir un cemento para una función específica se deben tener en cuenta las propiedades biológicas y físicas, así como las características de la manipulación como: tiempo de trabajo, tiempo de fraguado, consistencia y facilidad de remover el exceso de material.<sup>19,29</sup>

#### 1.3.5.2 Bases y forros cavitarios.

**Agentes para protección pulpar.** Debido a que las restauraciones metálicas son excelentes conductoras térmicas y eléctricas, pueden provocar hipersensibilidad cuando se toman comidas o bebidas frías y/o calientes. Otros materiales restauradores, como los cementos con presencia de ácido fosfórico, las resinas compuestas de obturación directa y en algunos casos los CIV pueden provocar irritación química. También la filtración en la interfase producida por la contracción del endurecimiento de la amalgama o de la polimerización de las resinas compuestas puede provocar irritación pulpar<sup>19,29</sup>

Los recubrimientos cavitarios y las bases se han empleado en estas restauraciones para evitar estos tipos de agresión. Sirven además como barrera contra sustancias irritantes liberadas por los materiales restauradores y como agentes selladores contra la filtración en la interfase y por lo tanto, contra la invasión bacteriana asociada, por lo que el CIV también puede servir para prevenir la caries<sup>19,29</sup>

**Recubrimientos cavitarios.** El propósito inicial de los primeros recubrimientos cavitarios era aprovechar el efecto benéfico del hidróxido de calcio para acelerar la formación de dentina reparadora. Actualmente el CIV se puede usar también como recubrimiento o recubrimiento/base, colocándose en una capa fina en el piso de la cavidad dentaria. La función de estos ha sido ampliada para

poder servir como adhesivos en la interfase diente – restauración y como sellador dentario de la entrada de los microorganismos e irritantes en el transcurso de los procedimientos restauradores <sup>19,29</sup>.

**Base de cemento.** Las bases se aplican en capas mas gruesas (<0,75 mm) bajo las restauraciones para proteger la pulpa contra las agresiones térmicas, el galvanismo y las agresiones químicas, dependiendo de los materiales restauradores que se empleen. Además el material debe ser lo suficientemente fuerte como para soportar las fuerzas de condensación durante la colocación de la restauración y ser resistente a las fracturas que pueden ser provocadas por las fuerzas masticatorias que se transmiten a través de la restauración <sup>19,29</sup>.

#### 1.3.5.3 Material Restaurativo.

. El uso de este tipo de ionómero ha demostrado una alta durabilidad en la restauración de molares temporales con lesiones cariosas clase I y clase II. La mezcla de cemento restaurador se aplica con un instrumento (espátula) o puede ser inyectado directamente dentro de la preparación. Las cavidades se deben sobre obturar ligeramente con el cemento. Tras su colocación, la superficie se debe cubrir con una matriz de plástico para proteger el fraguado del cemento, de una perdida o ganancia de agua en los primeros momentos. Se debe dejar esta matriz colocada al menos durante 5 minutos, (aunque este tiempo puede variar dependiendo del tiempo de fraguado de los diferentes productos). Una vez que se ha retirado la matriz, la superficie se debe proteger inmediatamente mientras retiramos el exceso de material de los márgenes mediante el recortado. <sup>29</sup>.

#### 1.4 Biocompatibilidad *in vitro* del cemento de ionómero de vidrio.

Desde su aparición en el mercado, hace más de 30 años, los aspectos de biocompatibilidad del CIV han sido intensamente estudiados. En general, la citotoxicidad de los ionomeros convencionales, ha mostrado ser mínima en

estudios previos <sup>30</sup>. Por otro lado, los ionómeros modificados con resina han resultado ser citotóxicos y genotóxicos <sup>30</sup>.

Estudios realizados para evaluar la respuesta pulpar frente a cementos convencionales han mostrado resultados muy diversos. Por un lado existen evidencias de que el CIV convencional es biocompatible con el complejo dentino-pulpar, lo que significa que es bien tolerado y produce pocos daños al tejido pulpar por las siguientes razones: a) Los ácidos poliacrílicos son mucho más débiles que el ácido fosfórico, es decir, que los iones COOH son menos tóxicos que los iones H del ácido fosfórico. b) El ácido poliacrílico tiene mayor peso molecular, lo que limita su difusión en el interior de los túbulos dentinarios <sup>24</sup>.

Otros estudios sobre citotoxicidad en células pulpares en ensayos de MTT han demostrado que la concentración de iones liberados, como:  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  y  $\text{F}^{-}$  son demasiado bajas para tener un efecto citotóxico <sup>26</sup>.

El CIV ha sido usado desde 1970 y desde entonces varias de sus propiedades han sido investigadas. Existe evidencia de que los CIV ejercen propiedades antibacterianas que se relacionan con la liberación de fluoruro, sin embargo aún estos mecanismos no están del todo claros <sup>30</sup>.

Todos los biomateriales liberan componentes dentro del cuerpo y la gran mayoría de respuestas biológicas son probablemente medidas por esa liberación de componentes. Tal es el caso de los materiales cementantes, estos pueden aproximarse al periodonto en interfase de cemento, por lo tanto los efectos del material en células dentro de ese tejido son relevantes <sup>32</sup>.

Lo mismo pasa para materiales dentales implicados intracoronalmente, la presencia de dentina es crítica para la respuesta biológica vista en la pulpa cuando un material es puesto en la dentina. Algunos materiales restaurativos contienen componentes que pueden liberarse antes y en algunos casos después

del fraguado y que resultan citotóxicos, cuando son colocados en contacto cercano con células<sup>33-35</sup>.

Cualquier cosa que tenga contacto con dentina puede ser llevada dentro de la pulpa a través del “fluido dentinario” (sirviendo como un medio de transmisión de agentes a la pulpa), desencadenando algún tipo de respuesta. La velocidad de permeación de sustancias a través de la dentina depende del tamaño molecular del producto o de sus componentes. El área de superficie disponible para su difusión depende de la permeabilidad de los túbulos dentarios y del espesor de la dentina remanente<sup>36</sup>.

Sin embargo, la dentina puede además diluir y absorber componentes de un material antes de que llegue a la pulpa y teóricamente atenuar reacciones biológicas adversas del material. Un espesor moderado de dentina (1mm o más) puede proteger a las células pulpares *in vivo* de componentes químicos de tales materiales. En entorno experimental el espesor de dentina de 500 µm previene una mayor difusión. Como conclusión, se dice que las características de permeabilidad aumentan con incremento de espesor de dentina<sup>35</sup>

Los tres componentes del CIV que pueden provocar reacciones adversas son:

1. El material en sí.
2. Metales los cuales han sido añadidos a la formulación original.
3. Ácidos poliacrílicos.

Cada una de ellas, en teoría, puede provocar una respuesta indeseable o un efecto sinérgico<sup>30</sup>.

A continuación se enlistan 6 características del CIV relacionadas con su Biocompatibilidad<sup>30,37</sup>.

1. La degradación de productos liberados que se encuentra relacionado con el fraguado y las condiciones del mismo, como son el pH y la humedad.
2. Condiciones de fraguado, que consisten en tiempo entre el mezclado y la prueba, así como la humedad relativa, que confiere un papel decisivo para determinar la citotoxicidad.
3. Componentes de CIV convencionales y sus aplicaciones en diferentes situaciones.
4. Propiedades antibacterianas: que se le atribuye al CIV y se encuentran vinculadas principalmente a la liberación de fluoruro.
5. Efectos osteogénicos en la implantación de CIV. en defectos óseos con el fin de regenerar hueso.
6. Respuesta hospedera y reacción tisular con el tiempo, los efectos biológicos de los iones y otros componentes en el medio ambiente inmediato, (respuesta en pulpa, dentina y tejido periodontal) y efectos sistémicos con el paso del tiempo.

#### 1.4.1 Degradación de productos.

Algunos estudios demuestran que los CIV convencionales contienen iones que son lixiviados en diferentes tiempos y bajo diferentes condiciones y que existe la posibilidad de que algunos de estos iones contribuyan al efecto citotóxico del material <sup>30</sup>.

Tabla 6. Iones lixiviados de CIV

- **Fluoruro**
- **Sodio**
- **Sílice**
- **Calcio**
- **Aluminio**
- **Estroncio**

Iones que se liberan bajo diferentes ambientes y condiciones de tiempo.



*Fluoruro:* Su liberación es plenamente documentada pero hay pocos reportes, que hagan alusión a la liberación de otros elementos químicos <sup>38-40</sup>.

Wilson y col <sup>41</sup> mostraron que el CIV libera más sodio que fluoruro (aunque algunos CIV contengan menos sodio que fluoruro), la liberación de fluoruro se encuentra controlada por la liberación de sodio, probablemente para que la neutralidad sea preservada. Esto ha sido sustentado por los hallazgos de que la adición de NaF mejora la capacidad de CIV de liberar fluoruro <sup>42</sup>

La interacción de los electrolitos del material depositado en el diente (fluidos de dentina) podría verse disminuida por un decremento en la disponibilidad de iones lixiviados. Lo anterior fue demostrado en un reporte de que iones lixiviados F, Si, Al y Zn a altas concentraciones y con pH bajo en un cemento sin fraguar disminuye a medida que se acerca el fraguado. Hay gran liberación de fluoruro durante las primeras horas <sup>43</sup>.

*Aluminio.* Este se encuentra presente en varios productos de CIV y es liberado a largo plazo. Es el elemento inorgánico menos lixiviado del CIV. La cantidad liberada es tan baja que es poco probable que cause problemas de toxicidad <sup>44</sup>. No obstante no existen evidencias de que estas cantidades podrían ser peligrosas..

#### **1.4.2 El pH.**

La reacción inicial y temprana de CIV es lenta, el calcio y después el aluminio son los elementos que se liberan del vidrio, por lo tanto el pH inicial puede llegar a ser de 2.0 en 5min e incrementar hasta 3.0 a los 10 min <sup>45</sup>. En los productos de nueva generación de CIV es mucho más rápido el fraguado por lo que quizás este problema haya sido reducido.

Por otro lado las evaluaciones realizadas para determinar el pH del cemento, han mostrado que este va en aumento de un fraguado inicial a un fraguado completo<sup>39</sup>. Se considera que un pH ácido crea un medio ambiente ácido desencadenando la citotoxicidad por parte del cemento, mientras que en pH alcalino crea un medio ambiente óptimo para la remineralización y la eliminación de microorganismos<sup>46-47</sup>.

Por otro lado, los estudios realizados por Muller et al<sup>48</sup>, demostraron que la citotoxicidad ejercida por el CIV no se encuentra asociado a pH ácido. Además debe tomarse en consideración que la dentina actúa como un amortiguador para los cementos dentales.

### **1.4.3 Citotoxicidad.**

Dahl y Tronstad<sup>45</sup>, mostraron que las muestras de CIV recientemente preparadas presentaban un grado alto de toxicidad, pero pasadas 24 horas la toxicidad disminuía considerablemente.

En estudios de citotoxicidad *in vitro* de 2 CIV recién mezclados, se encontró que ambos materiales eran tóxicos para fibroblastos, pero la citotoxicidad de los cementos disminuía al aumentar el tiempo de fraguado, sin embargo se encontraron diferencias en la escala de tiempo y magnitud de la respuesta suscitada<sup>49, 50</sup>.

Otros estudios con CIV para base mostraron que existe una fuerte citotoxicidad en células pulpares después de 2 minutos. Sin embargo, esto muestra que la citotoxicidad con la reacción del fraguado y con menos de 60% de humedad relativa no se establece correctamente en algunos CIV después de 7 días entre la mezcla y su colocación ocasionando un aumento de solubilidad y citotoxicidad. Por lo tanto es necesario no solo estandarizar la colocación sino también estandarizar una simple preparación.

Caughman et al <sup>51</sup>, demostró que CIV cementante (Kelac-Cem®) no produce daño morfológico en células. En este estudio el CIV indujo menos citotoxicidad que las resinas evaluadas y fue el único material que permitió una directa fijación celular en la superficie de la muestra. Sin embargo, esto no fue totalmente inerte porque inhibió RNA y síntesis de proteínas en fibroblastos gingivales sin inhibición de síntesis en células epiteliales. Por lo tanto los autores concluyeron que el grado de influencia depende del tipo de célula, el porcentaje de relleno en el material y el grado de maduración <sup>52</sup>. Las implicaciones exactas de la inhibición de tales procesos necesitan ser esclarecidos.

#### **1.4.4 Reacciones Pulpares.**

Se ha relacionado a los CIV convencionales con la presencia de inflamación pulpar <sup>53, 54</sup>, los estudios revelan que esta respuesta pulpar es minima cuando el CIV se utiliza como material restaurador <sup>55, 56</sup>. Por otro lado Klötzer <sup>57</sup> concluyó que un material precursor del CIV es irritante, considerando menos irritabilidad de tejidos que los observados con materiales de silicato.

Paterson & Watts <sup>58</sup> encontraron inflamación severa después de aplicar CIV en exposiciones pulpares en dientes de ratas. Esto fue mostrado en repetidas ocasiones en experimentos realizados en animales (p.e. con monos), encontrando severas reacciones pulpares que ocurren después del uso de CIV en pulpas expuestas <sup>59</sup>. Lo anterior fue confirmado después por Tobias et al <sup>55</sup> quien demostró que los CIV causan irritación pulpar *in vivo*, pero dicha irritación desaparecía en 28 días. La razón puede ser que la toxicidad del material, se deba al contacto con el medio ambiente húmedo de la pulpa, ocasionando modificaciones en el fraguado del material.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿De que manera el cemento de Ionómero de vidrio y sus extractos en medio de cultivo Influyen en la viabilidad, morfología y adhesión de fibroblastos gingivales en ensayos *in vitro*?

## III. JUSTIFICACION

Es necesario ejercer un gran control sobre la utilización de los Biomateriales, por lo cual existen organismos encargados de la estandarización y normalización de estos materiales, con los correspondientes acuerdos internacionales. Dentro del campo de los Biomateriales Odontológicos, se pueden citar como los más importantes la Asociación Dental Americana y la Organización Internacional de Estandarización.

