



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**EVALUACIÓN IN VITRO DE LA CITOTOXICIDAD DE DOS
CEMENTOS DE IONÓMERO DE VIDRIO EN LA LÍNEA
CELULAR L929**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

ESPECIALISTA EN ENDODONCIA

P R E S E N T A:

C.D. ANDREA VERONICA PEREZ SANJINES

TUTORA: Dra. EILEEN URIBE QUEROL

ASESORES: Dr. MARIANO GARCÍA MARTÍNEZ
Esp. RENEE JIMENEZ CASTELLANOS



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE DOS CEMENTOS DE IONÓMERO DE VIDRIO SOBRE FIBROBLASTOS DE LA LÍNEA CELULAR L929

Andrea Verónica Perez Sanjines ¹, Mariano García Martínez ², Reneé Jiménez Castellanos ¹, Eileen Uribe-Querol ³

¹ Departamento de Endodoncia. División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. México.

² Unidad de Investigación Preclínica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. México.

³ Laboratorio de Biología del Desarrollo. División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. México.

RESUMEN

Introducción: Durante los tratamientos de endodoncia encontramos complicaciones como la presencia de defectos radiculares. Para sellar defectos radiculares, los cementos ionómero de vidrio son los materiales más utilizados. Estos materiales deben ser biocompatibles porque se mantendrán en contacto con tejidos perirradiculares. **Objetivo:** Comparar la citotoxicidad de los cementos de ionómero de vidrio, Geristore® y EQUIA Forte® Fil sobre fibroblastos de la línea celular L929. **Materiales y Métodos:** Los cambios morfológicos y la viabilidad de cultivos de línea celular L929 fueron evaluados mediante microscopía de luz y la técnica de sulforrodamina B, respectivamente. Los medios condicionados se obtuvieron de cada cemento ionómero de vidrio en medio EMEM. De cada medio condicionado se prepararon diluciones y se evaluó la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas de exposición. **Resultados:** Los medios condicionados al 100% de Geristore® y EQUIA Forte® Fil presentaron un grado cuatro de citotoxicidad con una reactividad severa sobre la línea celular L929. La viabilidad celular de los fibroblastos L929 expuestos a Geristore® y EQUIA Forte® Fil disminuyó de forma dosis-dependiente. Los fibroblastos incubados con Geristore® mantuvieron valores de viabilidad celular en los tres tiempo revisados. Los fibroblastos incubados EQUIA Forte® Fil disminuyeron la viabilidad celular con el tiempo. **Conclusiones:** Los medios condicionados de EQUIA Forte® Fil al 100% son significativamente más citotóxicos que los medios condicionados de Geristore® al 100% sobre los fibroblastos de la línea celular L929.

Palabras clave: Defecto radicular, cemento ionómero de vidrio, citotoxicidad, sulforrodamina B.

Abstract

Introduction: Root defects are complication that clinicians find during endodontic treatments. Glass ionomer cements are materials used to seal root defects. The materials must be biocompatible since they will remain in contact with periradicular tissues. **Aim:** Compare cytotoxic effects of glass ionomer cements: Geristore® and EQUIA Forte® Fil on L929 fibroblasts. **Methodology:** Light microscopy was used to evaluate morphological changes. Cell viability was evaluated using the sulforhodamine B assays on L929 fibroblast cultures. The extracts were obtained from each glass ionomer cement in EMEM medium. Dilutions were prepared and incubated for 24, 48, and 72 hours. **Results:** Non diluted extracts of Geristore® and EQUIA Forte® Fil presented grade 4 cytotoxicity with severe reactivity L929 fibroblast. Fibroblasts incubated with Geristore® maintained cell viability values regardless the exposure time. EQUIA Forte® Fil incubated fibroblasts decreased cell viability over time. **Conclusion:** EQUIA Forte® Fil extracts are significantly more cytotoxic than Geristore® 100% extracts on L929 fibroblasts.

Key words: Root defects, glass ionomer cement, cytotoxicity, sulforhodamine B.

INTRODUCCIÓN

La endodoncia ofrece a los pacientes la oportunidad de mantener sus dientes naturales en función y estética (1). Estudia la morfología de la cavidad pulpar, así como la fisiología y la patología de la pulpa dental. También, estudia la prevención y el tratamiento de las alteraciones pulpares y sus repercusiones sobre los tejidos perirradiculares (2). Durante los tratamientos de endodoncia se pueden presentar complicaciones por la presencia de defectos radiculares provocados por caries y/o fracturas de la raíz, así como por resorciones radiculares internas o externas y anomalías en el desarrollo (surco palatino). Los defectos radiculares también surgen por causas iatrogénicas (perforaciones radiculares) (3-6). En la mayoría de casos, las complicaciones se presentan a nivel apicocoronal, lo que dificulta la accesibilidad no quirúrgica para su reparación. Por esta razón, se deben realizar procedimientos endodóncicos, periodontales y restauradores combinados (3, 5). Existe un debate sobre cuál es el material más adecuado para la reparación de los defectos radiculares en función de su extensión y profundidad (7-9). Es necesario que el material utilizado en la restauración tenga una buena capacidad de sellado para evitar la contaminación del sistema de conductos radiculares y además es fundamental

que sea biocompatible porque mantendrá contacto con los tejidos perirradiculares (10, 11). Se ha mostrado que los cementos de ionómero de vidrio convencionales son citotóxicos (12), por lo que los defectos radiculares subgingivales que son supraóseos se reparan usualmente usando cementos de ionómero de vidrio en combinación resinas compuestas.

Geristore® es un ionómero de vidrio a base de resina de polimerización dual, que contiene una resina compuesta hidrófila, no acuosa y modificada con poliácidos. La fórmula libera principalmente fluro silicato de bario y posee una matriz orgánica polimerizable (Bis-GMA modificada, incluido 2-HEMA), combinada con un fotoiniciador (12). De acuerdo con el fabricante, las ventajas de este material incluyen: insolubilidad en fluidos orales, mayor adherencia a la estructura dental, capacidad de polimerización dual, contracción de polimerización baja, bajo coeficiente de expansión térmica, radiopacidad, liberación de fluoruro y biocompatibilidad (13). Existen varios estudios clínicos que han demostrado que Geristore® puede reparar defectos radiculares supragingivales o subgingivales óseos con éxito (3-5, 14, 15), y otros estudios in vitro han mostrado biocompatibilidad con fibroblastos. (12, 16-19).

EQUIA Forte® Fil es un material de restauración híbrido que contiene ionómero de vidrio y sirve para relleno en bloque (20). EQUIA Forte® es una innovación híbrida entre el EQUIA Forte® Fil y el EQUIA Forte® Coat. De acuerdo con el fabricante, esta mezcla logra un mejor llenado de la cavidad mediante partículas de vidrio ultrafinas y altamente reactivas, dispersas dentro de la estructura del ionómero de vidrio convencional y la adición de un ácido poliacrílico de mayor peso molecular y un nuevo monómero multifuncional producen una matriz de resina más resistente. Además menciona que las ventajas de EQUIA Forte® Fil incluyen: un sellado marginal óptimo, que ofrece resistencia a largo plazo a microfiltraciones y decoloración, sin contracción de polimerización, resistencia al desgaste y a la erosión ácida y alta liberación de flúor en la interfaz de restauración del diente (21). Estas ventajas podrían permitir su uso como material para la reparación de defectos radiculares. Existen pocos estudios que evalúen la biocompatibilidad de EQUIA Forte® Fil, entre ellos algunos de citotoxicidad del material sobre células troncales de pulpa dental. (22-26). Los resultados muestran que las células expuestas a este material tienen una buena actividad metabólica mitocondrial.

La biocompatibilidad se define como la capacidad de un material para funcionar en una aplicación específica en ausencia de reacciones alérgicas o inmunitarias del hospedero (27). Los estudios citotóxicos representan una herramienta útil para evaluar los efectos biológicos de nuevos materiales en diferentes tipos de células (23). Para conocer el grado de biocompatibilidad de materiales y dispositivos médicos se usa la norma ISO 10993-5:2009. Esta norma se basa en la guía para la evaluación biológica preclínica de materiales y dispositivos médicos (28).

Uno de los ensayos mencionados en la norma ISO es el ensayo de sulforrodamina B (SRB), que se usa para medir la citotoxicidad in vitro. En este ensayo se determina la densidad celular con base en la cantidad de proteínas presentes en el cultivo. Este método ha sido optimizado para la detección de toxicidad del compuesto en células adherentes en placas de 96 pozos. El método no solo permite determinar la cantidad de proteína, sino que también requiere un equipo sencillo y reactivos económicos. La técnica de SRB es, por lo tanto, eficiente y altamente rentable (29). En este trabajo analizaremos la citotoxicidad de dos cementos ionómero de vidrio, el Geristore® y el EQUIA Forte® Fil, sobre fibroblastos de ratón de la línea celular L929 por medio del ensayo de SRB.

Antecedentes

Los cementos de ionómero de vidrio han sido utilizados en la práctica clínica desde su introducción hace aproximadamente 40 años, como producto de una reacción ácido-base entre un polvo de vidrio de fluoroaluminosilicato básico y ácido policarboxílico en presencia de agua (24). El interés en el uso clínico de estos cementos surge principalmente de su comportamiento como materiales adhesivos-bioactivos con la capacidad de adherirse a la dentina, la liberación de flúor sin pérdida de resistencia del material y la biocompatibilidad (30).

El uso de los cementos de ionómero de vidrio en el sistema de conductos radiculares fue introducido por primera vez por Pitt Ford en 1979, en un estudio de laboratorio donde usó la técnica de cono único. En este estudio describió que el tiempo de trabajo era demasiado corto para usarse junto con una técnica de compactación lateral (31). Desde entonces, las aplicaciones clínicas de estos cementos en endodoncia comprenden su uso como: cemento sellador de conductos, cemento de retrobturación periapical, sellador de perforaciones

o defectos por resorción o fractura de la raíz, sellador de la cámara pulpar, restauración temporal y relleno del surco palatino (30, 32-34).

No sólo en la literatura científica sino también en la industria dental, existe una tendencia con respecto al desarrollo de nuevos materiales de restauración híbridos que combinan resinas compuestas y los cementos de ionómero de vidrio. El enfoque implica combinar las propiedades ventajosas de ambos materiales, adhesivo-resina (resistencia mecánica, estética y alta fuerza de unión) y los cementos de ionómero de vidrio (propiedades autoadhesivas, tolerancia a la humedad y liberación de iones) (35).

Varios estudios clínicos han demostrado que Geristore® puede reparar defectos subgingivales y subóseos; y que puede usarse como barrera para la regeneración tisular guiada (3-5, 14, 15, 33). En menor cantidad, los estudios de biocompatibilidad sobre fibroblastos muestran una menor citotoxicidad para Geristore® que para los ionómeros de vidrio convencionales (4, 12, 17, 19).

En la actualidad, han surgido nuevos cementos a base de ionómero de vidrio convencionales de alta viscosidad como EQUIA Forte® Fil que permiten restauraciones en bloque simplificando maniobras operatorias (20). Estos materiales fueron desarrollados cambiando la distribución del tamaño de las partículas, creando una matriz reticulada que aumentó la dureza y resistencia de los cementos de ionómero de vidrio convencionales con la finalidad de abordar sus características negativas (tiempo de fraguado prolongado, baja fuerza de unión, alta solubilidad y sensibilidad a la humedad en el proceso de fraguado inicial) (22).

La viabilidad de células troncales de la pulpa dental, de células de la pulpa dental humanas y de células VERO incubadas con EQUIA Forte® Fil y otros materiales de restauración ha sido evaluada (22-26, 36). Dentro de los métodos que se han usado para dicha evaluación se encuentran la técnica del Bromuro de dimetil tetrazolio (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 o MTT, Anexina V y ensayos de proliferación (WST-1). Los extractos de EQUIA Forte® Fil mostraron tasas de proliferación celular similares a las del grupo de control a partir de las 72 horas.

Existen dos estudios sobre la viabilidad celular de EQUIA Forte® Fil sobre fibroblastos. Ersahan et al. comparó siete cementos de ionómero de vidrio contemporáneos sobre fibroblastos de ratón (L929) en tres tiempos diferentes (24, 48 y 72h) mediante la técnica de MTT (24). En esos estudios se mostró que la viabilidad de más del 100% en todos los tiempos examinados, confirmando la

biocompatibilidad de este material. Por otro lado, Campos et al. comparó EQUIA Forte® Fil con su predecesor EQUIA® Fil sobre fibroblastos gingivales humanos mediante la técnica de WST-1 y la prueba de DNA libre. La viabilidad celular disminuyó a un 82.61 % al ser expuestos a este material. (20)

Los cambios en la composición de los biomateriales exigen realizar un control de calidad de estos analizando, además de sus propiedades físicas, su biocompatibilidad. Los ensayos in vitro de biocompatibilidad son necesarios y recomendados por la ANSI/ADA (20). La citotoxicidad del EQUIA Forte® Fil no ha sido probada usando el ensayo de sulforrodamina B como lo indica la norma ISO 10993-5:2009 para su uso clínico (28). En este estudio realizaremos el ensayo SRB, que se basa en la capacidad de la SRB para unirse a los componentes proteicos de las células. La SRB es un colorante de aminoxanteno de color rosa brillante con dos grupos sulfónicos que se unen a residuos de aminoácidos básicos en condiciones ácidas y se disocian en condiciones básicas. Como la unión de SRB es estequiométrica, la cantidad de colorante extraído de las células teñidas es directamente proporcional a la masa celular. La fuerte intensidad de la tinción SRB permite que el ensayo se lleve a cabo en una placa de 96 pozos (29).

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para ensayos de toxicidad de fármacos sobre diferentes tipos de líneas celulares cancerosas y no cancerosas. La eficacia de la técnica SRB se compara con frecuencia con la de otro método que utiliza el colorante de tetrazolio MTT. El ensayo de MTT requiere actividad metabólica celular para convertir el tetrazolio incoloro en cristales de formazán de color púrpura. Por lo tanto, detecta solo células viables, mientras que el método SBR no distingue entre células viables y muertas. Sin embargo, esta diferencia no compromete la capacidad del ensayo SRB para detectar los efectos de citotoxicidad de un fármaco. La tinción con SRB es independiente de la actividad metabólica celular (29).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

1. Compuestos a probar.

Los cementos de ionómero de vidrio utilizados fueron Geristore® y EQUIA Forte®. Geristore® es un cemento a base de resina y EQUIA Forte® Fil es un cemento híbrido de alta viscosidad. Geristore® con presentación pasta-pasta, en jeringa

con puntas automezcladoras y EQUIA Forte® Fil con presentación polvo – líquido, en cápsula (Tabla 1). El medio de cultivo EMEM suplementando con 10% de suero fetal bovino (SFB) fue utilizado como control negativo y el Accocit® (cisplatino) como control positivo durante la evaluación de la citotoxicidad.

Tabla 1. Cementos de ionómero de vidrio.

Material	Tipo de Cemento De Ionómero De Vidrio	Composición	Fabricante
Geristore®	<i>A base de resina</i>	<p>Resina: Dimetacrilato aromático, HEMA (Hidroxietil metacrilato), Bis-GMA (Bisfenol A-glicidil metacrilato), TEGDMA (Tetraetilenglicol dimetacrilato), UDMA (Uretano dimetacrilato), iniciadores y estabilizantes.</p> <p>Rellenos: Vidrio de fluorosilicato de bario Sílice submicrónica.</p>	<i>Den-Mat, Santa María, CA, USA</i>
EQUIA Forte® Fil	<i>Alta viscosidad</i>	<p>Polvo: 100 % vidrio de fluoroaluminosilicato de estroncio</p> <p>Líquido: 35 % HEMA, 25 % agua destilada, 24 % ácido poliacrílico, 6 % ácido tartárico y 0,10 % canforquinona</p>	<i>GC Corp. Tokyo-Japón</i>

2. Línea celular

En este ensayo se utilizaron fibroblastos de ratón de la línea celular L929 (ATCC: CCL-1).

Procedimientos

1. Preparación de los cementos ionómero de vidrio.

Los cementos de ionómero de vidrio fueron preparados con base en las indicaciones de cada fabricante (Tabla 2).

Tabla 2. Modo de preparación de los cementos de ionómero de vidrio según el fabricante.

Material	Indicaciones
Geristore®	<ol style="list-style-type: none"> 1. Preparar la jeringa automezcladora. <ol style="list-style-type: none"> a. Alinear al borde recto de la punta automezcladora con la brida de la jeringa b. Empujar la punta mezcladora en la jeringa y girarla 90° en el sentido de las agujas de reloj hasta que se detenga c. Fijar la punta intraoral firmemente 2. Dispensar Geristore® sobre la zona a restaurar. El material alcanzará el curado final en 3-4 minutos. El tiempo de trabajo es de 1 ½ a 2 minutos a menos que material sea fotocurado. 3. Fotopolimerización. Lámparas de polimerización con densidad de potencia inferior a 800 mW/cm². Cure por la cara bucal y lingual con exposiciones de 20 segundos para cada área.
EQUIA Forte® Fil	<ol style="list-style-type: none"> 1. Activación de la cápsula y mezclado <ol style="list-style-type: none"> a. Antes de activar, agite la cápsula o golpéela sobre una superficie dura para desprender el polvo b. Para activar la cápsula presione el émbolo hasta que queda a nivel del cuerpo principal y manténgalo presionada durante 2 segundos c. Seguidamente colóquela en el mezclador (o amalgamador) y mezcle durante 10 segundos (~4000RPM) 2. Técnica de restauración <ol style="list-style-type: none"> a. Retirar inmediatamente la cápsula mezclada del vibrador y colóquela en un aplicador de cápsula GC b. Haga dos clics para cebar la cápsula y aplique. El tiempo de trabajo es de 1 min y 30 s desde el comienzo de la mezcla a 23 °C 3. Fotopolimerización Fotopolimerizar inmediatamente todas las superficies con unidad de polimerización de luz visible (>500 Mw/cm²) durante 20 segundos.

2. Preparación de medios condicionados de los materiales.

Los medios condicionados se obtuvieron siguiendo la norma ISO 10993-5:2009. Los cementos ionómero de vidrio fueron manejados bajo condiciones estériles en una campana de flujo laminar, todos los materiales fueron esterilizados utilizando luz ultravioleta por 15 minutos.