Podemos asumir que no se están utilizando materiales que presenten ninguna duda en cuanto a su biocompatibilidad, sin embargo y ya de que se trata de mantener la integridad del ser humano, es necesaria la evaluación biológica de ellos. La utilización de materiales diversos en la odontología ha incrementado su variedad (la cual va desde materiales metálicos, materiales cementantes, cerámicos e incluso materiales compuestos), ante la necesidad de restablecer la perdida en la integridad del órgano dentario debido a la presencia de la caries y la enfermedad periodontal.

El uso clínico de los cementos de ionómero de vidrio permanece vigente en nuestros días luego de más de tres décadas, gracias a sus propiedades relativas a su naturaleza hidrofílica, adhesión a la estructura dentaria y habilidad para liberar iones de flúor <sup>19</sup>, constituyéndose en un material versátil indicado para restauraciones preventivas, como base y material para cementado de preparaciones metálicas o poliméricas.

Por otro lado, los estudios realizados han confirmado que los ionómeros de vidrio poseen un gran efecto inhibitorio de la caries dental *in vitro*, Sin embargo en lo que respecta a su biocompatibilidad aun es un tema contradictorio por la cantidad de información que muestran resultados muy diversos y que aun genera confusión sobre si existirá o no algún efecto a largo plazo en el paciente <sup>30</sup>.

Asimismo, la liberación de fluoruro es plenamente documentada <sup>30, 31</sup> existiendo pocos reportes sobre otros elementos (Al, Ca, Na, Zn, K), que se liberan del CIV y su efecto citotóxico por lo que es necesario profundizar sobre este tema.

Lo anterior confirma el riesgo inherente de que el CIV y otros materiales dentales generen una respuesta tanto a nivel local como sistémico, ya sea a menor o mayor grado, tanto en el paciente como en el personal de trabajo (los odontólogos asumen un riesgo legal al utilizarlos)..

En los últimos 30 años, el público y varios organismos gubernamentales han solicitado pruebas que demuestren que los materiales utilizados en odontología sean biológicamente seguros y efectivos <sup>45</sup>. Desafortunadamente, determinar la biocompatibilidad de un material es un tema sumamente complejo, que implica el uso de múltiples ensayos, los cuales en su mayoría son costosos y complicados. A pesar de estos inconvenientes las pruebas de biocompatibilidad continúan siendo el único medio por el cual se puede asegurar la seguridad o no de un material.

#### IV. HIPÓTESIS.

El Ionómero de vidrio y los extractos obtenidos del medio de cultivo repercutirán en la viabilidad, morfología y adhesión de fibroblastos gingivales en cultivos *in vitro*.

#### V. OBJETIVOS.

##### 5.1 GENERAL.

- Evaluar la respuesta biológica que presentan fibroblastos gingivales en contacto con el cemento de ionómero de vidrio experimental y sus extractos en medio de cultivo, comparándolo con un CIV comercial.

##### 5.2 ESPECÍFICOS.

- Realizar control de calidad de acuerdo a la norma No. 96 de la ADA al CIV experimental.
- Determinar la variación del el pH de CIV comercial y experimental en medio acuoso y en medio de cultivo.
- Análisis de la superficie de los CIV experimental y comercial,.
- Determinar los elementos químicos liberados (Al, Ca, Na, Zn, K) del ionómero de vidrio en medio de cultivo.
- Determinar la viabilidad, adhesión y cambios morfológicos de fibroblastos gingivales cultivados *in vitro* en presencia del Ionómero y sus extractos en medio de cultivo, mediante ensayos de viabilidad, citotoxicidad celular y microscopia óptica.

## VI. MATERIAL Y METODOS.

### 6.1 Tipo de estudio.

Experimental y descriptivo.

### 6.2 Operacionalización de Variables.

<p>Variables dependientes:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Liberación de Iones</li><li>• Viabilidad celular</li><li>• Citotoxicidad</li><li>• Morfología celular</li></ul>	<p>Variables independientes:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• CIV comercial Mirafill® y CIV experimental</li><li>• Porcentaje de extractos de los CIV</li><li>• Numero de células cultivadas</li><li>• Ensayos con Alamar Blue (AB)</li></ul>
--	--

### 6.3 Universo de estudio.

Dos Ionómeros de vidrio convencionales usados para cementación y cultivos celulares de fibroblastos gingivales humanos.

### 6.4 Selección de Muestras.

1. Cementos de Ionómero de vidrio:  
Experimental.  
Comercial (Mirafill®).
2. Células: Fibroblastos Gingivales Humanos.

### 6.5 Criterios de Selección.

- CIVe hecho en el laboratorio de DEPEl de la Facultad de Odontología.
- CIVc de la marca Mirafill®
- Cultivo primario de Fibroblastos gingivales.

#### 6.5.1 Criterios de Inclusión.

Cementos de Ionómero de vidrio convencionales usados para cementación (experimental y comercial).

Cultivos primarios y subcultivos de Fibroblastos Humanos Gingivales.

#### 6.5.2 Criterios de exclusión.

Cementos de Ionómero de vidrio no convencionales usados para cementación.

Cultivos celulares.

- Líneas celulares.

Los estudios de viabilidad y citotoxicidad se engloban dentro de los estudios de biocompatibilidad de un material. Los métodos utilizados para determinar tanto la viabilidad como la citotoxicidad del cemento de Ionómero de vidrio fueron los ensayos de viabilidad y citotoxicidad *in vitro* por contacto directo e indirecto descritos en la norma ISO 10993-5 e ISO 7405.

#### 6.6 Síntesis del Cemento de Ionómero de vidrio Experimental.

La base para la fabricación de este material fue la formulación dada en el traslado de tecnología que se realizó a la compañía Viarden® S.A.[i], en el año 2006, la cual básicamente está conformada por una base inorgánica compuesta de  $Al_2O_3$ ,  $SiO_2$ ,  $CaF_2$ ,  $AlF_3$ ,  $AlPO_4$ ,  $NaAlF_6$  y una fase ácida compuesta de poliácido acrílico, itacónico, maléico y tartárico. Esta formulación por ser de carácter confidencial no puede mencionarse detalladamente en cuanto a porcentajes y método de obtención.

#### 6.7 Preparación de Muestras de CIV.

Instrumental:

- Loseta de vidrio gruesa.
- Espátula No. 322, para cementos, 1 extremo, flexible. No. 23556 Tarno, Hu - Friedy
- Balanza gravitacional marca OHAUS No. AR3130
- Cronómetro digital marca Extech Mod. 365510

[i] Convenio de transferencia de tecnología Número de Registro DGAJ-SJPI-161204-315.



Basados en los lineamientos establecidos por la Norma No. 96 de la ADA, la preparación de muestras se realizó de la siguiente forma:

Cada muestra del cemento se preparó en una habitación a una temperatura de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  y humedad relativa de  $50 \pm 5\%$ .

#### 6.7.1 CIV experimental.

Utilizando una proporción polvo – líquido en peso de 3:2.5, se mezcló el polvo y el líquido durante 30 segundos para obtener una mezcla homogénea y llevarla a un molde de acero inoxidable con dimensiones internas de  $6 \text{ mm} \pm 0.1$  de altura y  $4 \text{ mm} \pm 0.1$  de diámetro. Se colocó el molde con el material en una cámara con temperatura y humedad controlada ( $37 \pm 1^\circ\text{C}$  y 90%) por espacio de una hora, después se colocó la muestra en inmersión con agua desionizada y se conservó en una estufa a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  durante  $23 \pm 0.5$  horas para posteriormente, utilizarlas en los ensayos de biocompatibilidad.

#### 6.7.2 CIV comercial.

Para la fabricación de muestras, se manipuló el CIV Mirafill® (Faprodmir, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando una proporción en peso polvo – líquido de 3:1 con el fin de comprar pH, análisis por MEB y ensayos de biocompatibilidad.

#### 6.8 Control de calidad Norma ADA No. 96.

De acuerdo a la metodología establecida en la Norma No 96 de la ADA, se prepararon 5 muestras del CIV experimental para cada una de las siguientes pruebas.

### 6.8.1 Prueba de espesor de película:

Con un micrómetro (Mitutoyo, Japan) se midió el grosor combinado de dos placas de vidrio planas (con un área de contacto de  $20 \text{ mm}^2 \pm 25 \text{ mm}^2$  y grosor de cada placa de 5 mm) y se registró (1ra lectura), se retiró la placa superior y se colocó  $0.1 \text{ ml} \pm 0,05 \text{ ml}$  del cemento mezclado en la placa inferior, se cubrió con la otra placa y 10 segundos antes de que concluyera el tiempo de trabajo, se aplicó sobre el centro de la muestra una carga de  $150\text{N} \pm 2\text{N}$ . Diez minutos después se retiraron las placas y se midió el grosor combinado de las dos placas de cristal y de la película de cemento (2da lectura). El resultado se obtuvo sacando la diferencia del grosor de las placas con y sin película de cemento.

### 6.8.2 Prueba de resistencia a la compresión:

Se utilizó un molde de acero inoxidable de  $6 \text{ mm} \pm 0.1\text{mm}$  altura y  $4\text{mm} \pm 0.1\text{mm}$  de diámetro. El cemento se colocó en el molde y este entre dos placas metálicas, se prensó y se transfirió a una estufa a  $37^\circ \pm 1^\circ\text{C}$  y 90% de humedad relativa. Una hora después se retiraron las muestras y se colocaron en agua desionizada en una cabina a  $37^\circ \pm 1^\circ\text{C}$  durante  $23 \pm 0.5$  horas. Después de ese tiempo se calculó el diámetro de cada muestra y se llevaron a una Máquina Universal de Pruebas mecánicas Instron (Modelo 5567) donde se les aplicó carga compresiva a una velocidad de 1 mm/min. Se registró el valor cuando la muestra se fracturó y la resistencia a la compresión se calculó con la siguiente ecuación:

$$C = \frac{4p}{\pi \times d^2}$$

Donde:

p= carga máxima aplicada (newtons)

d= diámetro de la muestra (mm)

### 6.8.3 Prueba de erosión ácida

Se elaboraron muestras como en la prueba de compresión y se colocaron en un frasco con papel filtro húmedo manteniéndolo a  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $23 \pm 0.5$  horas. Se preparó una dilución de ácido láctico ( $20 \pm 1 \text{ mmol/l}$ ) con pH de  $2.7 \pm 0.02$ .

Se colocaron las muestras en el soporte del aparato de erosión y con un micrómetro (Mitutoyo, Japan), se les midió la profundidad tomando el valor promedio de 5 lecturas en diferentes zonas de la superficie de la muestra y se registró como D1. Se colocó la dilución de ácido láctico en el aparato, y se inició la circulación del líquido dejando caer  $120 \text{ ml/min} \pm 4 \text{ ml/min}$  sobre cada muestra durante 24 horas. Se midió la profundidad D2 como se describió previamente y como resultado final se calculó la erosión (R) en milímetros por hora con la siguiente ecuación.

$$R = \frac{D_2 - D_1}{t}$$

Donde

D1 y D2 son las lecturas previamente hechas (mm)

t = tiempo de erosión (horas)

### 6.8.4 Prueba de tiempo de fraguado.

Los CIV mezclados se colocaron en un molde de acero inoxidable, procurando un buen contacto entre el molde y el cemento. Posteriormente las muestras se llevaron a la estufa Hanau ( $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$  y  $90 \pm 5\%$  de humedad relativa), posteriormente en intervalos de 30 segundos, se hicieron indentaciones con la aguja de Gillmore con un peso de  $400 \pm 5 \text{ g}$  y una punta de  $1 \pm 0.01 \text{ mm}$  hasta que la aguja ya no hiciera indentaciones circulares completas. El tiempo de fraguado neto se registró como el tiempo transcurrido entre el fin de la mezcla y cuando la aguja ya no hizo una indentación completa de forma circular en el cemento. Se realizaron tres determinaciones por cada muestra de ambos CIV.

## 6.9 Análisis de la superficie de CIV por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).

El MEB brinda información sobre la superficie de la muestra y nos permite obtener una imagen topográfica de ella utilizando electrones retrodispersados. Este instrumento está diseñado para estudiar en alta resolución la superficie de sólidos con la ventaja ya que con la interacción de electrones con la muestra se obtiene información sobre orientación cristalina, composición química, estructura magnética o potencial eléctrico del material.

El funcionamiento del equipo está basado en el hecho de barrer la muestra con un haz electrónico de sección transversal y de alta energía y generar una imagen punto por punto. Las muestras se observaron en un Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JSM5600LV), a distintos aumentos: 50x, 500x y 1000x. Para lo cual se prepararon 5 muestras de CIV experimental y 5 de CIV comercial bajo las mismas condiciones que se explicaron anteriormente. Posteriormente se les colocó a cada una una papel Parafilm M® para protegerlas y mantener su estabilidad dimensional e hidratadas.

## 6.10 Medición de pH en CIV.

Se utilizó un medidor de pH (HANNA ® 213 pH) el cual se calibró antes de medir el pH. Se usó una sustancia tampón de pH 4 (HCl). Se retiró el electrodo de la solución de almacenamiento, se enjuagó y se secó con un papel suave; después se colocó la solución tampón inicial, y se ajustó el punto isopotencial. Posteriormente se seleccionó un segundo tampón pH 7, se repitió el mismo procedimiento que el anterior y se utilizó un tercer tampón pH 14.<sup>54</sup> Hecho lo anterior, la muestra (previamente triturada), fue colocada en agitación tanto en agua Milli Q como en el Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), para garantizar la homogeneización. Se sumergió el electrodo en la muestra y se registró el pH; Para leer el pH se utilizaron muestras recién preparadas para cada tiempo de medición (12, 24, 36, 48 y 72 horas).

## 6.11 Análisis de Medio de cultivo por Espectroscopia de Absorción Atómica (EAA).

La espectroscopia de absorción atómica (EAA), es un método instrumental de la química analítica que determina una gran variedad de elementos metálicos en soluciones acuosas y tiene como fundamento la absorción de radiación de una longitud de onda determinada. Esta radiación es absorbida selectivamente por átomos que tengan niveles energéticos cuya diferencia en energía corresponda en valor a la energía de los fotones incidentes. La cantidad de fotones absorbidos, está determinada por la ley de Beer, que relaciona ésta pérdida de poder radiante, con la concentración de la especie absorbente y con el espesor de la celda o recipiente que contiene los átomos absorbedores<sup>60, 61</sup>.

Los componentes instrumentales de un equipo de espectrofotometría de absorción atómica son los similares a los de un fotómetro o espectrofotómetro de flama, excepto que en EAA se requiere de una fuente de radiación necesaria para excitar los átomos del equipo<sup>60, 61</sup>.

La técnica de absorción atómica en flama consta de lo siguiente: La muestra de medio de cultivo (previamente preparado junto con muestras de CIV), es aspirada a través de un tubo capilar y conducida a un nebulizador donde ésta se desintegra y forma un rocío o pequeñas gotas de líquido.

Las gotas formadas son conducidas a una flama, donde se produce una serie de eventos que originan la formación de átomos. Estos átomos absorben cualitativamente la radiación emitida por la lámpara y la cantidad de radiación absorbida está en función de su concentración<sup>60, 61</sup>.

La señal de la lámpara una vez que pasa por la flama llega a un monocromador, que tiene como finalidad el discriminar todas las señales que acompañan la línea de interés. Esta señal de radiación electromagnética llega a un detector o transductor y pasa a un amplificador y por último a un sistema de lectura<sup>60, 61</sup>.

## 6.12 Cultivo celular de fibroblastos gingivales humanos.

Se utilizaron fibroblastos gingivales humanos los cuales son células ampliamente utilizadas en los estudios biológicos dentro del área odontológica. Para el cultivo, inicialmente se colocaron las células en frascos de cultivo junto con 7 ml de medio de cultivo DMEM el cual fue suplementado previamente con 10% de suero bovino fetal Gibco (SFB) y un 1% de penicilina/estreptomicina de Sigma. Las células se mantuvieron a 37° C en un incubador bajo una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo fue cambiado rutinariamente cada 3 días para el mantenimiento de las células. Entre el día 4 y 5 se observó una confluencia adecuada de las células con una distribución en monocapa. El estímulo de crecimiento y diferenciación se produce gracias a su relación con otras células vecinas que cesa con la saturación de la monocapa (inhibición por contacto) cuando se llega a máxima confluencia.

Alcanzada una confluencia de aproximadamente un 80% se procedió al subcultivo que es el traspaso de las células a nuevos frascos de cultivo. Se aspiró el medio de cultivo y se hicieron 2 lavados con solución salina taponada (PBS 1x) Se añadió 5 ml de tripsina - ácido etilendiaminotetraacético (tripsina-EDTA), durante aproximadamente cinco minutos y se incubó a 37° C hasta que se observó que las células se habían desprendido del fondo de la placa. La tripsina es una enzima proteolítica que actúa degradando las proteínas que sirven de unión entre las células de cultivo en un tiempo aproximado de 30 segundos.

Una vez tripsinizadas, para inactivar la tripsina se añadió como mínimo la misma cantidad medio DMEM con 10% de SFB para neutralizar la reacción de tripsinización. Se recogió toda la solución en un tubo y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos. Después del centrifugado se eliminó el sobrenadante y el *pellet* de células se resuspendió en medio fresco y se repartió en otros frascos de cultivo. Cuando los fibroblastos confluyeron de nuevo, se realizó otro subcultivo hasta obtener el número total de células requeridas para esta investigación ( $1 \times 10^7$ ).

### 6.11.1 Conteo celular.

Una vez que las células se desprendieron, con una pipeta se tomaron las células y se centrifugaron para separarlas del DMEM y la tripsina. Terminado esto se retiró el líquido cuidando de no tocar el botón celular y se colocó 1 ml de DMEM resuspendiendo las células y posteriormente se tomaron 10  $\mu$ l de fibroblastos. Se esa cantidad en un hematocitómetro (Cámara de Neubauer) y se añadió 5  $\mu$ l de azul de tripan para distinguir las células muertas y solo contar las vivas.

Esta cámara, dispone de 4 cuadrados de 1 mm de lado, cada uno dividido en 16 cuadrados más pequeños (Figura 3). Por encima y tapando la gota de la solución, se coloca un cubreobjetos que permite un espacio de altura de 0.1 mm, de modo que el volumen del líquido que se aloja en cada cuadrado es de  $1 \times 1 \times 0.1 \text{ mm}^3$  ( $10^{-4} \text{ cm}^3$  que aproximadamente es  $10^{-4} \text{ ml}$ ). Por consiguiente la concentración de células por mililitro será el número de células contadas en cada cuadrado y multiplicado por  $10^4$ , o expresado en la fórmula el número total de células.

Después del conteo celular por cuadrante, se usó la siguiente ecuación para sembrar  $4 \times 10^4$  células en cada pozo.

$$\frac{n^{\circ} \text{ de células}}{n^{\circ} \text{ de cuadrados}} \left( 10^4 \times \text{volumen total} \right)$$

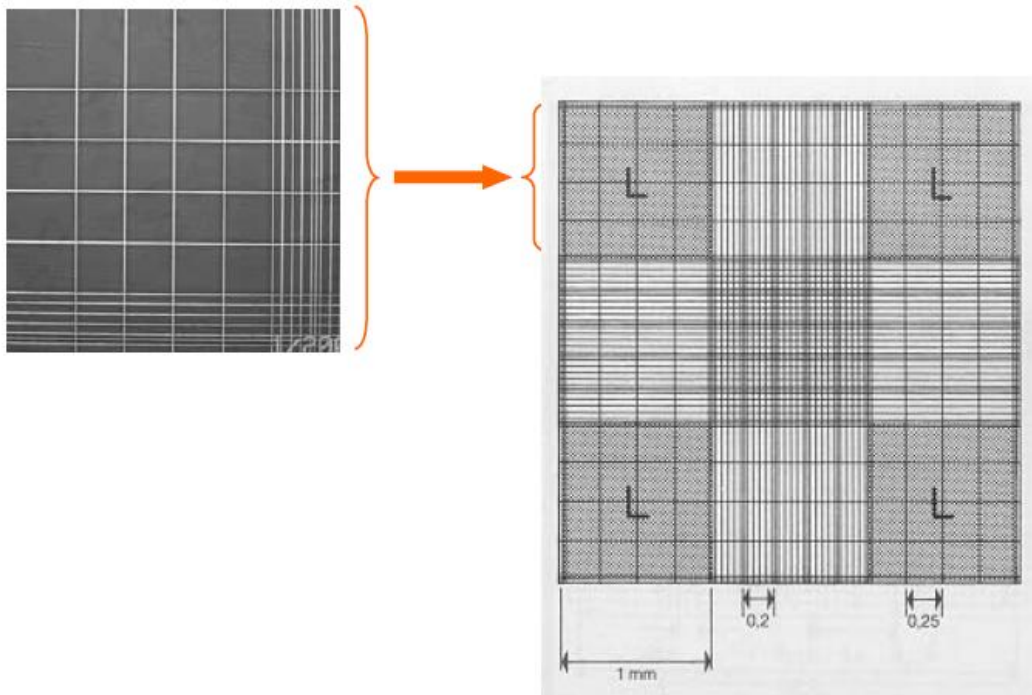


Figura 3 Cuadros de la Cámara de Neubauer

Fuente: Ramírez, A. Estudio celular y molecular en cultivos de fibroblastos tratados con fármacos inductores de agrandamiento gingival. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. 2007; 157.

### 6.13 Ensayos de Biocompatibilidad *in vitro*.

#### 6.13.1 Ensayo por contacto directo.

En base a la norma ISO 10993 – 5, se estudió el efecto del cemento de ionómero de vidrio (experimental y comercial) sobre la viabilidad celular de fibroblastos gingivales para determinar si su efecto induce algún cambio proliferativo en las poblaciones celulares que justifique el daño celular por contacto directo.

Se prepararon 15 muestras de CIV Experimental y 15 de CIV comercial bajo condiciones controladas (como en control de calidad) y se esterilizaron previamente con rayos U.V. durante 12 horas para eliminar todo tipo de microorganismos. Para la evaluación de la actividad metabólica (viabilidad) de los cultivos celulares se utilizó el marcador vital Alamar Blue.



Posteriormente se prepararon 15 muestras de PVC y 15 de Alúmina (grupos controles), con las mismas dimensiones de las muestras de CIV (4mm de diámetro y 6 mm de longitud). Se esterilizaron durante 12 horas con rayos U.V.

Todas las muestras se colocaron en cajas de cultivo de 24 pozos junto con  $4 \times 10^4$  células. Las cajas de pozos con el material y células se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$  durante 12, 24, 36, 48 y 72 horas. Se colocó 10x de volumen de Alamar Blue 4 horas antes del término de cada periodo.

Finalizado cada periodo se llevaron los cultivos con Alamar Blue metabolizado a un espectrofotómetro midiéndose a una longitud de onda de 570 nm. Las absorbancias del medio de cultivo se restaron a los cultivos celulares y como resultado final se reportaron las absorbancias de manera gráfica.

#### 6.13.2 Ensayo por contacto indirecto.

En base a la norma ISO 10993-5, se realizaron estos ensayos bajo el siguiente procedimiento.

Se prepararon extractos de CIV experimental y CIV comercial en medio de cultivo ( $37^\circ\text{C}$  durante 72 horas). La norma indica que el área que debe estar en contacto con 1 mm de medio es de  $3\text{cm}^2$  en sólidos, por lo que en base a las dimensiones de las muestras de CIV se calculó esa área y se colocaron en 25 ml de DMEM, para cada tipo de CIV.

De estos extractos se realizaron las siguientes diluciones: Extracto al 100%, 50%, 10%, 1% y 0.1%. Se sembró la misma cantidad de células que el ensayo anterior y después de 4 horas se retiró el medio y se colocó nuevo medio junto con las diluciones. Al mismo tiempo se realizó una curva patrón de proliferación celular a las 24 horas (figura 4), en la cual se colocaron distintas cantidades de células (de 300 a 50,000).

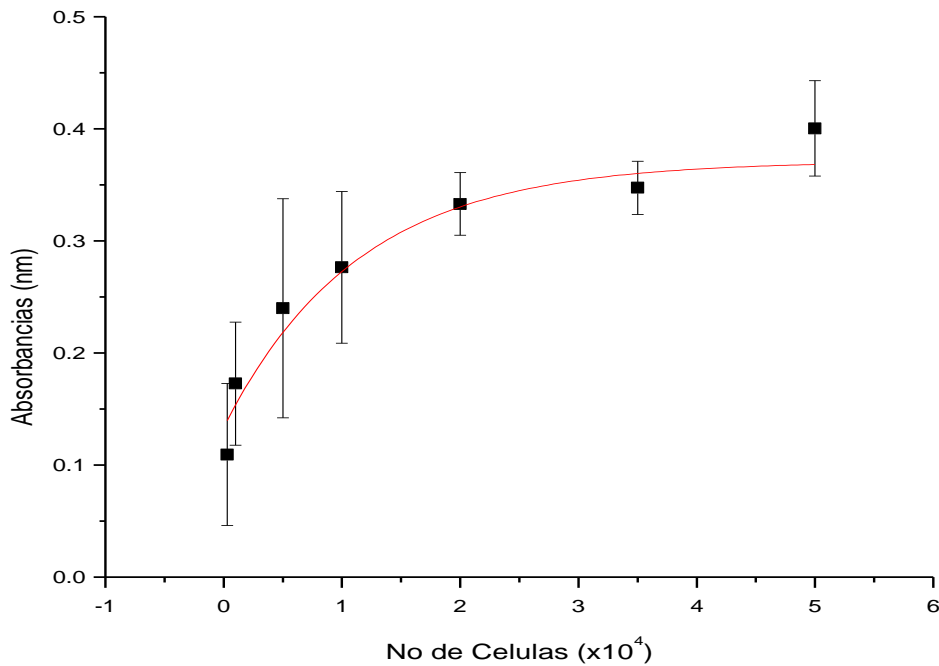


Figura 4. Curva patrón de proliferación celular a las 24 horas. Se sembraron de 300 a 50,000 células registrando su absorbancia.

Las cajas de pozos con las diluciones y células se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas; como control positivo se utilizó cloro y como control negativo solo medio de cultivo. Posteriormente se colocó 10x de volumen de Alamar blue 12 horas antes del término del tiempo de incubación.

Finalizado el tiempo de incubación se llevaron los cultivos a un espectrofotómetro y se midió a una longitud de onda de 570 nm. Las absorbancias del medio de cultivo se restaron a las absorbancias de los cultivos celulares como resultado final. Posteriormente estas absorbancias se localizaron en la curva patrón para saber la cantidad de células vivas en los cultivos con ambos extractos de CIV y los cultivos controles.

De acuerdo a la norma ISO 10993-5 de citotoxicidad en la cual se establecen cuatro grados de citotoxicidad. Con base a los datos obtenidos se

estableció el grado de citotoxicidad en función del número de células utilizadas para el ensayo como se observa en la siguiente tabla.

Tabla 7. Escala de Citotoxicidad Norma ISO 10993-5.

ESCALA DE CITOTOXICIDAD	
0 = No TÓXICO	40,000 – 38,000 células
1 = Moderadamente TÓXICO	37,999 – 20,000 células
2 = Medianamente TÓXICO	19,999 – 1000 células
3= Severamente TÓXICO	999 o menos células

#### 6.14 Análisis de cultivos celulares por Microscopia Óptica.

Para la observación de cultivos celulares en los ensayos de biocompatibilidad *in Vitro* se utilizó un microscopio invertido 100 – 120V de cuerpo básico TS – 100 – F. Se colocaron las cajas de cultivo en la platina y se hicieron observaciones con un aumento de 20x al término de cada periodo de experimentación y posteriormente se tomaron fotografías con la cámara fotográfica digital (DS-Fi1-U2, marca Nikon) del microscopio.

#### 6.15 Análisis Estadístico.

Los ensayos de contacto directo e indirecto se realizaron por triplicado, dando un total de 15 muestras de CIV experimental y 15 de CIV comercial para los ensayos de contacto directo. En el caso del ensayo de contacto indirecto se prepararon las muestras necesarias para 25 ml de DMEM (3 muestras de CIV con 15 mm<sup>2</sup> de diámetro y 1.5 mm<sup>2</sup> de altura). Con este extracto (100%) se realizaron las diluciones antes mencionadas. Con las cuantificaciones obtenidas se realizó el análisis estadístico usando ANOVA y como prueba de rango múltiple post hoc el análisis de Tukey para determinar diferencias

significativas de la viabilidad y citotoxicidad *in vitro* del CIV experimental en comparación con el CIV comercial con un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ .

## 6.16 Recursos.

### 6.16.1 Recursos materiales.

- Infraestructura del Laboratorio de Biomateriales del Instituto de Investigación en Materiales UNAM.
- Infraestructura y equipo para ensayo de viabilidad del Laboratorio de Biología del Citoesqueleto de Parásitos de la Facultad de Medicina UNAM.
- Apoyo por parte del personal del Laboratorio de Materiales dentales de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología UNAM.

## VII. RESULTADOS.

### 7.1 Control de Calidad de CIV según Norma No. 96 ADA.

Los resultados del control de calidad del CIV experimental mostrados en la tabla 8 indican que el CIV experimental se sitúa dentro de los parámetros establecidos en la prueba de tiempo de fraguado. En resistencia a la compresión supera el valor mínimo de MPa que establece la norma. En espesor de película, no supera el límite máximo de la norma y finalmente, en la prueba de erosión, ácida tampoco supera el límite impuesto por lo que el material cumple con los requerimientos de la ADA.

Tabla 8 Control de Calidad, Norma No 96 de la ADA

Control de Calidad (Pruebas)	Norma No. 96 ADA	CIV Experimental
Tiempo de fraguado	min. y Max 2.5 – 8 minutos	4.19 minutos
Resistencia a la compresión	min. 70 MPa	83.5 MPa
Espesor de película	25 $\mu\text{m}$ Max	20 $\mu\text{m}$
Erosión Acida	0.05 mm/h Max	0.0087 mm/h

### 7.2 Análisis de superficie de CIV por MEB.

Las imágenes de MEB mostraron que el CIV comercial presenta fisuras y grietas en la superficie (Figura 5A), las cuales a mayor aumento se ven con mayor definición y existe una conexión entre todas (figura 5B), estas grietas y fisuras se pueden observar mas detalladamente en figura 5C destacando la presencia de cuerpos sólidos radiolucidos y pequeños poros. Las observaciones realizadas en el CIV experimental (figura 5D) indican presencia pequeñas fisuras mayor homogeneidad en la superficie. Conforme va en aumento se observan pocas

grietas con una gran cantidad de poros (figura 5E) que se pueden ver con mas detalle en la figura 5F.

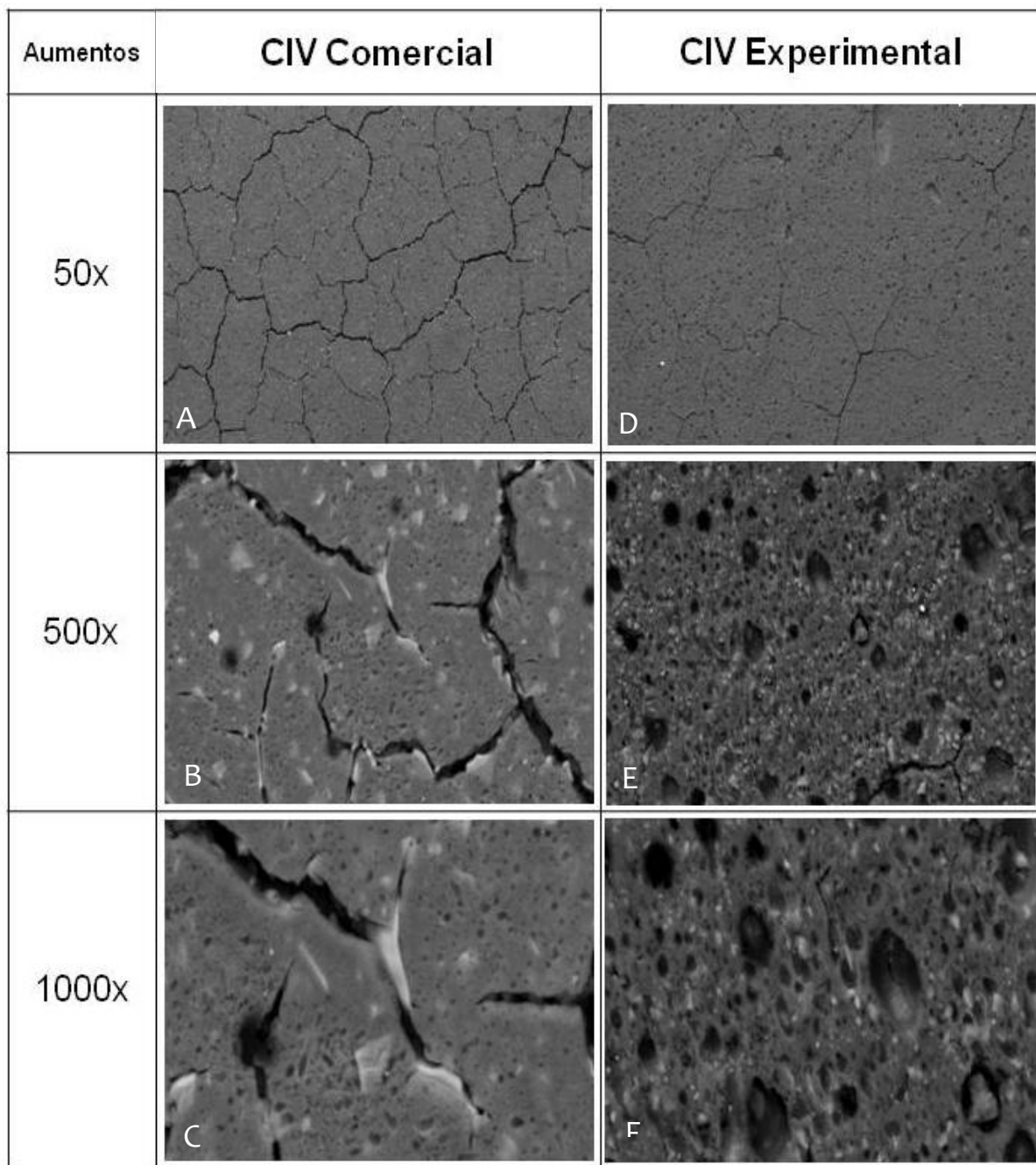


Figura 5. Imágenes con electrones retrodispersados obtenidas con el MEB JEOL JSM5600LV de la microestructura de CIV experimental y comercial (Mirafill ®) después de  $23 \pm 1$  horas de fraguado, Se observan grietas y fisuras en CIV comercial (5A – 5C). En CIV experimental (5D – 5F) hay pocas fisuras y una gran cantidad de poros.

### 7.3 Medición de pH.

En la tabla 9 se indica que el pH en ambos cementos es ácido durante las primeras horas y conforme pasan el tiempo este va en aumentando tendiendo a la neutralidad desde el tiempo inicial hasta las 72 horas. Sin embargo los valores de pH del CIV comercial estaban siempre por encima de los del CIV Experimental.

Tabla 9. Promedios de pH de los CIV comercial y experimental.

Hora \ Material	Inicial	12	24	36	48	72
CIV Comercial	5.57± 0.03	5.71± 0.03	5.93± 0.03	6.16± 0.06	6.33± 0.03	6.59± 0.04
CIV Experimental	5.43± 0.03	5.61± 0.01	5.77± 0.00	5.91± 0.03	6.14± 0.01	6.38± 0.02

En lo referente al pH del medio de cultivo en contacto con el CIV comercial y experimental se encontró que ambos CIV modifican el pH inicial del medio de cultivo (7.41). El medio de cultivo con CIV Experimental cambia de pH así como el medio de cultivo con CIV comercial manteniendo un pH ligeramente ácido dentro de los parámetros de la neutralidad como se observa en la tabla 10.

Tabla 10. Promedios de pH de medio de cultivo con CIV comercial y experimental.

Hora \ DMEM	Inicial	12	24	36	48	72
CIV Comercial	7.41± 0.00	7.36± 0.02	7.33± 0.02	7.19± 0.01	7.18± 0.00	7.18± 0.00
CIV Experimental	7.41± 0.01	7.26± 0.02	7.03± 0.02	6.81± 0.19	6.69± 0.12	6.69± 0.12

#### 7.4 Análisis del Medio de Cultivo por Espectroscopia de Absorción Atómica (EAA).

Los elementos químicos que se analizaron del CIV comercial y experimental en Medio de Cultivo fueron  $Al^3$ ,  $Ca^2$ ,  $Na^+$ ,  $Zn^2$ ,  $K^+$ . Además en base a la Norma 96 de la ADA se analizó si existía la presencia de  $Pb^{2, 4}$  y  $As^{±3,5}$ . Esta técnica no detectó Pb y As en muestras de Medio de cultivo de ambos CIV. En el medio con CIV experimental se detectó aluminio pero en medio con CIV comercial no se detectó este elemento, La cantidad detectada de calcio fue mayor en el CIV comercial mientras que el potasio no se detectó en ambos medios con ionómetro. Con respecto al sodio las cantidades encontradas son muy semejantes entre las muestras y el zinc se encontró en mayor cantidad en el medio con CIV experimental.

Tabla 11. Espectroscopia de Absorción Atómica en Medio de cultivo con CIV.

ELEMENTOS QUIMICOS	MEDIO DE CULTIVO (DMEM) ug/mL*	MEDIO DE CULTIVO CON CIV EXPERIMENTAL ug/mL	MEDIO DE CULTIVO CON CIV COMERCIAL ug/mL
Arsénico	N.D	N.D	N.D
Plomo	N.D	N.D	N.D
Aluminio	N.D	8.0	N.D
Calcio	55.0	67.0	86.0
Sodio	3,416.0	3,444.0	3,442.0
Zinc	N.D	0.4	0.2
Potasio	78.0	N.D	N.D

NOTA: \* La técnica usada es Espectrofotometría de Absorción Atómica con Flama y las unidades reportadas se expresan basándose en el sistema internacional por lo que la unidad ug/mL, ug/g, mg/L o mg/kg es equivalente a ppm. N.D. No detectable a concentraciones menores al límite de detección: Arsénico 0.002 µg/mL Plomo 0.2 ug/mL Aluminio 0.7 ug/mL Potasio 0.5 ug/mL



## 7.5 Ensayos de Biocompatibilidad *in Vitro*.

### 7.5.1 Contacto Directo (Viabilidad).

Los resultados del ensayo por contacto directo registrando la viabilidad celular con Alamar Blue en la figura 5 indican el comportamiento que tienen las células en presencia y ausencia del CIV experimental y comercial.

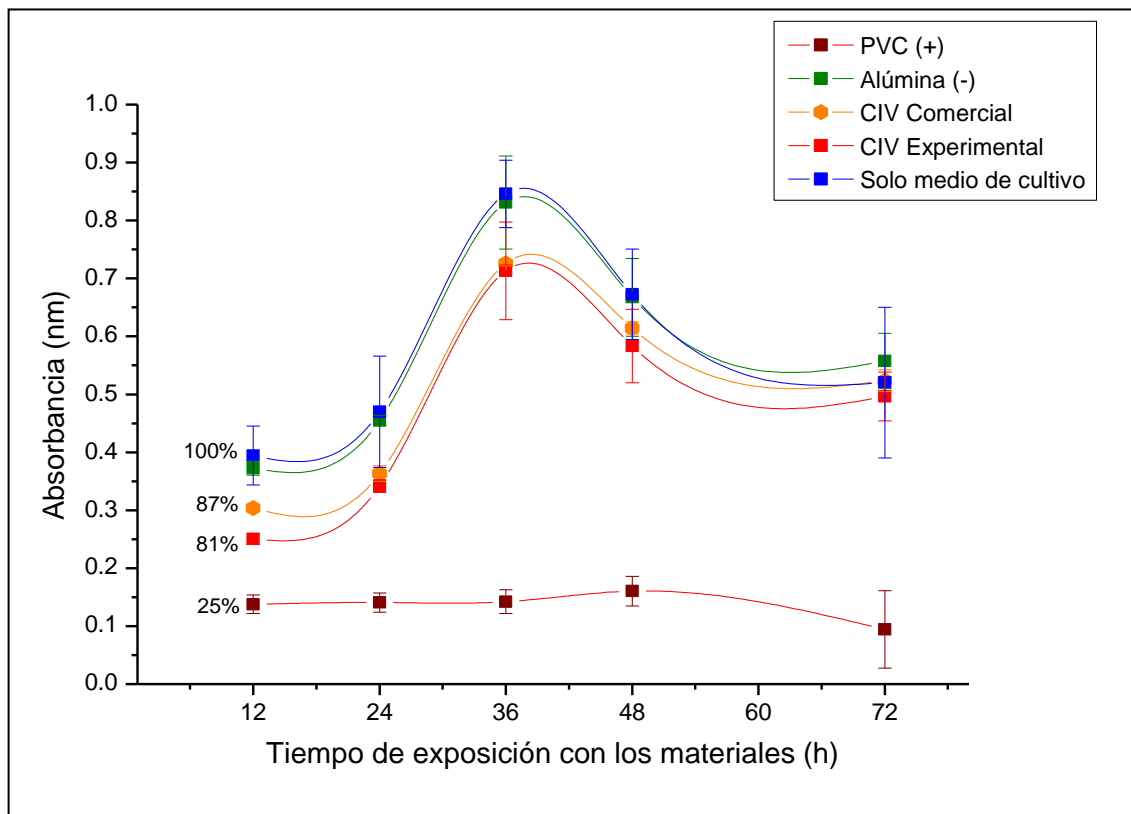


Figura 6. Ensayo de Contacto directo (viabilidad). Se colocaron distintos materiales en cultivos celulares, como control negativo Alúmina (100% de metabolismo) y como control positivo de toxicidad se utilizó PVC (25% de metabolismo) y %. Los cultivos con CIV experimental registraron 87% de metabolismo mientras que el CIV comercial registró 81% de metabolismo.