En tubos de centrífuga de 15 mL se colocaron 0.462 g de cada cemento de ionómero de vidrio y se le agregaron 2.31 mL de medio de cultivo EMEM para obtener eluciones de 1:6 que fueron colocadas en una incubadora (Nuairé™, Plymouth, USA) a 37°C con 85% de humedad relativa y 5% de CO₂. Los medios condicionados se retiraron a los tiempos establecidos de 24, 48 y 72 horas. Posteriormente se prepararon diluciones medio 85%, 70%, 50%, 40%, 25% y 10%. El

control negativo fue medio de cultivo EMEM que fue recolectado a las 24, 48 y 72 horas y el control positivo fue el Accocit (cisplatino) en cuatro concentraciones. (Figura.1)

24 horas		48 horas		72 horas		Controles	
Geristore®	EQUIA Forte® Fil	Geristore®	EQUIA Forte® Fil	Geristore®	EQUIA Forte® Fil	EMEM	Acocit
100%	100%	100%	100%	100%	100%	24h	100 µg/mL
85%	85%	85%	85%	85%	85%	48h	10 µg/mL
70%	70%	70%	70%	70%	70%	72h	1 µg/mL
50%	50%	50%	50%	50%	50%		0.1 µg/mL
40%	40%	40%	40%	40%	40%		
25%	25%	25%	25%	25%	25%		
10%	10%	10%	10%	10%	10%		
0%	0%	0%	0%	0%	0%		

Figura 1. Diagrama de la gradilla para la recolección de diluciones de medios condicionados y controles. Representación de la gradilla con los tubos Eppendorf que contenían medios condicionados en todas las diluciones evaluadas de ambos cementos ionómero de vidrio. También se indica la recolección de medio de cultivo EMEM a las 24, 48 y 72h y del control positivo en las concentraciones establecidas.

3. Cultivo celular

La proliferación celular se realizó bajo las condiciones estándares de cultivo (37°C, 85% de humedad relativa 5% CO₂) en la incubadora (INCC-UNIPREC-01) hasta que el cultivo celular alcanzó un 80-90% de confluencia en la superficie de cultivo. El medio de cultivo fue EMEM suplementado con 10% de SFB.

Para la siembra de las células en las placas de cultivo de 96 pozos se retiró el medio EMEM de la botella de cultivo con una pipeta de vidrio en conjunto con una bomba de vacío, se lavó dos veces con solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) y para desprender las células de la superficie Tripsina-EDTA durante cinco minutos. A continuación, para detener la reacción de la tripsina se añadió PBS suplementado con 5% SFB. Esta mezcla fue trasladada a un tubo de 50 mL y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min a 20°C. Se decanta el sobrenadante obteniéndose un botón de células que se resuspendió en medio de cultivo EMEM. Para el conteo de las células se usó azul tripano. Con la ayuda de

microscopio de luz IX70 Olympus (Center Valley, PA, USA) y un piano para contar células se realizó el conteo de los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer. En cada pozo de cada una de las cajas de 96 pozos se sembraron 20,000 fibroblastos en medio EMEM.

4. Ensayo de citotoxicidad

En dos placas de cultivo (A y B) de 96 pozos (Corning Inc., Corning, NY) fueron sembrados 20,000 fibroblastos con 100 μ L de medio EMEM, en cada pozo. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora durante 24 h a 37 °C, 85 % de humedad relativa y 5% de CO₂. Este tiempo es el necesario para permitir que los fibroblastos se adhirieran a la superficie de los pozos. Pasado este tiempo, se removió del medio de cultivo y se agregaron 100 μ L de las diferentes diluciones de los medios condicionados con base en el diseño de placa (Figura 2). Cada cemento y tiempo fueron preparados por triplicado para verificación por dos operadores. También se agregaron el control positivo y el control negativo (Figura 2-B).

5. Ensayo de citotoxicidad

Una vez adicionados los medios condicionados, la placa se incubó por 24 h a 37°C, 85 % de humedad relativa y 5% de CO₂. Después de este tiempo, la morfología celular se evaluó con un microscopio de luz IX70 Olympus (Center Valley, PA, USA). Las fotografías fueron tomadas en los diferentes tiempos. La revisión microscópica de las monocapas celulares fue evaluada para determinar su grado de citotoxicidad.

De acuerdo con la norma ISO 10933-5:2009 un producto es citotóxico si presenta una disminución de la viabilidad mayor al 30%. El grado de citotoxicidad se determinó según la tabla 3.

A.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
B	85%	85%	85%	85%	85%	85%	85%	85%	85%	85%	85%	85%
C	70%	70%	70%	70%	70%	70%	70%	70%	70%	70%	70%	70%
D	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%
E	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%
F	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%
G	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%
H	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	Geristore® 72h			EQUIA® Forte 72h			Geristore® 48h			EQUIA® Forte 48h		

B.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100 µg/mL	100 µg/mL	100 µg/mL	24h	24h	24h
B	85%	85%	85%	85%	85%	85%	10 µg/mL	10 µg/mL	10 µg/mL	24h	24h	24h
C	70%	70%	70%	70%	70%	70%	1 µg/mL	1 µg/mL	1 µg/mL	48h	48h	48h
D	50%	50%	50%	50%	50%	50%	0.1 µg/mL	0.1 µg/mL	0.1 µg/mL	48h	48h	48h
E	40%	40%	40%	40%	40%	40%				72h	72h	72h
F	25%	25%	25%	25%	25%	25%				72h	72h	72h
G	10%	10%	10%	10%	10%	10%						
H	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	Geristore® 24h			EQUIA® Forte 24h			ACCOCIT			EMEM		

Figura 2. Diseño de las placas de 96 pozos A y B para pruebas de citotoxicidad. Diseño de las placas de cultivo de 96 pozos. En cada coordenada de la placa se muestra el cemento de ionómero de vidrio, su concentración y los controles a las diferentes horas.

Tabla 3. Grados de citotoxicidad y reactividad.

Grado	Reactividad	Condiciones del cultivo
0	Ninguna	Discretos gránulos intracitoplasmáticos, no hay lisis celular, no existereducción del crecimiento celular.
1	Insignificante	No más del 20% de las células son redondas opacas, pérdida de anclaje y sin gránulos intracitoplasmáticos o cambios en la morfología. Ocasionalmente se presenta lisis celular y ligera inhibición del crecimiento celular.
2	Leve	No más del 50% de las células son redondas y no más del 50% de inhibición del crecimiento celular.
3	Moderada	No más del 70% de las células son redondas o están lisadas y no se observa más del 50% de inhibición del crecimiento celular.
4	Severa	Casi completa o completa destrucción de las células.

6. Evaluación de la viabilidad celular mediante el ensayo de sulforrodamina B

Después de determinar el grado de citotoxicidad en las observaciones al microscopio, se fijaron las células, para esto se quitaron los medios condicionados y se agregaron 100 μL de ácido tricloroacético al 10% a cada uno de los 96 pozos dejándolo durante una hora en refrigeración (4° a 8°C). Posteriormente, se lavaron las placas cinco veces con agua corriente y las placas secaron 24 h. Pasado este tiempo, se adicionaron 50 μL de la solución de sulforrodamina B al 0.4% a cada uno de los pozos y la placa se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el exceso de colorante lavando la placa 5 veces con ácido acético al 1% y se dejó secar por un día a temperatura ambiente. El colorante restante se solubilizó añadiendo Tris base 10 mM (pH 10.5) dejando reposar por 5 minutos. Como la unión de sulforrodamina es estequiométrica, la cantidad de colorante extraído de las células teñidas es directamente proporcional a la masa celular por lo que la absorbancia se leyó en un lector de microplacas (LEIN-UNIPREC-01 o LECC-UNIPREC-01) a una longitud de onda de 490 nm.

7. Estadística

La comparación entre las diferentes condiciones de cada medicación y los controles se realizó haciendo un análisis de varianza ANOVA, con prueba post hoc de Tukey (KaleidaGraph Versión 4.5).

RESULTADOS

Morfología celular: Grado de citotoxicidad y reactividad

La citotoxicidad de Geristore® sobre la línea celular L929 es dosis dependiente.

Con el objetivo de evaluar el grado de citotoxicidad y reactividad se usaron los criterios de la tabla 3 y se evaluaron fotografías de los fibroblastos L929 incubados con Geristore® que fueron tomadas en cada una de las condiciones. Los grados de citotoxicidad de Geristore® se presentaron de la siguiente forma. Al **100%** presentó un grado 4 de citotoxicidad y reactividad severa, más del 70% de las células se observan redondas, opacas y lisas; se observó una destrucción casi completa de las células (Figura 3A, E e I; Tabla 4). Al **85%** y **70%** presenta a más de la mitad de las células con una morfología redonda y se observa la pérdida de la confluencia de la monocapa de células que se corresponde a un grado de citotoxicidad grado 3 y reactividad moderada. Al **50%** presentó un grado 2 de citotoxicidad y reactividad leve, se observan alrededor del 30% de células redondas, lisas y opacas existe una pérdida de la confluencia de la monocapa con espacios pequeños. (Figura 3B,F y J; Tabla 4). Al **40%** se observa una ligera inhibición del crecimiento celular y muy pocas células presentan una alteración en su morfología, este resultado se corresponde con un grado 1 de citotoxicidad y reactividad insignificante. Al **25%** y **10%** presentó un grado 0 de toxicidad y ninguna reactividad. Las fotografías a estas diluciones son muy similares a las del grupo control negativo EMEM (Figura 3D,H y L; Tabla 4), no existe lisis celular, ni reducción del crecimiento celular. La monocapa de células se mantienen confluyente, se observan células con su morfología triangular y algunas células redondas pero refringentes, este comportamiento cumple con características de proliferación celular (Figura 3C, G y K; Tabla 4).

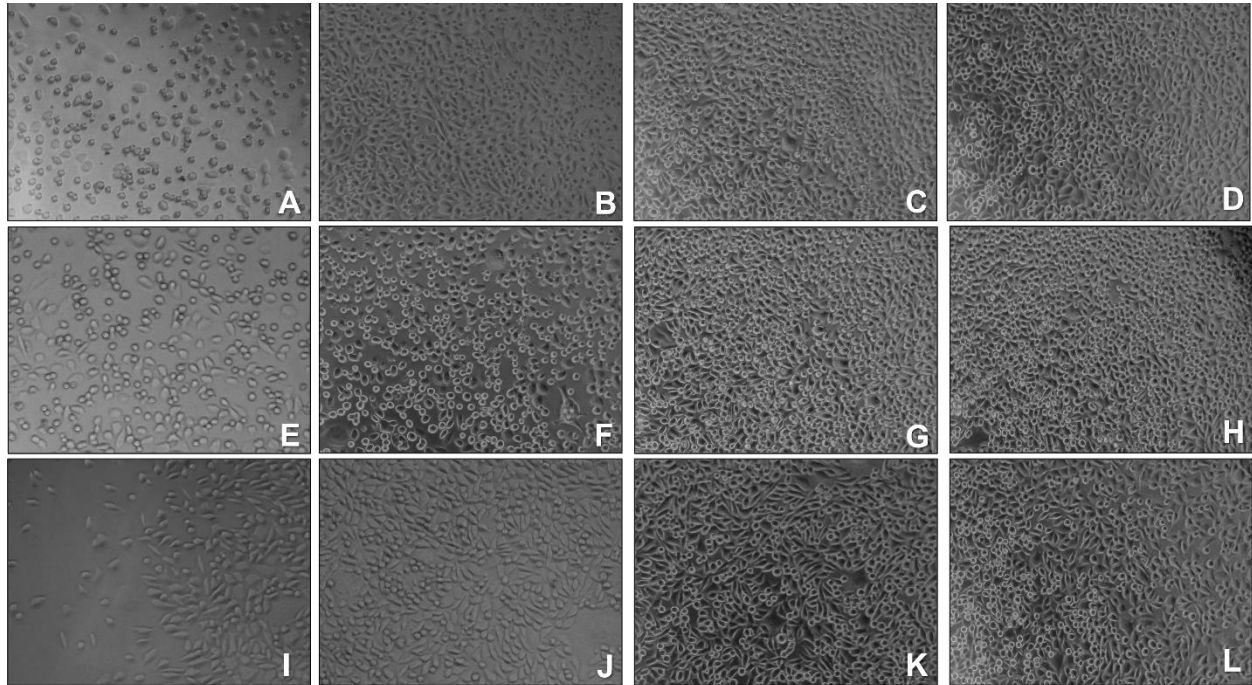


Figura 3. Morfología celular de fibroblastos L929 incubados con Geristore®. Exposición a las 24 h de los medios condicionados en las diluciones de: A) 100%. B) 50% C) 25% D) EMEM. A las 48 h medios condicionados en las diluciones de: E) 100%. F) 50% G) 25% H) EMEM. A las 48 h medios condicionados en las diluciones de: I) 100%. J) 50% K) 25% L) EMEM.

Tabla 4. Grado de citotoxicidad y reactividad de Geristore® sobre la línea celular L929

	24 h	48 h	72 h
100%	Grado 4	Grado 4	Grado 4
85%	Grado 3	Grado 3	Grado 3
70%	Grado 2	Grado 3	Grado 3
50%	Grado 2	Grado 2	Grado 2
40%	Grado 1	Grado 1	Grado 1
25%	Grado 0	Grado 0	Grado 0
10%	Grado 0	Grado 0	Grado 0

La citotoxicidad del EQUIA Forte® Fil sobre la línea celular L929 es dosis dependiente

Con el objetivo de evaluar el grado de citotoxicidad y reactividad se usaron los criterios de la tabla 3 y se evaluaron fotografías de los fibroblastos L929 incubados con EQUIA Forte® Fil que fueron tomadas en cada una de las condiciones. Los grados de citotoxicidad de EQUIA Forte® Fil se presentaron de la siguiente forma. En las fotografías de EQUIA Forte® Fil al **100%**, **85%** y **70%** se observa una casi completa inhibición del crecimiento celular, lisis celular y las células se observan pequeñas, redondas y opacas por lo que se corresponde con un grado 4 de citotoxicidad y reactividad severa (Figura 4A, E e I; Tabla 5). Al **50%** presentó un grado de toxicidad 3 y reactividad moderada, se observa una morfología celular redonda, lisa y opaca en más del 50% de las células, y existe una pérdida en la confluencia de la monocapa de los fibroblastos con aproximadamente un 50% de inhibición celular (Figura 4B, F y J; Tabla 5). Al **40%** se observa menos de la mitad de las células con una morfología celular redonda, opaca y lisa, existe una pérdida de la confluencia de la monocapa celular con la presencia de espacios pequeños por lo que inhibición celular es menor al 50%, correspondiéndose a un grado 2 de citotoxicidad y reactividad leve. Al **25%** y **10%** presentó un grado 0 de citotoxicidad y ninguna reactividad, en estos grupos de EQUIA Forte® Fil se presenta una morfología celular muy similar al EMEM (Figura 4D, H y L; Tabla 5). No se observa lisis celular, ni reducción del crecimiento celular, la morfología de las células se presenta triangular y su disposición es contigua manteniendo la monocapa celular confluyente. (Figura 4C, G y K; Tabla 5).

Tabla 5. Grado de citotoxicidad y reactividad de EQUIA Forte® Fil sobre la línea celular L929

	24 h	48 h	72 h
100%	Grado 4	Grado 4	Grado 4
85%	Grado 4	Grado 4	Grado 4
70%	Grado 3	Grado 3	Grado 4
50%	Grado 3	Grado 3	Grado 3
40%	Grado 2	Grado 2	Grado 3
25%	Grado 0	Grado 0	Grado 0
10%	Grado 0	Grado 0	Grado 0

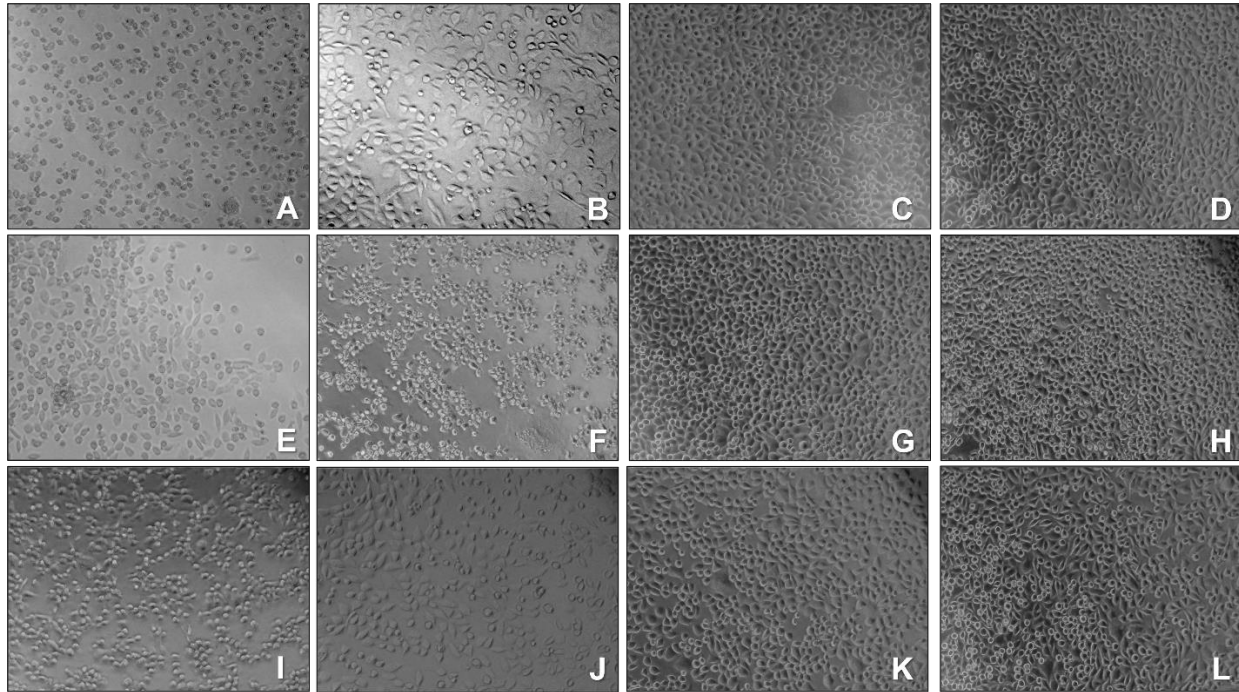


Figura 4. Morfología celular fibroblastos L929 incubados con EQUIA Forte® Fil. Exposición a las 24 h de los medios condicionados en las diluciones de: A) 100%. B) 50% C) 25% D) EMEM. A las 48 h medios condicionados en las diluciones de: E) 100%. F) 50% G) 25% H) EMEM. A las 48 h medios condicionados en las diluciones de: I) 100%. J) 50% K) 25% L) EMEM.

El grado y la severidad de citotoxicidad aumentan con la concentración de Accocit.

Los fibroblastos L929 fueron incubados con Accocit en concentraciones de 100, 10, 1 y 0.1 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 3). Para evaluar el grado de citotoxicidad se usó la escala de la tabla 3. En la concentración más alta (**10 $\mu\text{g/mL}$**), más del 70% de los fibroblastos muestran una morfología redonda, lisa y opaca; y se observa más del 50% de inhibición del crecimiento celular, por lo que, en estas condiciones los fibroblastos presentaron un grado 4 de citotoxicidad y reactividad severa (Figura 5A). En la concentración de **10 $\mu\text{g/mL}$** , menos del 50% de las células muestran morfología redonda y lisa la inhibición del crecimiento celular no sobrepasa el 50%, correspondiéndose con un grado 2 de citotoxicidad y reactividad leve. A una concentración menor de **1 $\mu\text{g/mL}$** se observa una ligera inhibición del crecimiento celular con pérdida en la confluencia de la monocapa; aproximadamente 15% de los fibroblastos presentan morfología redonda y opaca. Esto se corresponde a una reactividad insignificante y a un grado 1 de citotoxicidad. (Figura 5B) Con la concentración más baja de Accocit (**0.1 $\mu\text{g/mL}$**), Los fibroblastos presentan una morfología triangular, no se observa lisis celular por

lo que la confluencia de la monocapa se mantuvo en estas condiciones se corresponde a un grado 0 y ninguna reactividad (Figura 5C).