El análisis estadístico por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey, mostraron que los cultivos de control negativo (alúmina) como los cultivos sin material se comportaron de manera similar y no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), por lo tanto se consideró al control negativo (Alúmina)

como el total de actividad metabólica celular. Tomando en cuenta lo anterior, el control positivo (PVC) registró poca actividad metabólica mostrando diferencias significativas con respecto a Alúmina y ambos CIV de las 12 a las 72 horas ( $p < 0,05$ ). La actividad metabólica en los cultivos con CIV fue similar entre ellas después de las 12 horas, inferior a la alúmina y superior a PVC. En la actividad metabólica de los cultivos con ambos CIV a las 12 horas existió una diferencia significativa entre ellos y con el control negativo ( $p < 0,05$ ), En el resto de los cultivos con CIV experimental y comercial de las 24, 36, 48 y 72 horas, la actividad metabólica no fue significativamente diferente entre ellos ( $p > 0,05$ ).

#### 7.5.1.1 Morfología y adhesión celular por contacto directo.

Las Imágenes de Microscopia Óptica de los Cultivos celulares indicaron que las células de los cultivos con Alúmina (control negativo, figura 7A – 7E), las células presentaron formas, alargadas, fusiformes y prolongadas. Conforme pasaron las horas en los cultivos se presentaron mayor cantidad de células y iban proliferando. Los cultivos con el PVC, (control positivo, figura 7F – 7J) presentaron menos cantidad de células, algunas células eran viables sin embargo, hay otras que estaban redondeadas o muertas. Además se observaron contraídas, desapareciendo su morfología clásica y se observó un mayor espacio intercelular.

La figura 8 corresponde a los cultivos celulares en contacto con CIV experimental y comercial. En ambos cementos (figura 8A – 8J), se observó la presencia de efectos degenerativos como falta de adhesión celular ya que hubo cambio en su morfología clásica y vacuolización. Hay células cercanas a la periferia del material, y algunos fibroblastos están en el proceso de muerte celular conforme avanzan las horas (figura 8D, 8E, 8I, 8J). También se observa que las células han modificado su tamaño y extensión lo que conduce a una ampliación del espacio intercelular (8E, 8J), por otro lado, todos los fibroblastos de estos cultivos se encuentran en el proceso degenerativo.

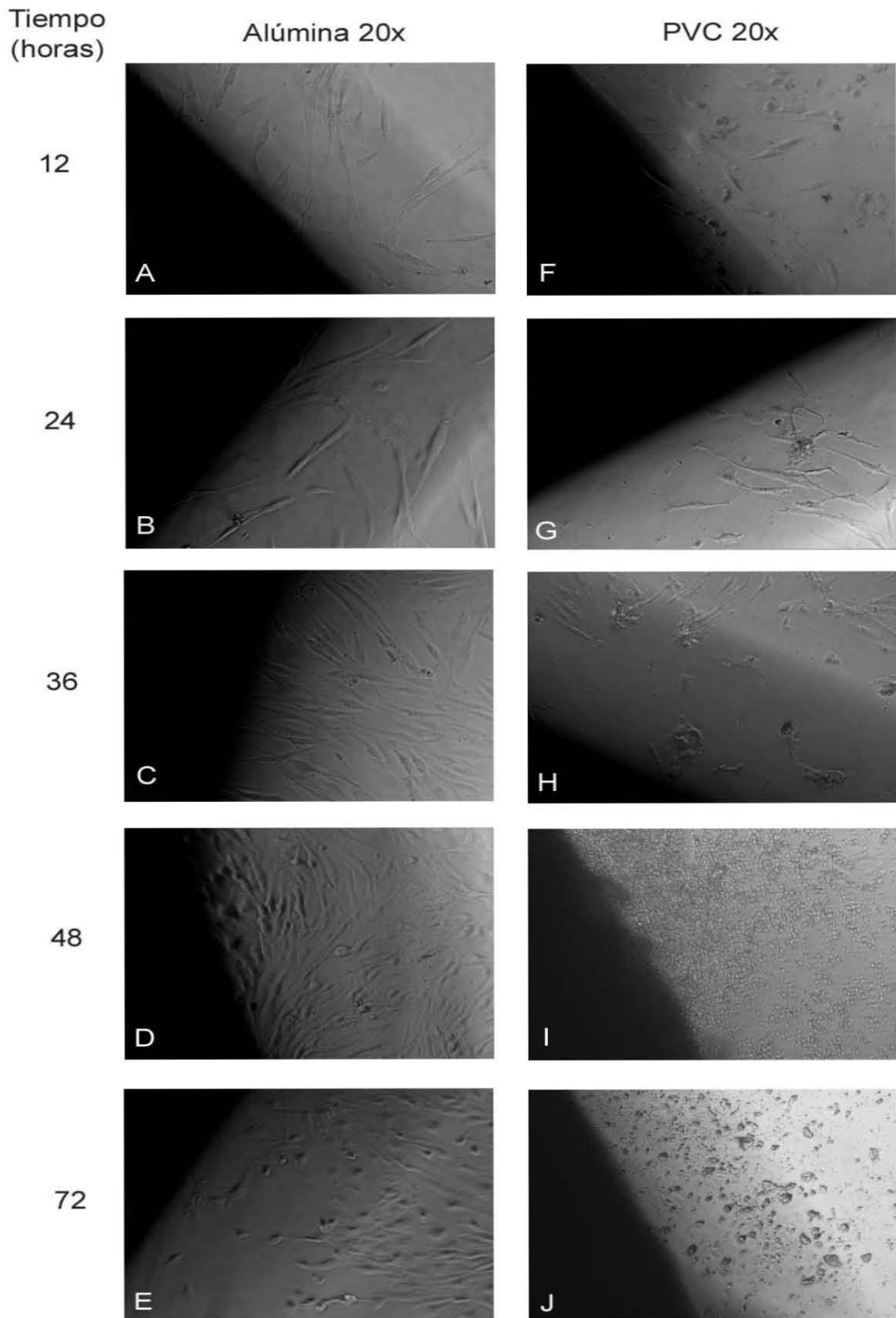


Figura 7. Fibroblastos gingivales en contacto con Alúmina y PVC. Imágenes de Microscopio Óptico en aumentos de 20x de cultivos células con Alúmina (control negativo, Figura 7A – 7E) y PVC (control positivo, 7F - 7J) a las 12, 24,36, 48 y 72 horas. Se observo mayor cantidad de células en cultivos con Alúmina que en cultivos con PVC.

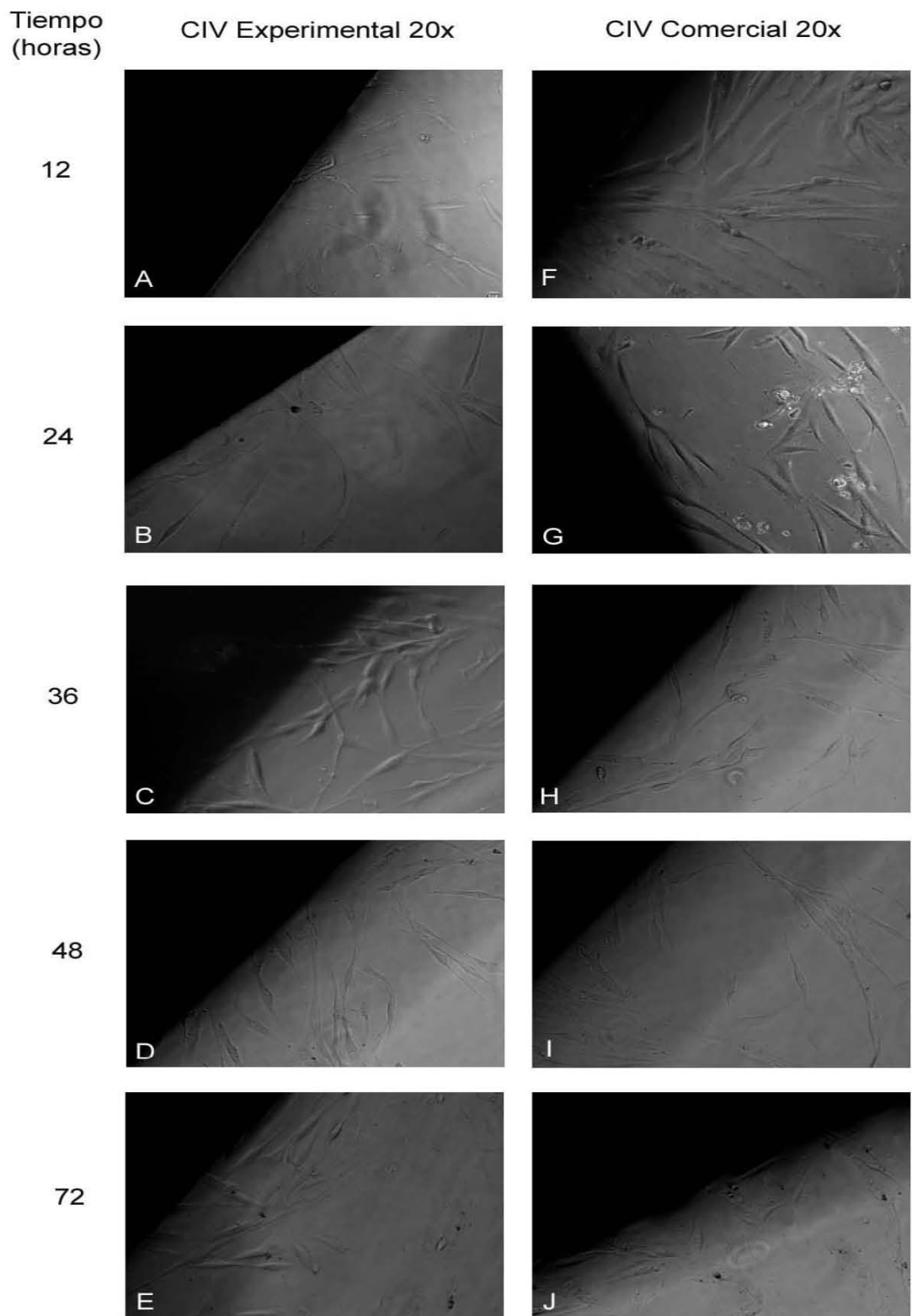


Figura 8. Fibroblastos gingivales en contacto con CIV Experimental (8A – 8E) y Comercial (8F – 8J) Imágenes de Microscopio Óptico en aumentos de 20x de cultivos células con CIV Experimental y Comercial durante 12, 24, 36, 48 y 72 horas y se observó un proceso degenerativo de las células con ambos cementos.

## 7.5.2 Contacto Indirecto (Citotoxicidad).

### 7.5.2.1 Determinación de Citotoxicidad.

Se realizaron los ensayos por contacto indirecto y se obtuvieron las siguientes absorbancias con sus respectivas concentraciones de extractos del CIV experimental y comercial (tabla 12), con el fin de saber que cantidad del extracto es más dañina para el cultivo celular.

Tabla 12. Porcentajes de extractos de los CIV y sus absorbancias.

ABSORBANCIAS DE EXTRACTOS		
Dilución (%)	Absorbancia de CIV Experimental	Absorbancia de CIV Comercial
100	0.264 ± 0.04	0.271±0.005
50	0.275 ±0.02	0.301±0.001
10	0.295 ±0.009	0.324 ±0.003
1	0.318 ±0.002	0.353 ±0.04
0.1	0.329 ±0.02	0.359 ±0.04

Los datos registrados en la tabla 12 se localizaron en la curva patrón de proliferación celular (figura 9) y se obtuvo el número de fibroblastos gingivales viables en los cultivos con los extractos (figura 10).

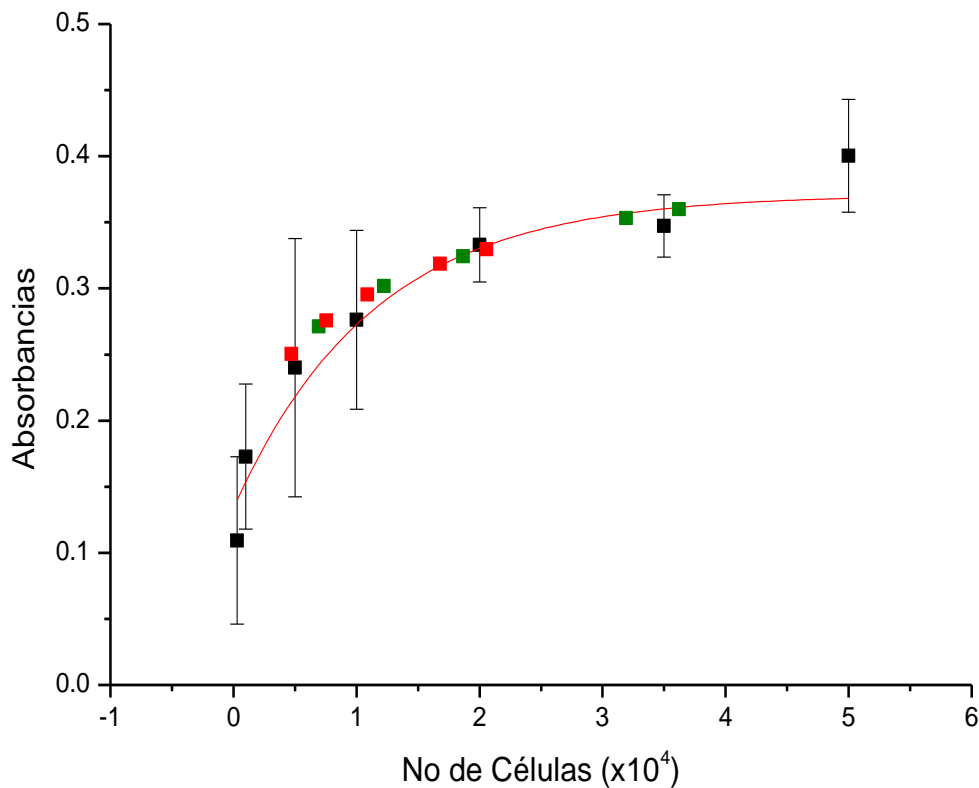


Figura 9. Datos de contacto indirecto en Curva patrón de 24 horas (color negro). En color rojo se registran las absorbancias de porcentajes de extractos de CIV Experimental y en color verde las absorbancias de porcentajes de extractos del CIV Comercial.

El cultivo como control positivo registro muy pocas células viables (aprox. 188 células por posillo), sin embargo, los datos del control negativo mostraron la mayor cantidad de células viables (aprox. 43,312 células). ANOVA factorial seguido por la prueba de Tukey mostraron diferencias significativa entre ellas ( $p < 0.05$ )

Los cultivos con 0.1% del extracto de CIV registraron mayor cantidad de células a diferencia de los cultivos con el 100% de extracto. A 0.1% de CIV comercial hubo una supervivencia de aprox. 36,206 células mientras que en CIV experimental mostró una supervivencia de aprox. 20,581 células. El análisis estadístico por ANOVA factorial seguido por la prueba de Tukey mostraron diferencias significativa entre ellas así como con el grupo control negativo ( $p$

<0.05). Con el 100% de CIV comercial se observo supervivencia de aprox. 6,945 células mientras que el CIV experimental se observaron aprox. 4,726 células, e igualmente, el análisis estadístico por ANOVA factorial seguido por la prueba de Tukey mostraron diferencias significativa entre ellas, con el grupo control negativo y extracto al 0.1% ( $p < 0.05$ ) como se muestra en la figura 10.

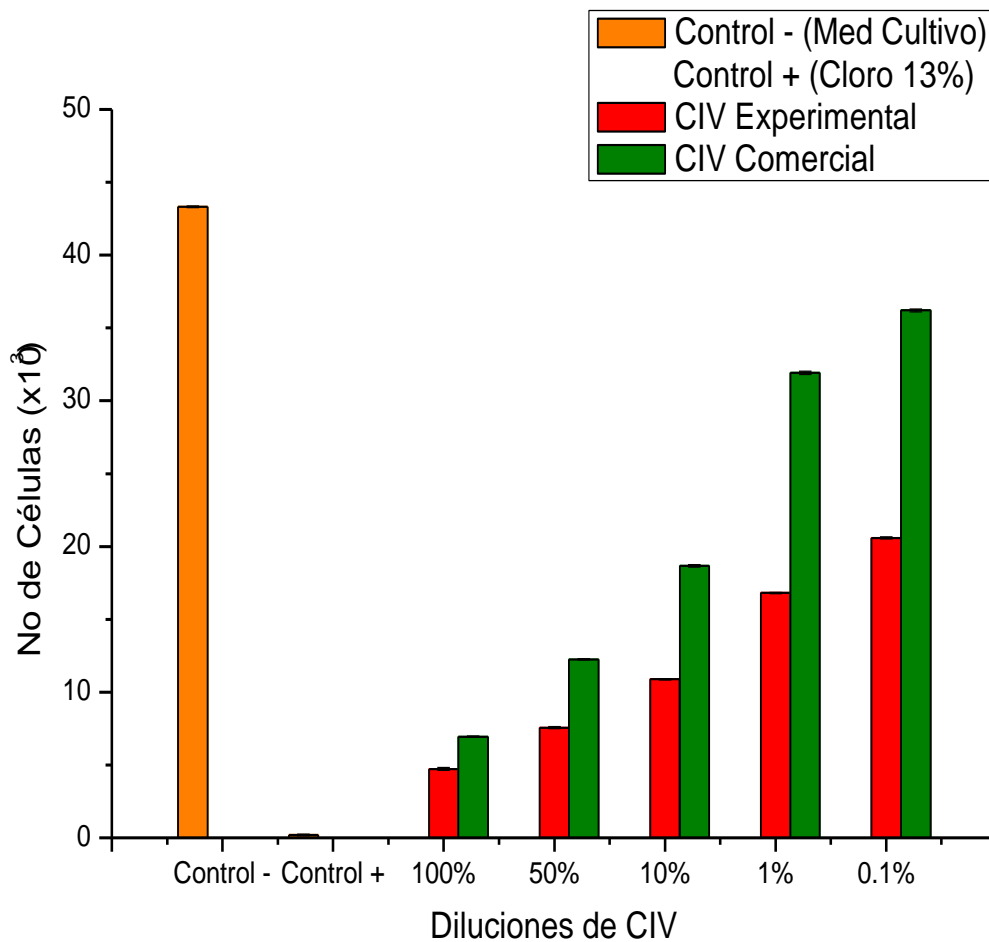


Figura 10. Ensayo de Contacto indirecto (citotoxicidad). Se colocaron distintos porcentajes de extractos que van de 0.1 a 100% en cultivos celulares, como control positivo de citotoxicidad Cloro al 13% y como control negativo solo medio de cultivo. A mayor aumento de la concentración de extracto, menor cantidad de células y se observo una mayor supervivencia celular en los cultivos con CIV comercial.

Con los datos obtenidos se determinó la citotoxicidad correspondiente a cada porcentaje de extracto como se indica en las tablas 13 y 14.

Tabla 13. Citotoxicidad de extracto de CIV Experimental.

CIV EXPERIMENTAL (indirecto).			
Absorbancia.	Extracto.	No. células.	Escala de citotoxicidad.
0.250	100%	4,726	MEDIANAMENTE TÓXICO.
0.275	50%	7,560	MEDIANAMENTE TÓXICO.
0.295	10%	10,881	MEDIANAMENTE TÓXICO.
0.318	1%	16,803	MEDIANAMENTE TÓXICO.
0.329	0.1%	20,581	MODERADAMENTE TÓXICO.

Tabla 14. Citotoxicidad de extractos de CIV Comercial.

CIV COMERCIAL (indirecto).			
Absorbancia.	Extracto.	No células.	Escala de citotoxicidad.
0.271	100%	6,945	MEDIANAMENTE TÓXICO.
0.301	50%	12,243	MEDIANAMENTE TÓXICO.
0.324	10%	18,673	MEDIANAMENTE TÓXICO.
0.353	1%	31,913	MODERADAMENTE TÓXICO.
0.359	0.1%	36,206	MODERADAMENTE TÓXICO.

Estos resultados indican que ambos materiales son citotóxicos en distintas escalas y esta citotoxicidad es mayor si aumenta la concentración del extracto como se observó en ambos cementos, que la concentración más tóxica fue del 100%, si embargo el CIV experimental (tabla 13) fue el material más tóxico al



registrar una menor cantidad de células viables en comparación con el CIV comercial (tabla 14).

#### 7.5.2.2 Morfología y adhesión celular por contacto indirecto,

Las imágenes de Microscopía Óptica de los Cultivos celulares del control negativo (Medio de Cultivo) y control positivo (cloro 13%) mostraron que existió una gran confluencia de las células del control negativo; En la figura 11A se puede observar que estas células presentaron formas alargadas y fusiformes, e iban aumentando de tamaño y de número reduciéndose el espacio intercelular. Con el Cloro al 13%, (control positivo) no hubo células disponibles ya que estaban muertas y totalmente destruidas. Como se puede observar en la figura 11B, las células perdieron su forma y cambiaron totalmente su morfología llevando a una ampliación del espacio intercelular y muerte celular.

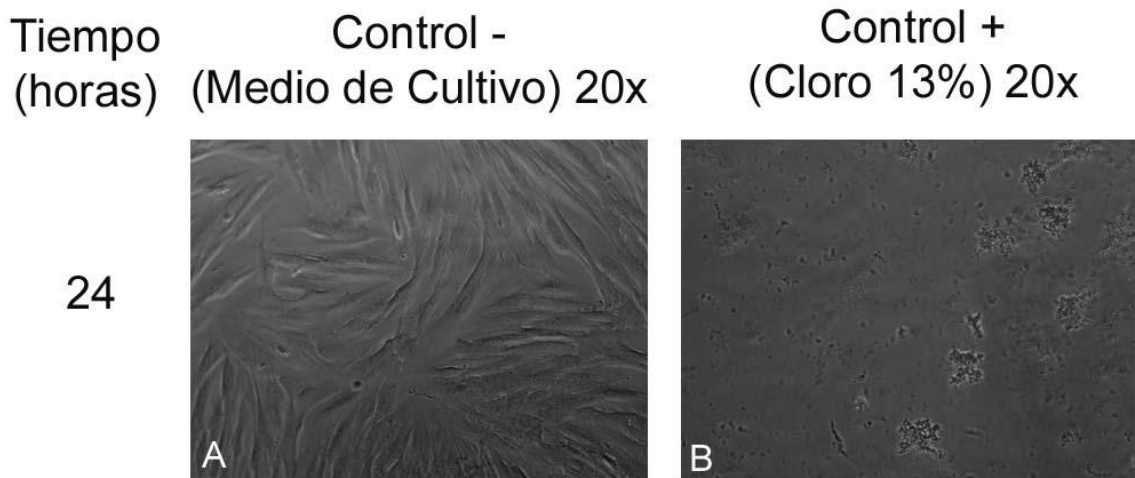


Figura 11. Fibroblastos gingivales incubados con Medio de Cultivo y Cloro al 13%. Imágenes de Microscopio Óptico en aumentos de 20x de cultivos celulares a, 24 horas. En la Figura 11A existe confluencia celular, mientras que en la figura 11B no hay células viables.

En la figura 12 se presentan las imágenes Microscopía Óptica de los cultivos celulares que fueron expuestos a diferentes concentraciones de extractos de CIV experimental y comercial. En estos cultivos se observó que se presentaron

menor cantidad de células que en los cultivos del control negativo (figura 11A). Existieron efectos degenerativos tales como reducción de tamaño y forma con vacuolización por ambos cementos. Asimismo algunos fibroblastos estaban en proceso de muerte conforme se iban aumentando las concentraciones de extracto sobre todo del CIV experimental (figura 12A – 12E). Las células disminuyeron de tamaño y extensión, lo que llevó a la ampliación del espacio intercelular (figura 12A).

### 7.5.3 Metabolismo Celular.

En la figura 15 se presenta la biotransformación de Alamar Blue en los cultivos celulares de ensayos de contacto directo e indirecto a las 24 horas. El medio de cultivo representó el 100% de la actividad metabólica y en base a esto se calcularon los porcentajes de los otros cultivos, por lo que el cloro registró 20%. El análisis estadístico por ANOVA de una vía indicó que existen diferencias significativas entre todos los grupos ( $p < 0.05$ ), seguido por la prueba de Tukey que indicó que los cultivos con CIV experimental y comercial con el 90 y 95% respectivamente de metabolismo mostraron diferencias significativas entre ellas y con el medio de cultivo ( $p < 0.05$ ). Los cultivos con el 100% de extractos de CIV experimental y comercial con 69 y 71% respectivamente de metabolismo no mostrando diferencias significativas entre ellas ( $p > 0.05$ ), pero sí con el medio de cultivo ( $p < 0.05$ ).

Lo anterior indica que tanto los extractos como el material sólido fueron citotóxicos sin embargo, los cultivos que presentaron un mayor porcentaje de biotransformación (y por lo tanto una mayor supervivencia celular), son los incubados con los CIV experimental y comercial de forma sólida. En ambos ensayos, las células incubadas con CIV comercial presentaron mayor supervivencia celular que con el CIV experimental.

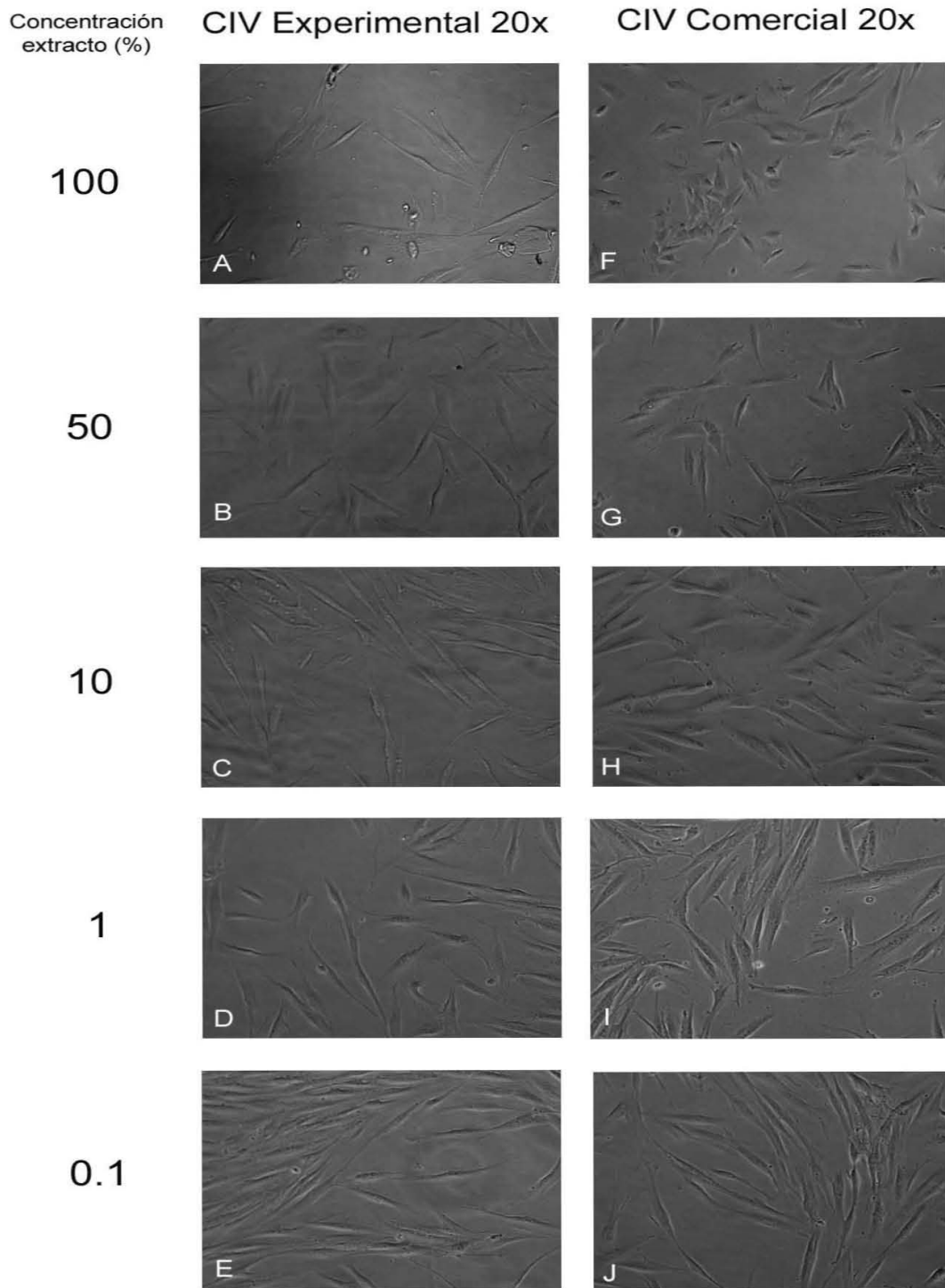


Figura 12. Fibroblastos gingivales incubados con concentraciones de extractos de CIV experimental (figura 12A – 12E) y Comercial (figura 12F – 12J). Imágenes de Microscopio Óptico en aumentos de 20x de cultivos en contacto con extractos de CIV del 100% al 0.1% a las 24 horas. Se observó disminución de supervivencia celular en la medida del aumento de las concentraciones de extractos de ambos cementos especialmente en CIV experimental.