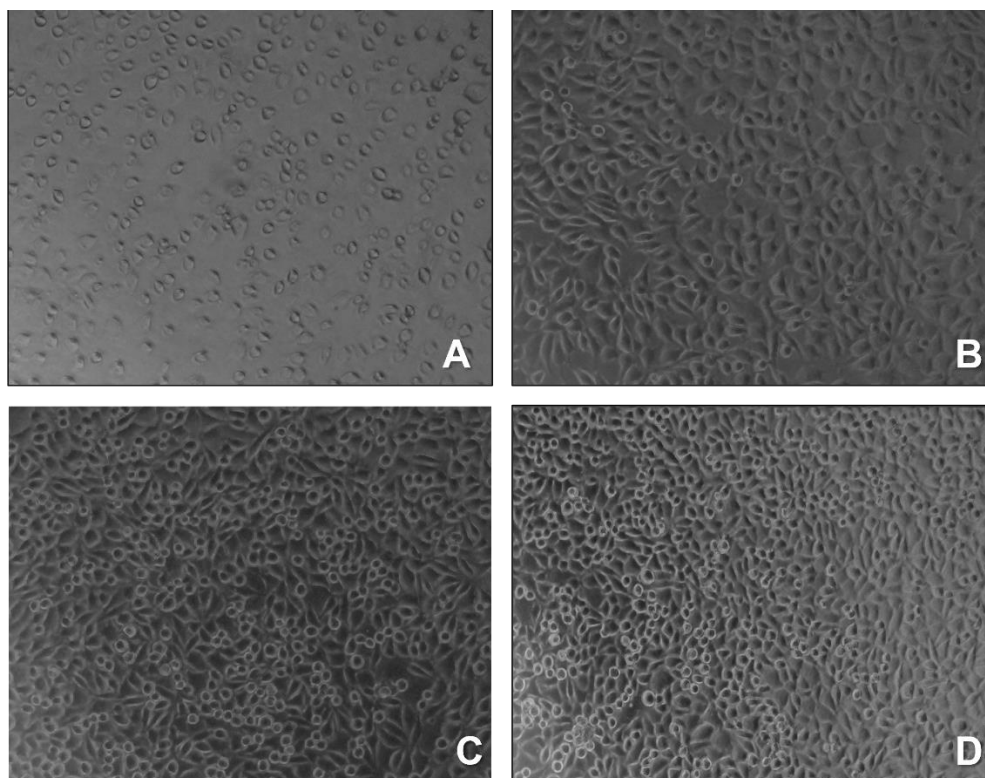


Figura 5. Morfología celular fibroblastos L929 incubados con ACOCCIT (control positivo). Concentraciones de **A.** 100 µg/mL **B.** 1 µg/mL **C.** 0.1 µg/mL **D.** EMEM (Control negativo).

La citotoxicidad sobre fibroblastos L929 es mayor al ser expuestos a EQUIA Forte® Fil que al ser expuestos a Geristore® en todos los tiempos.

A las 24h, Geristore® presentó una citotoxicidad *grado 4* y reactividad severa en el medio condicionado sin diluir (**100%**) y EQUIA Forte® Fil en la diluciones de hasta **85%**. El *grado 3* de citotoxicidad y reactividad moderada se observó en Geristore® al **70%** y en EQUIA Forte® Fil hasta en diluciones del **50%**. El *grado 2* de citotoxicidad y reactividad leve se presentó en concentraciones de **50%** en los fibroblastos incubados con Geristore® y en concentraciones de **40%** los fibroblastos incubados en EQUIA Forte® Fil. El *grado 1* de citotoxicidad y reactividad insignificante se presentó en Geristore® al **40%**. En las diluciones de **10%** y **25%** con ambos cementos ionómero de vidrio, se presentó *grado 0* de citotoxicidad y la reactividad ninguna (Figura 6).

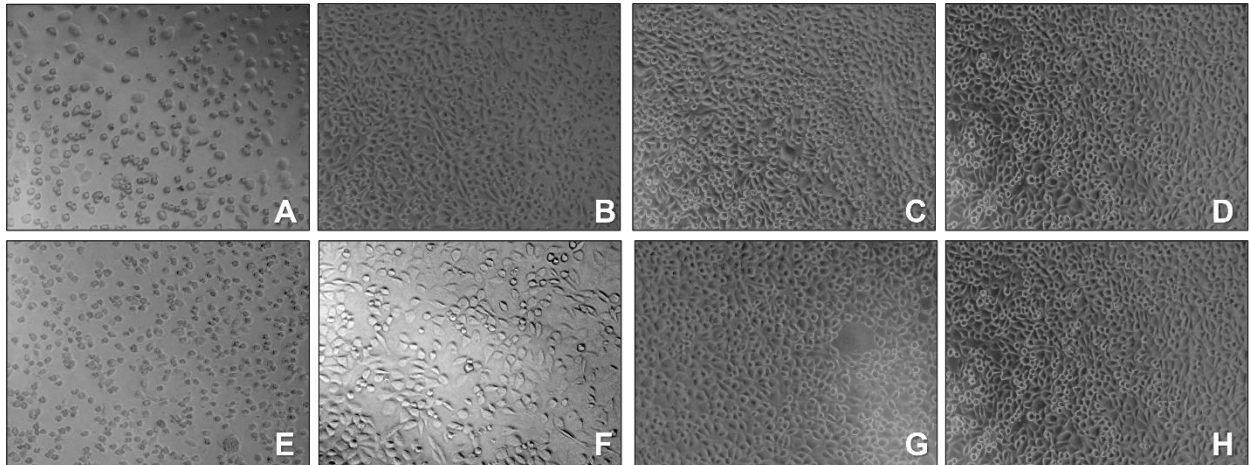


Figura 6. Comparación de la morfología celular de los fibroblastos L929 incubados con Geristore® y EQUIA Forte® Fil a las 24 h. Medios condicionados con Geristore®. A) 100% B) 50% C) 25%. Medios condicionados con EQUIA Forte® Fil E) 100% F) 50% G) 25%. D) y H) EMEM

A las 48h, Geristore® presentó una citotoxicidad sobre los fibroblastos de *grado 4* y reactividad severa en el medio condicionado sin diluir (**100%**) y en el caso de EQUIA Forte® Fil en diluciones de **85%**. El *grado 3* de citotoxicidad y reactividad moderada se observó con Geristore® al **85%** y con EQUIA Forte® Fil hasta en diluciones del **50%**. El *grado 2* de citotoxicidad y reactividad leve se presentó en concentraciones de **50%** con Geristore® y en concentraciones de **40%** con EQUIA Forte® Fil. El *Grado 1* de citotoxicidad y reactividad insignificante se presentó en Geristore® al **40%**. Con las diluciones de **10%** y **25%** de ambos medios condicionados de los cementos ionómero de vidrio, el grado de citotoxicidad fue *grado 0* y la reactividad fue ninguna (Figura. 7)

A las 72 h, los fibroblastos presentaron una citotoxicidad *grado 4* y reactividad severa con Geristore® en un medio condicionado sin diluir (**100%**) y con EQUIA Forte® Fil en diluciones de **70%**. El *grado 3* de citotoxicidad y reactividad moderada se observó en Geristore® con diluciones de hasta el **70%** y en EQUIA Forte® Fil en diluciones mayores a **40%**. El *grado 2* de citotoxicidad y reactividad leve se presentó en concentraciones de 40% con el medio condicionado de Geristore®. Para las diluciones de **25%** y **10%** con ambos medios condicionadas, se presentó un *grado 0* de citotoxicidad y la reactividad fue ninguna. (Figura. 8)

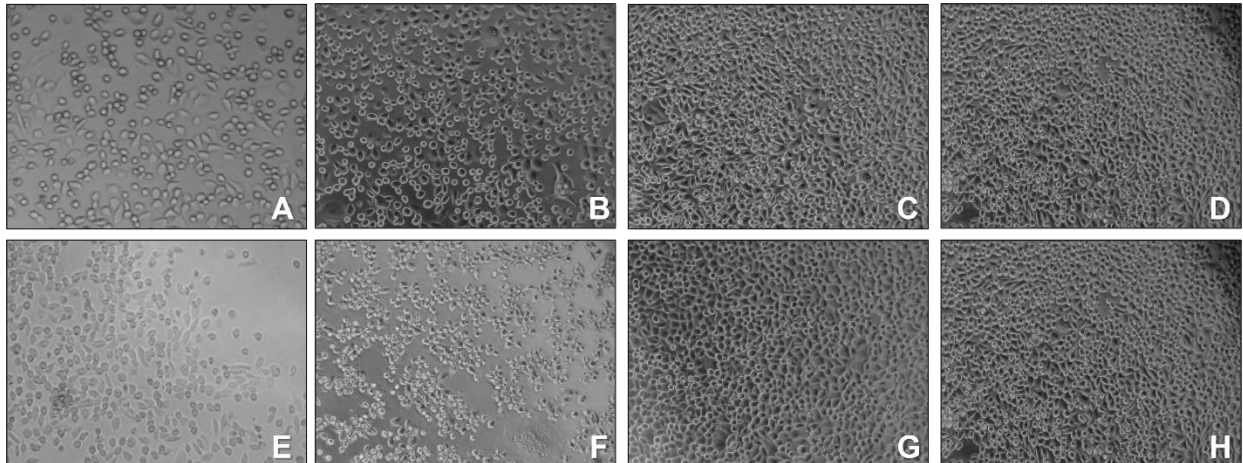


Figura 7. Comparación de la morfología celular de los fibroblastos L929 incubados con Geristore® y EQUIA Forte® Fil a las 48 h. Medios condicionados con Geristore®. A) 100% B) 50% C) 25%. Medios condicionados con EQUIA Forte® Fil E) 100% F) 50% G) 25%. D) y H) EMEM

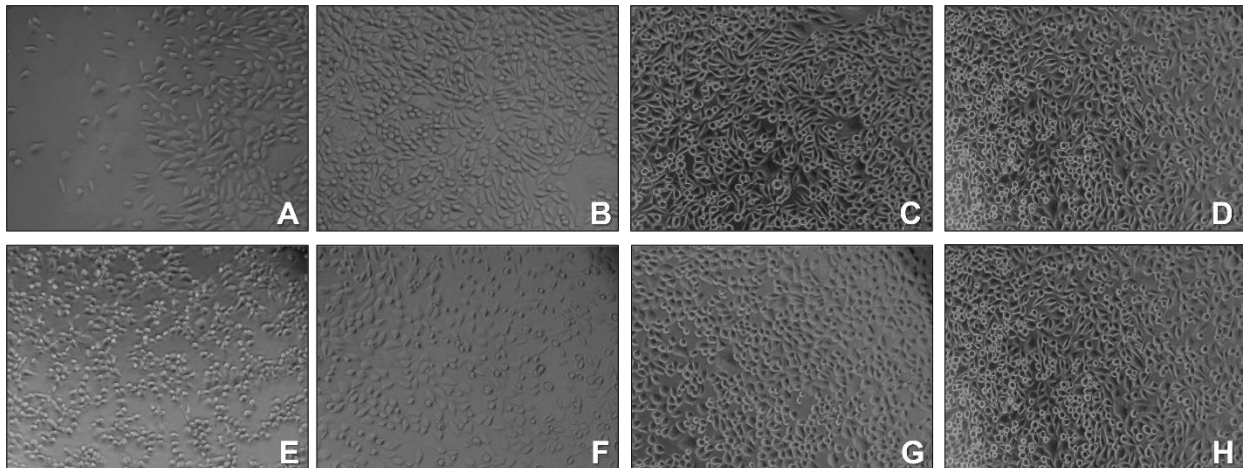


Figura 8. Comparación de la morfología celular de los fibroblastos L929 incubados con Geristore® y EQUIA Forte® Fil a las 72 h. Medios condicionados con Geristore®. Medios condicionados con Geristore®. A) 100% B) 50% C) 25%. Medios condicionados con EQUIA Forte® Fil E) 100% F) 50% G) 25%. D) y H) EMEM

Sobrevida medida con el método de sulforrodamina B

La viabilidad de los fibroblastos disminuye de manera dosis-dependiente al ser expuestos a Geristore® independientemente del tiempo al que se mida.

Para conocer el grado de viabilidad celular del cemento ionómero de vidrio Geristore® se realizó una prueba de sulforrodamina B. Al exponer los fibroblastos

al medio condicionado de 24 h sin diluir (**100%**), la viabilidad celular fue de 37.65%. La viabilidad celular fue aumentando conforme se diluyó este cemento de la siguiente forma. Al comparar el cemento sin diluir con la dilución al **85%**, la viabilidad celular fue de 54.15% ($p = 0.07$; (Figura 9). Al compararlo con el del **70%**, la viabilidad celular fue de 64.20% ($p=0.0001$; Figura 9); con el de **50%**, la viabilidad aumentó a un 75.21% ($p=0.0001$; Figura 9); con el del **40%** la viabilidad fue de 85.96% ($p=0.0001$; Figura 9); con el del **25%** la viabilidad fue del 99.07% ($p=0.0001$; Figura 9) y finalmente con el del **10%**, la viabilidad fue del 113.07% ($p=0.0001$; Figura 9). Esto nos muestra una relación directa de la concentración y el porcentaje de viabilidad. La citotoxicidad no fue afectada por el tiempo de exposición, no hubo diferencias significativas entre el porcentaje de viabilidad obtenido entre los diferentes tiempos a las diferentes diluciones (Figura. 9)

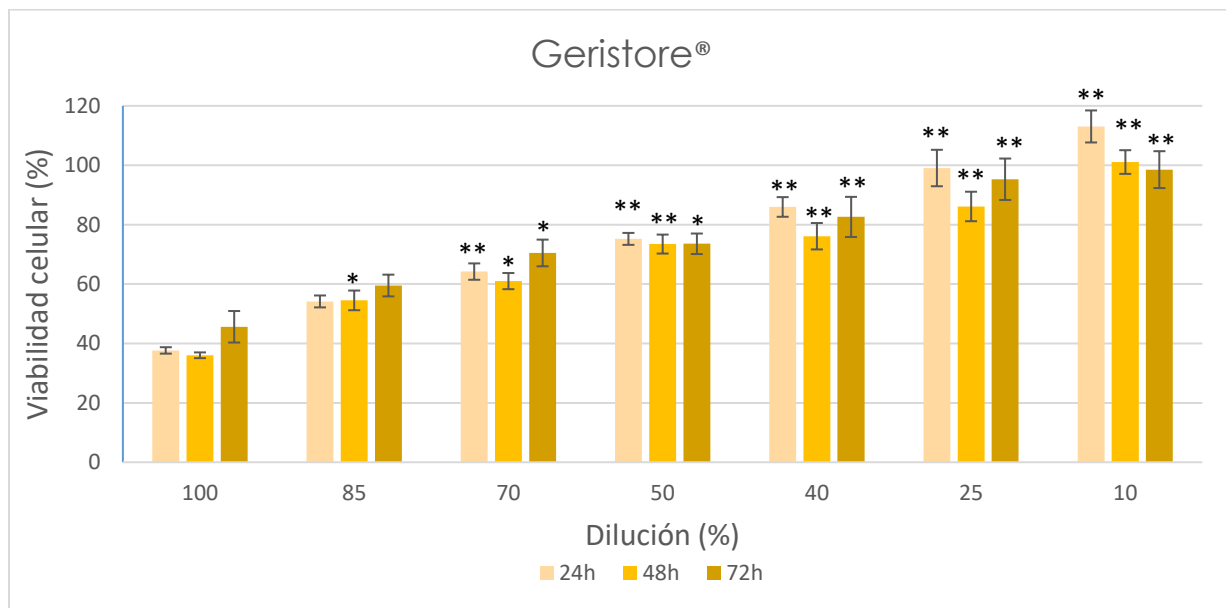


Figura 9. Porcentaje de viabilidad de los fibroblastos L929 después de la exposición a las distintas diluciones de Geristore® en los tiempos de 24, 48 y 72h, analizados con sulforrodamina B. Las barras indican el promedio de dos experimentos por triplicado \pm SE. * $p < 0.05$ ** $p < 0.0001$ diferencia entre el medio condicionado al 100% y el de cada dilución de cada tiempo evaluado.

La viabilidad de los fibroblastos disminuye de manera dosis-dependiente al ser expuestos a EQUIA Forte® Fil.

De la misma manera se realizó la prueba de sulforrodamina B para conocer el grado de citotoxicidad del cemento ionómero de vidrio EQUIA Forte® Fil. A los tres diferentes tiempos 24h, 48h, y 72h se observa que a mayor dilución se observa una mayor viabilidad celular (Figura 10). Al exponer los fibroblastos al medio

condicionado de 24h, 48h y 72h sin diluir (**100%**), la viabilidad celular fue de 11.79%, 14.11% y de 8.98%, respectivamente. Al comparar el cemento sin diluir con la dilución al **85%**, la viabilidad celular fue de 42.08% ($p = 0.001$; (Figura 10), 26.65% ($p = 0.5$; (Figura 10) y 20.55% ($p = 0.8$; (Figura 10), a las 24h, 48h y 72h, respectivamente. Al comparar el cemento sin diluir con la dilución al **70%** de 50.70% ($p = 0.001$; (Figura 10), 34.74% ($p = 0.012$; (Figura 10), y 29.62% ($p = 0.04$; (Figura 10), a las 24h, 48h y 72h, respectivamente. Al comparar el cemento sin diluir con la dilución a la mitad (**50%**) fue de 65.57%, 48.73% y 38.67%, a las 24h, 48h y 72h, respectivamente ($p = 0.001$; (Figura 10). Al comparar el cemento sin diluir con la dilución al **40%** la viabilidad celular fue de 84.59%, 62.62% y 45.11% a las 24h, 48h y 72h, respectivamente ($p = 0.001$; (Figura 10). Al diluir al **25%** la viabilidad aumentó a 101.53%, 79.21% y 64.95% a las 24h, 48h y 72h, respectivamente ($p = 0.001$; (Figura 10). Finalmente, al **10%** la viabilidad fue de 102.18%, 108.95% y de 102.18%, a las 24h, 48h y 72h, respectivamente ($p = 0.001$; (Figura 10). Esto nos muestra una relación directa entre la concentración de los medios condicionados y el porcentaje de viabilidad celular de la línea celular L929 (Figura. 10).