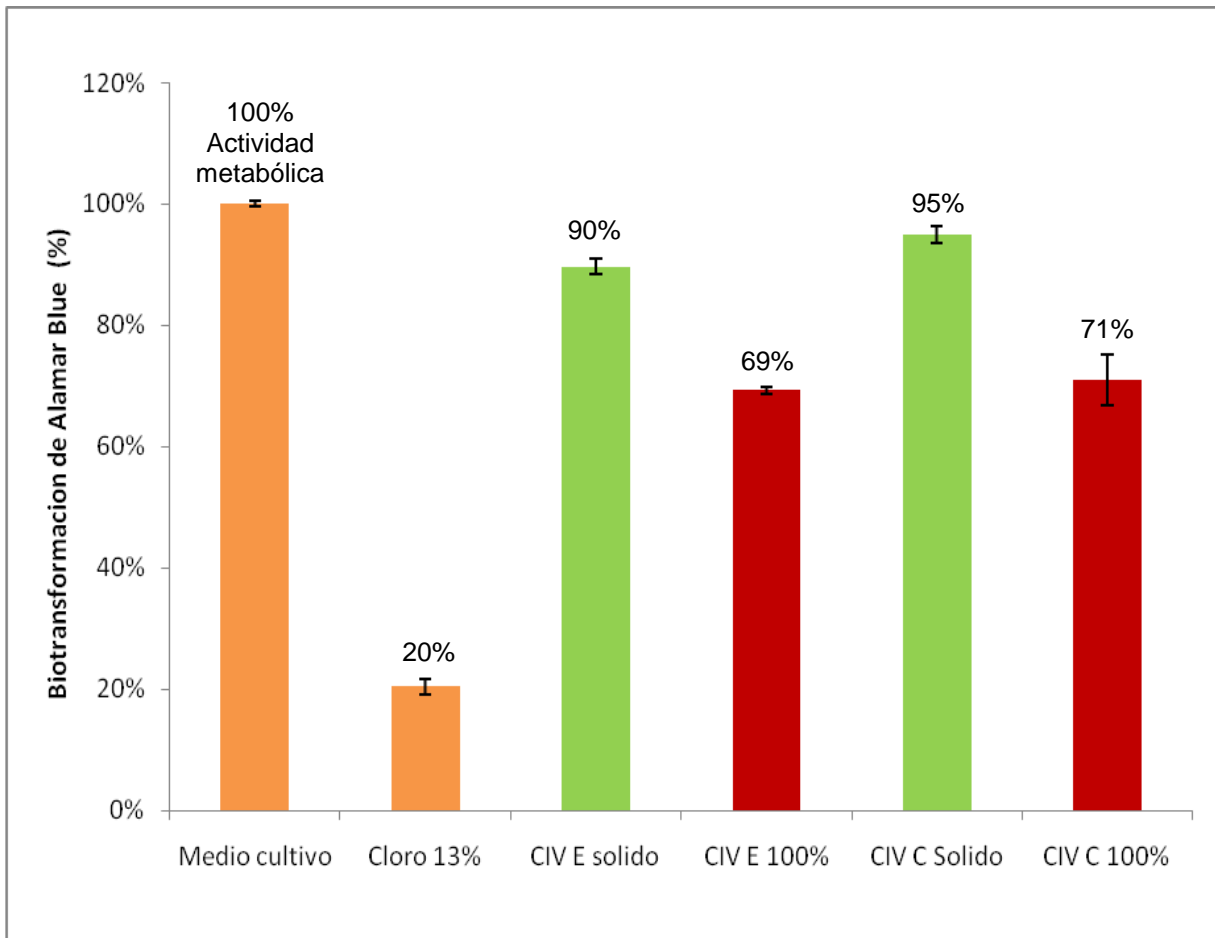


Figura 13. Biotransformación de Alamar Blue en ensayos de contacto directo e indirecto. En color naranja los controles de toxicidad Medio de cultivo (control negativo) y cloro 13% (control positivo), en color rojo las absorbancias de las diluciones al 100% CIV Experimental y comercial en color verde las absorbancias de CIV Experimental y comercial en forma sólida. Se observó mayor metabolismo celular en los cultivos con ambos cementos sólidos en comparación con los extractos de los cementos al 100%

## IX. DISCUSION.

Desde el momento de su aparición el CIV ha sido modificado en su formulación, por lo que siempre es recomendable comprobar que los CIV cumplan con los valores establecidos en la Norma 96 de la ADA, con la finalidad de mejorar su comportamiento físico así como su biocompatibilidad. Es por ello que en esta investigación era necesario hacer el control de calidad del CIV experimental y comparar los resultados con los de un CIV comercial.

Los resultados (tabla 8) indican que en la prueba de tiempo de fraguado el material cumplió con lo establecido por la Norma No. 96 (de 2.5 a 8 como mínimo) resaltando que el tiempo de manipulación fue suficiente para lograr una correcta mezcla de los componentes. En la prueba de resistencia a la compresión la norma estipula un valor mínimo de 70 MPa, el CIV experimental obtuvo 85.3 MPa. Un estudio reciente en el que se comparan las propiedades físicas de ionómeros de vidrio cementantes y en donde se incluye al CIV comercial (Mirafill ®), se obtuvo 105 MPa <sup>62</sup> Esta diferencia podría deberse a que el CIV experimental requiere de una mayor cantidad de líquido que el CIV comercial para lograr un tiempo de trabajo suficiente antes de el fraguado del material. Plant CG y col. <sup>55</sup> señalan que un cemento con mayor cantidad de líquido presenta menor resistencia, sin embargo el CIV experimental de este estudio, está dentro del rango de la norma en este aspecto.

Con respecto a la prueba de espesor de película (tabla 8), la norma establece que el valor máximo debe ser de 25  $\mu\text{m}$ . De acuerdo con nuestros resultados, el CIV experimental mostró en promedio 20  $\mu\text{m}$ , mientras que lo reportado por Ramírez PJ y col. el CIV comercial obtuvo 31  $\mu\text{m}$  <sup>62</sup> rebasando el límite establecido por la norma. Cabe señalar que estos autores utilizaron las proporciones especificadas por el fabricante de la cantidad P/L. De igual manera en este trabajo de tesis todas las muestras de CIV comercial se obtuvieron respetando la relación en peso P/L especificada por el fabricante.

En lo que se refiere a la prueba de erosión ácida (tabla 8), Billington y col señalan que esta prueba se propuso, para su incorporación a las normas internacionales de cementos dentales, ya que sus resultados se correlacionan con la erosión *in vivo*<sup>63</sup>. La norma establece 0.05 mm/h como valor máximo y el CIV experimental obtuvo 0.0087 mm/h mientras que el CIV comercial tiene 0.035 mm/h<sup>62</sup>. Esto implica que ambos cementos fueron más resistentes a la erosión.

Por otro lado, se pudo observar por medio de MEB (Figura 5), las características topográficas de ambos CIV que mostraron algunas diferencias entre ellas. En el caso del CIV Experimental se observaron grietas, y poros. Estas características han sido observadas por MEB en otros estudios<sup>64, 65, 66</sup> que señalan que al haber más porosidad permite una mejor adhesión mecánica a la estructura dental. Por otro lado el CIV comercial presento fisuras, grietas y cuerpos sólidos que sobresalen en la superficie. Esto ultimo fue identificado a una diferencia de intensidad y color en las micrografías, lo cual algunos autores han podido identificar como Sr, Al y Si<sup>66, 68</sup>.

Es típico que en la mayoría de los materiales dentales no se tomen en cuenta funciones farmacológicas, inmunológicas o metabólicas, pero sí buenas propiedades físicas y mecánicas<sup>30</sup>. Sin embargo, dado que la biocompatibilidad es la propiedad de un material necesaria para generar una respuesta biológica apropiada, al ser aplicado sobre un tejido y que implica la interacción entre el material, el huésped y la función esperada del material<sup>2</sup>, por lo que el siguiente paso fue realizar la evaluación biológica del CIV experimental en comparación con el CIV comercial.

La determinación del pH de CIV (tablas 9 y 10) mostraron una relación entre la variación del pH en el medio de cultivo y la supervivencia celular en los ensayos de cultivo indirecto (figura 10). Ambos CIV presentan en un inicio, un pH ácido cuando fragua el material pero conforme pasan las horas este pH va en aumento

pero siempre manteniendo un nivel ácido. Es esta acidez lo que varios autores señalan podría estar asociada a la sensibilidad, irritación y daño celular<sup>67, 69 - 71</sup>.

En relación a el análisis de los elementos liberados por el ionómero de vidrio en el medio de cultivo (tabla 11), no se encontró una relación entre ellos y el grado de citotoxicidad (el aluminio está dentro de los límites no tóxicos (1-10µm/ml). Sin embargo, es posible que por la liberación de fluoruros, haya variación en el pH, como ha sido investigado con varios tipos de CIV incluyendo el ionómero cementante. En este caso, el cambio en el pH ocurrido en el medio de cultivo es ocasionado por la acidez del ionómero de vidrio, el cual depende del tipo de ionómero y ha sido asociado a la liberación de fluoruro. Estas dos características, podrían ser el factor que causa la citotoxicidad en los fibroblastos por parte de ambos cementos<sup>68, 72</sup>.

Según nuestros resultados, la mayor liberación de calcio observada fue en el CIV comercial y podría estar relacionada con una supervivencia celular ya que en ambos tipos de ensayos (directo e indirecto) hubo la mayor cantidad de células presentes. Esto podría relacionarse con el hecho de que en otros estudios el CIV también puede estimular crecimiento y supervivencia celular ya que el calcio es esencial para la motilidad y supervivencia celular<sup>30, 73, 74</sup>.

De acuerdo con Pameijer, la biocompatibilidad de CIV *in vitro*, depende de la composición de cada material<sup>75</sup>. Con los resultados obtenidos en este trabajo (figuras 6 y 10), se puede concluir que también la biocompatibilidad depende del tipo de ensayo, ya que en los ensayos de contacto directo se observó como las células se adaptan al material mostrando una supervivencia celular mayor en comparación con los ensayos de contacto indirecto en donde hubo una menor supervivencia celular y se indicó cuál es la dosis más tóxica del material.

En contacto directo (figura 6), durante las primeras horas de cultivo parecen ser cruciales en la viabilidad de los fibroblastos, en este momento se observaron

diferencias significativas de la cantidad de células presentes. Posteriormente, parece haber una adaptación de las células ante la presencia del material, ya que siguen un comportamiento semejante tanto en el control negativo (alúmina) como en el cultivo en condiciones normales. Con Microscopia Óptica se observó la morfología, adhesión y proliferación celular. No se observaron diferencias importantes entre los niveles de la proliferación de fibroblastos gingivales humanos cultivados en CIV experimental y comercial pero si en los cultivos controles. Por otro lado, en cuanto a la morfología y adhesión al sustrato no se observaron cambios notorios entre los cultivos con ambos CIV, pero si lo comparamos con los cultivos controles tanto como positivos como negativos, si existieron diferencias en cuanto a la adhesión, morfología y cantidad de células durante las 72 horas de ensayo lo cual atribuimos al cambio de pH.

Los resultados obtenidos del ensayo de contacto indirecto de las células con los extractos (figura 10) mostraron que mientras mayor sea la concentración del extracto, menor cantidad de células viables están presentes y por lo tanto hay una menor capacidad metabólica en los cultivos. Las concentraciones de porcentajes de extractos de CIV experimental mostraron menor supervivencia celular comparado con el CIV comercial y se encontró una relación directa entre la concentración del extracto y la supervivencia celular (a menor cantidad de extracto mayor supervivencia). Por microscopia óptica además, se observó alteración en la morfología, adhesión al sustrato y proliferación entre los cultivos con ambos CIV y cultivos controles.

Asimismo, al comparar los resultados de contacto directo con los resultados de contacto indirecto a las 24 horas (tablas, 13, 14 y figura 13), la supervivencia celular y el porcentaje de biotransformación de Alamar Blue en los cultivos con los extractos sin diluir de CIV experimental y comercial, se encontró que es menor que en los cultivos con CIV comercial y experimental en forma sólida. Este resultado podría coincidir con lo hallado con Muller y col <sup>48</sup>, quienes encontraron diferencias en la citotoxicidad en 8 productos, en donde se encontró que la alta citotoxicidad



se debe a extractos de algunos de los CIV investigados, después de 48 horas. Sin embargo en los ensayos efectuados en esta investigación la citotoxicidad es evidente desde las 24 horas.

Por lo tanto, aunque los CIV pueden ser considerados generalmente biocompatibles en algunos círculos, no está claro si son sus componentes sin reaccionar, la reacción de fraguado o los productos que libera, lo que pueden afectar el metabolismo celular <sup>30</sup>.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados obtenidos, el CIV experimental cumple con el control de calidad estipulado por la Norma No. 96 de la ADA por lo que su desempeño clínico podría ser adecuado.

Los productos librados en el medio de cultivo, provenientes del CIV acidificaron el medio bajando el pH, lo cual tuvo un efecto en la supervivencia de fibroblastos gingivales en cultivos *in vitro*, lo cual podría implicar que el pH es un factor determinante en la citotoxicidad del material.