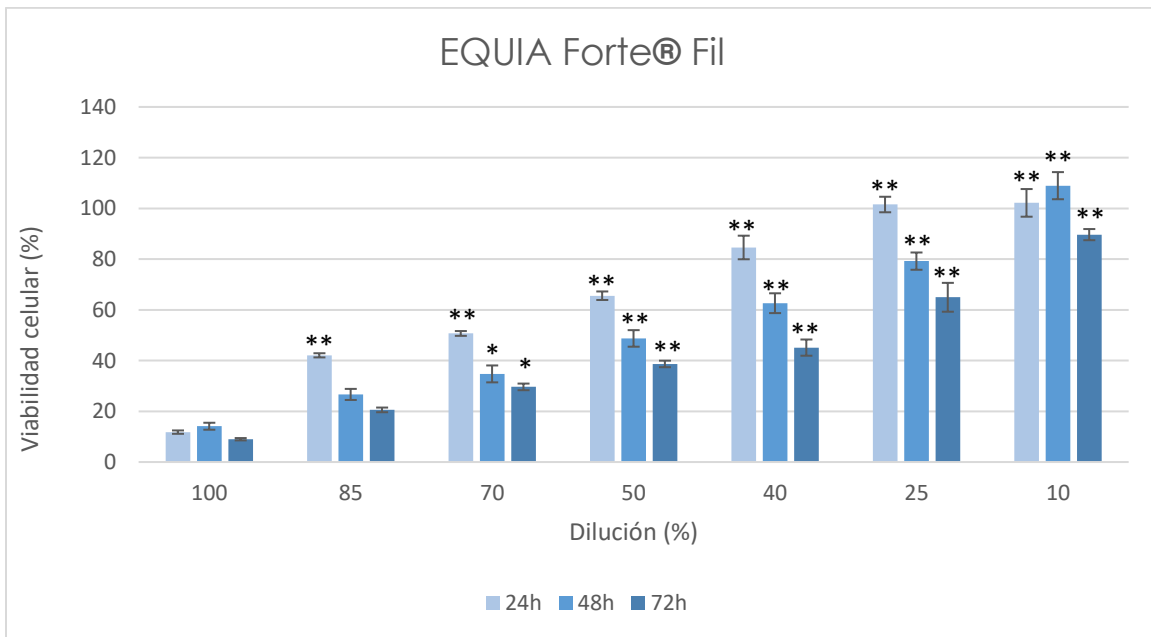


Figura 10. Porcentaje de viabilidad de los fibroblastos L929 después de la exposición a las distintas diluciones de EQUIA Forte® Fil en los tiempos de 24, 48 y 72h, analizados con sulforrodamina B. Las barras indican el promedio de dos experimentos por triplicado \pm SE. * $p < 0.05$ ** $p < 0.0001$ diferencia entre el medio condicionado al 100% y el de cada dilución de cada tiempo evaluado.

La viabilidad de los fibroblastos disminuye con el tiempo al ser expuestos a EQUIA Forte® Fil.

Se observa que al exponer los fibroblastos L929 a los medios condicionados de cemento ionómero de vidrio EQUIA Forte® Fil la viabilidad fue mayor a las 24h que a las 72h para todas las diluciones ($24h > 72h$). En un medio condicionado sin diluir (**100%**) la viabilidad disminuyó de las 24h a las 72h un 2.81% ($p=1$). Al diluir al **85%** disminuyó un 21.52% ($p=0.0006$), al **70%** un 21.07% ($p=0.0009$), al **50%** un 26.90% ($p < .0001$), al **40%** un 39.48% ($p < .0001$), al **25%** un 36.58% ($p < .0001$) y por último al **10%** un 12.52% ($p=0.35$). En las diluciones donde p es menor a 0.05 hubo una diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de viabilidad celular entre ambos tiempos, lo que nos muestra que la citotoxicidad de EQUIA Forte® Fil aumenta con el tiempo (Figura 11)

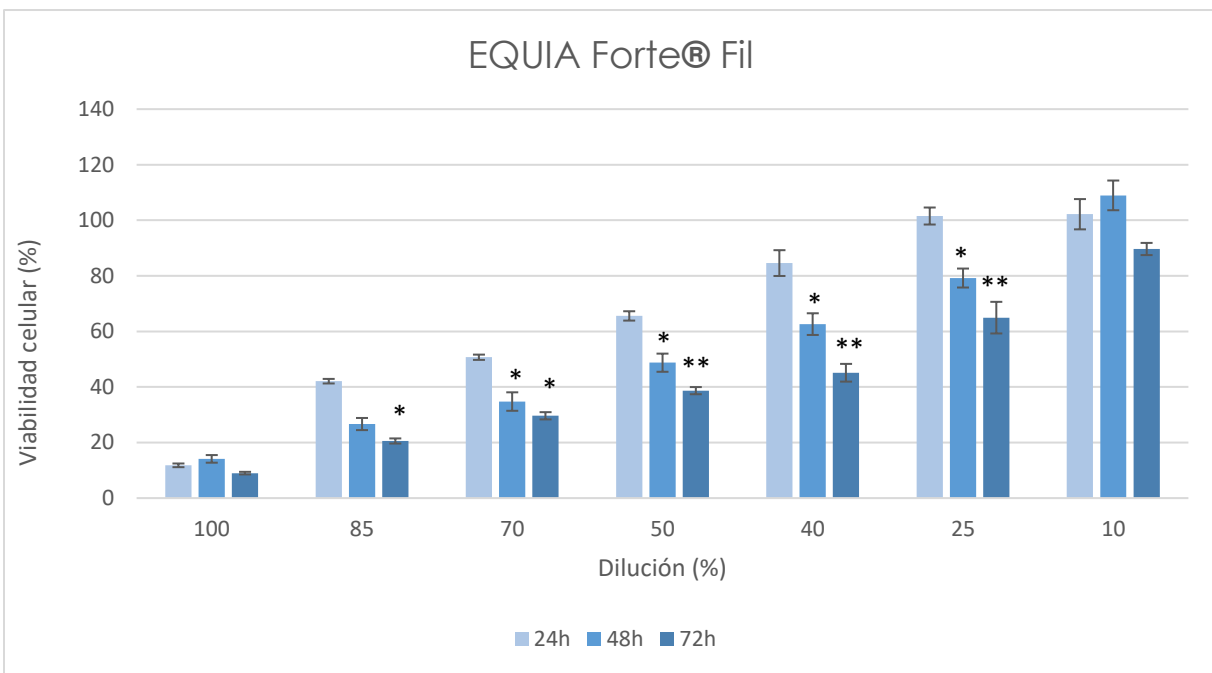


Figura 11. Porcentaje de viabilidad de los fibroblastos L929 después de la exposición a las distintas diluciones de EQUIA Forte® Fil en los tiempos de 24, 48 y 72h, analizados con sulforrodamina B. Las barras indican el promedio de dos experimentos por triplicado \pm SE. El eje horizontal indica el porcentaje de dilución del medio condicionado. * $p < 0.05$ cuando se compara la viabilidad celular con las 24h de cada dilución.

La viabilidad de los fibroblastos disminuye de manera dosis-dependiente al ser expuestos a Accocit.

Accocit fue el control positivo de este trabajo, es un fármaco utilizado para tratamientos contra cáncer. Los fibroblastos L929 fueron expuestos a cuatro concentraciones decrecientes de este medicamento. El porcentaje de viabilidad celular se reduce en las células de forma dosis dependiente. Siendo el porcentaje de viabilidad celular de 32.78% en su concentración más alta de **100 µg/mL** ($p < .0001$). De 49.03% en su concentración de **10 µg/mL** ($p < .0001$). De 84.06% en su concentración de **1 µg/mL** ($p = 0.15$). Y finalmente de 100.76% en su concentración de **0.1 µg/mL** ($p = 1$) (Figura 12).

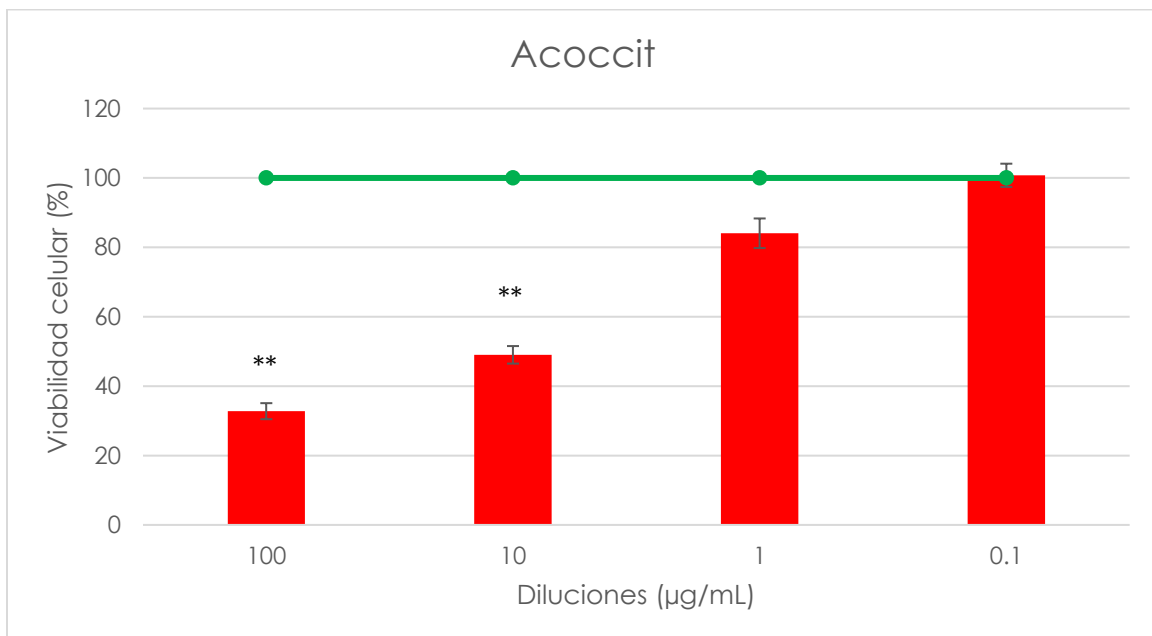


Figura 12. Porcentaje de viabilidad de los fibroblastos L929 después de la exposición a las distintas diluciones de Accocit®, analizados con sulforrodamina B. Las barras indican el promedio de dos experimentos por triplicado \pm SE. La línea verde indica el valor de medio de cultivo EMEM a las 24h, que es tomado como el 100% de viabilidad celular. ** $p < 0.0001$.