No se encontró relación entre los elementos liberados del CIV y el grado de citotoxicidad, por lo que es necesaria la elección de otra técnica que permita un análisis más exacto sobre los elementos liberados el cual debe incluir la liberación de fluoruro y que permita determinar si en medio de cultivo hay interacción con el material para formar algún compuesto. Con esto posiblemente se podría establecer la causa exacta de la citotoxicidad de los CIV.

En los ensayos de contacto directo, fue posible observar la adaptabilidad de las células ante la presencia del CIV y la liberación de iones cementos (experimental y comercial) y como estos afectan la supervivencia de los

fibroblastos gingivales durante las primeras horas y posteriormente los cultivos con ambos CIV se comportan de una manera muy parecida. Esto podría ser un indicativo de que las células se adaptan ante la presencia del material. Lo anterior se ve reflejado en la morfología, adhesión al sustrato y proliferación celular al observar los cultivos con ambos ionómeros

En contacto indirecto, el CIV experimental afecta en mayor medida la supervivencia de los fibroblastos gingivales reflejándose en la morfología, adhesión al sustrato y proliferación celular ya que existieron diferencias entre los cultivos con los porcentajes de extracto de ambos ionómeros y en especial con los del CIV experimental y con los grupos controles.

Los diferentes resultados que se han encontrado de distintos productos hacen aún, difícil llegar a una conclusión en cuanto a la biocompatibilidad el CIV. Esto implica que los resultados dependen de cada producto, de repetirse en materiales con nuevas formulaciones y del tipo de prueba de biocompatibilidad elegida.

De acuerdo con la metodología empleada, los porcentajes de ambos extractos de CIV ocasionaron un mayor daño que el material, especialmente el CIV experimental, lo que implica que los elementos que liberan los CIV tienen un mayor efecto citotóxico en la viabilidad celular.

## REFERENCIAS

1. Clavijo D, Orjuela J, Cardozo C, Torrado A, Covarrubias A. Hacia una nueva generacion de biomateriales, Primera parte. Rev Col Or Tra 2010; 24(3): 168-77]
2. Williams DF. Second consensus conference on definitions in biomaterials Chester, England. Advances in biomaterials 1992; 2: 10.
3. Van Kooten, TG, Klein CL, Köhler H, Kirkpatrick CJ, Williams DF, Eloy R. From cytotoxicity to biocompatibility testing in vitro: cell adhesion molecule expression defines a new set of parameters. J Mater Sci Mater Med. 1997;8(12):835-41
4. Craig,R. Materiales de Odontologia Restauradora. Ed Harcourt Brace 11 edicion. 1998; p 126-162
5. Keiser K, Jonson C. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblast. J of Endod. 2000; 26(5):288-291
6. Villegas M. Angela. Tests of biocompatibility for dental materials. Review of the literature. Rev. Estomat. 2008; 16(2):38-44
7. Wataha JC Principles of biocompatibility for dental practitioners. The journal of prosthetic dentistry.2001; 14(8): 203-209
8. Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part1. Intracanal drugs and substances, Int. Endod. Journal, 2003; 36: 75-85,.
9. Osorio R. A.Cytotoxicity of endodontic materials. J of Endod. 1998;24(2):91-96
10. Torabinejad M, Ford TR. Root end filling materials. Endod. Dent. Traumat. 1996; 12:161-78.
11. Beltes, P, Koulaouzidou E, Kolokuris I, Kortsaris AH,. In vitro evaluation of the cytotoxicity of two glass-ionomer root canal sealers. J. Endod. 1997;23:572-4
12. Wiegand C, Hipler U-C. Evaluation of Biocompatibility and Cytotoxicity Using Keratinocyte and Fibroblast Cultures. Skin Pharmacol Physiol 2009;22:74-82
13. Vajrabhaya L, Sithisarn P. Multilayer and monolayer cell cultures in a cytotoxicity assay of root canal sealers. Int. Endod. J. 1997; 30:141-4
14. Mossmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and citotoxicity assays. J Immunologyc Meth 2000;(65):55-3
15. S.Al-Nasiry1,, N.Geusens, M.Hanssens, C.Luyten and R.Pijnenborg. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. 2007;22 (5): 1304-1309 First published online: February 16, 2007.

16. Barrancos MJ. Operatoria dental. 4ª. Edición. Buenos Aires: Editorial Medica panamericana, 2006. 66-68
17. Bapna, M.: Leaching of glass-ionomeros cements. J. Oral Rehab. 21: 577-583. 2000
18. White SN. Ligth cured glass ionomers. Am Journal Dent 1994; 22: 39-42.
19. Anusavice KJ. La Ciencia de los Materiales Dentales de Phillips, 11ª ed, Elsevier España, 2004. pp 461 – 466
20. Guzman Baez. Biomateriales Odontologicos de uso clinico, Editorial Colombia, 1990, pp 75 – 80.
21. American National Standar/American Dental Association Specification No. 96 for Dental Water Based Cements, Council of Dental Materials, Instruments a Equipment, Chicago U.S.A 2000.
22. Maclean, J. y Wilson, A.: Clinical applications of glass-ionomero cements. Op. Dent. Supp. 5: 184-190. 2006
23. Wilson D, Mc Lean A. Glass Ionomer Cement, 1a ed, Quintessence Publishing, Estados Unios, 1988, pp 2 – 150.
24. Smith, D.: Polyacrilic acid-base cements adhesion to enamel and dentine. Op. Dent. Supp. 5: 177-183. 2000
25. Wasson, E. A. New aspects of the setting of glassionomer cements. J. Dent. Res. 72(2): 481-483. 2004
26. JW Nicholson Chemistry of glass-ionomer cements: a review Biomaterials, 1998 – Biomaterials. 1998; 77-82
27. Hadley PC, Billington RW, Pearson GJ, Williams JA. E!ect of monovalent ions in glass ionomer cements on their interaction with sodium fluoride solution. Biomaterials 2000; 21: 97-102
28. Billington RW, Williams JA, Pearson GJ. Ion processes in glass ionomer cements. Journal of Dentistry. 2006; 34: 544 – 555
29. Flores Sanchez LA. Glass-ionomer restoratives: An evaluation according to standard 96 of the ADA. Revista ADM. 2010; 2: 72 - 77
30. Sidhu S, Schmalz G. The biocompatibility of glass ionómero cements materials. Status report. American Journal of Dentistry, 2001; 14: 387 – 396
31. Leyhausen G, Abtahi M, Karbakhsch M, Sapotnick A. Biocompatibility of various light-curing and one conventional glass-ionomer cement Biomaterials. 1998; 10: 120 – 125.
32. Wataha JC, Hanks CT. Biocompatibility testing. What can we anticipate? Trans Third Int Cong Dent Mater 1997: 12:109 -120

33. Hume WR. Methods of assessment in vitro of restorative material toxicity using an intact human dentine diffusion step. *Int Endod J.* 1988; 21: 85 – 88.
34. Hanks CT, Craig RG, Characterization of the in vitro pulp chamber using cytotoxicity of phenol. *J Oral Pathol* 1989; 18: 97 – 107
35. Hume WR. Pulpal responses to glass ionómero. In: Hun P. Glass ionomers: The next generation. Proceeding of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on Glass Ionomers. Philadelphia. 1994; 143 – 150.
36. Pashley DH. The influence of dentin permeability and pulpal blood flow on pulpal solute concentrations. *J. Endod* 1999; 5: 355 – 361.
37. Schmalz G, Hiller KA. New developments in the Filter Test System for cytotoxicity testing. *J Mater Sci: Mat in Med* 1994; 5: 43 – 51.
38. Forss H. Release of fluoride and other elements from light – cured glass ionomers in neutral and acidic conditions. *J. Dental Res* 1993; 72: 1257 – 1262.
39. Bapna MS, Muleller HJ. Leaching from glass ionómero cements. *J. Oral Rehab* 1994; 21: 557 – 583.
40. Geurten W. Substances released from dental resin composites and glass ionómero cements *Eur J Oral Sci* 1998; 106: 687 – 695.
41. Wilson AD, Groffman DM. The release of fluoride and other chemical species from glass ionómero cement *Biomater* 1985, 6:431-433
42. Thevadass KP, Pearson GJ. Method for enhancing the fluoride release of a glass ionómero cement *Biomater.* 1996; 17: 425 – 429.
43. Nicholson JW, Braybrook JH, Wasson EA. Biocompatibility of glass poly (alkenoate) (glass ionómero) cements A vreview. *J Biomater Sci Polymer Edn* 1991; 2:277 – 285
44. American Dental Association ANSI ADA no. 41 for Biological Evaluation of Dental Materials Chicago: ADA ,1982
45. Dahl BL. Biological test of an experimental glass ionómero (silicopolyacrylate) cement. *J Oral Rehabil.* 2000; 14: 19 – 24.
46. Meryon SD. Stephens PG A comparation on *in vitro* citotoxicity of two glass ionómero cements *J Dental Restaurative.* 2001; 62: 769 - 773.
47. Schmalz G. The Agar Overlay Method. *Int endo J* 1988; 21: 281 – 284.
48. Müller J, Bruckner G, Kraft E. Reaction of cultured pulp cells to eight differents cements based on glass ionomers. *Dent Mater.* 1990; 6: 172 – 177.
49. Dennison DK Keefe TF. Cellular response to various restorative materials *J. Dent Res* 1996; 75: 106

50. Steinbrunner RL, Setcos JC. Connective tissue reactions to glass ionómero cements. *J Dent Res* 1991; 4: 281 – 284.
51. Caughman WF, Gretchen GB, Dominy WT. Glass ionómer and composite resin cements. Effects on oral cells. *J Prosthet Dent* 1990; 63: 513 – 521.
52. Nix L, Schuster GS. Response of oral mucosal cells to glass ionómer cements. *J Dent Res* 1995; 74: 243
53. Plant CG, Browne RM, Knibbs PJ. Pulpal effects to a glass ionómer cements. *Int Endod J* 1998; 1 345 – 350
54. Plant CG, Tobias RS, Browne RM, Toxicity test in inlay cements *Clin Mater* 1999; 291 – 301
55. Plant CG, Browne RM, Knibbs, Tobias RS. Pulpal response to a glass ionómer luting cement. *Br Dent J* 1999; 165: 54 – 58
56. Schmalz G, Schmalz C, Rotgans J Die Pulpaverträglichkeit eines Glasionomer – und – Zinkoxidphosphat – Zementes *Dtsch ZahnärztlZ* 1986; 41: 806 – 812
57. Klötzer WT. Pulp reactions to a glass ionómero cement *J Dent Res* 1975 54: 678
58. Paterson RC Watts The response of a rat molar pulp to a glass ionómero cement. *Br dent J.* 1982; 151: 228 – 230
59. Bergenholtz G, Cox CF, Loesche WJ. Bacterial leakage around dental restorations: Its effect on the dental pulp. *J Oral Pathol* 1992; 67: 915 – 918.
60. Rocha Castro E.; *Principios básicos de Espectroscopia*; Editorial UACH, México 2000; 123-203.
61. Skoog, James D.A., Holler, James. *Principios de análisis instrumental*, 5° ed.; Ed. McGraw-Hill. 1998; 219-239.
62. Ramirez PJ, Perez R. Estudio comparativo de ionómeros de vidrio cementantes. *Odontología Actual* 2011; 99: 66 – 70.
63. Billington RW, Williams JA, Pearson GJ. In vitro erosion of 20 commercial glass ionómero cements measured using the lactic acid jet set test. *Biomaterials* 1992; 13(8): 543 – 7.
64. G. Øilo, Characterization of glass ionomer filling materials. *Dent Mater*, 4 (1988), pp. 129–133
65. H. Nakajima, J.H. Watkins, K. Arita, K. Hanaoka and T. Okabe, Mechanical properties of glass ionomers under static and dynamic loading. *Dent Mater*, 12 (1996), pp. 30–37.
66. E.J. Swift and A.U. Dogan, Analysis of glass ionomer cement with use of scanning electron microscopy. *J Prosthet Dent*, 64 (1990), pp. 167–174.

67. Gjorgievska E, Nicholson JW, Iljovska S, Slipper IJ. A Preliminary Study of the Water Movement Across Dentin Bonded to Glass-Ionomer Cements. *Acta Stomatol Croat.* 2008;42(4):326-334
68. D. Xie, W.A. Brantley, B.M. Culbertson, G. Wang, Mechanical properties and microstructures of glass-ionomer cements, *Dental Materials*, Volume 16, Issue 2, March 2000, Pages 129-138
69. Ben-Amar A, Liberman R, Apatowsky U, Pilo R. pH changes of glass-ionomer lining materials at various time intervals. *J Oral Rehabil.* 1999 Nov;26(11):847-52.
70. Charlton DG, Moore BK, Swartz ML. Direct surface pH determinations of setting cements. *Oper Dent.* 1991; 16(6):231-8.
71. Hristov Ilian, Silvia Dimitrova, Kremena Markova, Milena Kostova. A comparative study of: solubility, pH and temperature changes taking place in several types of cements used in modern dentistry. *Journal of IMAB - Annual Proceeding (Scientific Papers)* 2006;2: 12-15
72. Consiglio R, Rengo S, Liguoro D, Riccitiello F, Formisano S, Palumbo G, Di Jeso B. Inhibition by glass-ionomer cements of protein synthesis by human gingival fibroblasts in continuous culture. *Arch Oral Biol.* 1998;43(1):65-71.
73. Moore L, Pastan I. A calcium requirement for a movement of culture cells. *J. Cells Physiology.* 1980; 101: 101 – 108.
74. Gail MH, Boone CW, Thompson CS. A calcium requirement for fibroblast motility and proliferation. *J. Experimental Cell Research.* 1973; 79 (2): 386 – 390.
75. Pameijer CH, Stanley HR, Ecker G. Biocompatibility of a glass ionómero luting agent Part II: Crown cementation *AM J Dent* 1991; 67: 915 – 918
76. Yan F, Xiao Y, Li H, Haase H, Bartold PM. A comparison of the effects of two kinds of glass-ionomer cement on human gingival fibroblast attachment, proliferation and morphology in vitro. *J Int Acad Periodontol.* 2000;2(1):14-8.