La viabilidad de los fibroblastos es mayor al ser expuestos a Geristore® que al ser expuestos a EQUIA Forte® Fil en todos los tiempos.

Se comparó el grado de citotoxicidad de los cementos de ionómero de vidrio Geristore® y EQUIA Forte® Fil sobre la línea celular L929. Al exponer los fibroblastos a todas las diluciones de los medios condicionados durante los tiempos de 24, 48 y 72h, el porcentaje de viabilidad celular fue mayor durante la exposición a Geristore® que durante la exposición de a EQUIA Forte® Fil en la mayoría de las

diluciones exceptuando al **25%** a las 24h ($p=1$) y al **10%** a las 48h ($p=0.98$). A las 24h, los medios condicionados en comparación con el grupo control negativo EMEM presentaron diferencias estadísticamente significativas (Figura. 13), con ambos cementos en las diluciones de 100%, 85%, 70%, 50%. A las 48h, los medios condicionados en comparación con el grupo control negativo EMEM presentaron diferencias estadísticamente significativas (Figura. 14), con ambos cementos en todas las diluciones exceptuando las de 25% y 10%. A las 72h (Figura 15), los medios condicionados en comparación con el grupo control negativo EMEM presentaron diferencias estadísticamente significativas, con Geristore® a las diluciones de 100%, 85%, 70% y 50%; y por su parte EQUIA Forte® Fil con todas las diluciones ($p= < .0001$) excepto la de 10% ($p=0.99$). Por otro lado, la norma ISO10993-5:209 afirma que cuando se presenta una reducción de más del 30% de viabilidad celular se considera que existe un efecto citotóxico de los materiales. En este estudio se tomó el grupo control negativo de EMEM como el valor de 100% de viabilidad celular, por lo que valores menores a 70% serían considerados citotóxicos. Por lo tanto, en el caso del cemento de ionómero de vidrio Geristore® fue biocompatible a partir de las diluciones menores al **50%** a las 24h y 48h y a partir de las diluciones menores al **70%** a las 72h. En el caso de EQUIA Forte® Fil presentó biocompatibilidad a partir de las diluciones menores al **40%** a las 24h, menores al **25%** a las 48 h y solamente a la dilución de **10%** a las 72h. El porcentaje de viabilidad celular obtenida para cada una de las diluciones a las 24, 48 y 72h se presentan en las tablas 6, 7 y 8 respectivamente.

Tabla 6. Porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos L929 después de la exposición a las diluciones de los medios condicionados de los cementos Geristore® y EQUIA Forte® Fil a las 24 horas. ** $p<.001$ en comparación con la viabilidad de fibroblastos con Geristore®

24h	100%	85%	70%	50%	40%	25%	10%
Geristore®	37.65	54.15	64.20	75.21	85.96	99.07	113.07
EQUIA Forte® Fil	11.79**	42.08	50.70	65.57	84.59	101.53	102.18

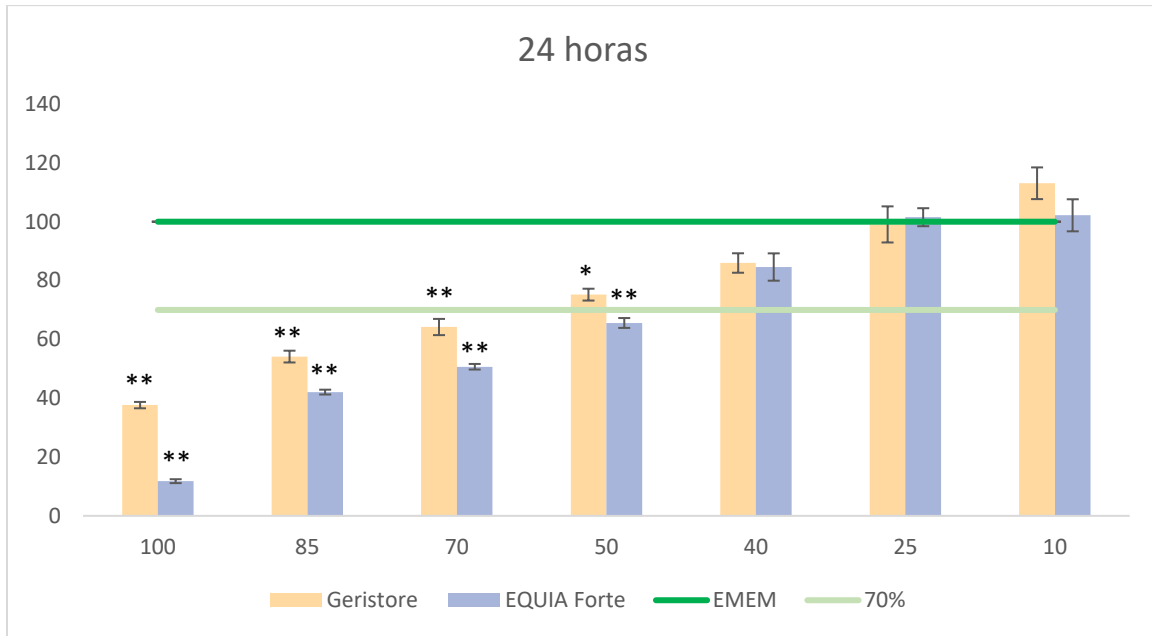


Figura 13. Porcentaje de viabilidad celular de los fibroblastos L929 después de la exposición a las diluciones del medio condicionado de Geristore® y EQUIA Forte® Fil a las 24 horas, analizados con sulforrodamina B. Las barras indican el promedio de dos experimentos por triplicado \pm SE. Las barras amarillas indican medio condicionado de Geristore®, las barras azules indican medio condicionado de EQUIA Forte® Fil® y la línea verde oscura indica el valor de medio de cultivo EMEM a las 24h, que es tomado como el 100% de viabilidad celular. La línea verde claro indica el 70% de viabilidad celular, las barras debajo de este indican un efecto citotóxico. * $p < 0.05$ ** $p < 0.0001$ cuando se comparan los medios condicionados con el grupo control negativo (EMEM)

Tabla 7. Porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos L929 después de la exposición a las diluciones de los medios condicionados de los cementos Geristore® y EQUIA Forte® Fil a las 48 horas. * $p < 0.05$ ** $p < 0.0001$. en comparación con la viabilidad de fibroblastos con Geristore®

48 horas	100%	85%	70%	50%	40%	25%	10%
Geristore®	36.02	54.50	61.00	73.46	76.11	86.12	101.09
EQUIA Forte® Fil	14.11*	26.65**	34.74*	48.73*	62.62	79.21	108.95

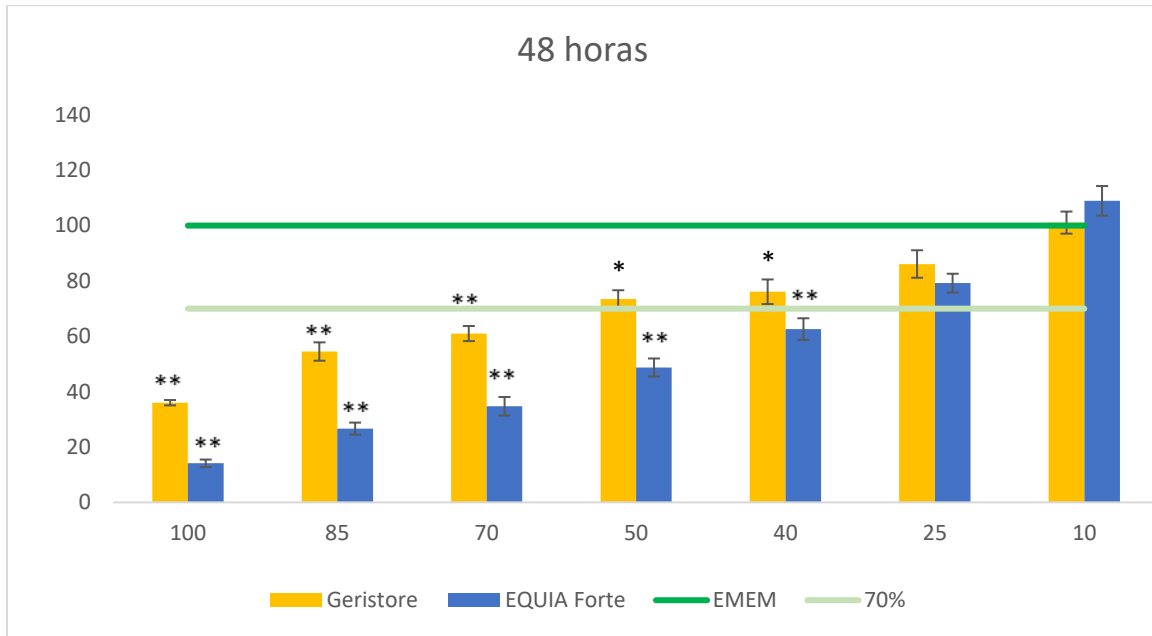


Figura 14. Porcentaje de viabilidad celular de los fibroblastos L929 después de la exposición a las diluciones del medio condicionado de Geristore® y EQUIA Forte® Fil a las 48 horas, analizados con sulforrodamina B. Las barras indican el promedio de dos experimentos por triplicado \pm SE. Las barras amarillas indican medio condicionado de Geristore®, las barras azules indican medio condicionado de EQUIA Forte® Fil y la línea verde oscura indica el valor de medio de cultivo EMEM a las 48h, que es tomado como el 100% de viabilidad celular. La línea verde claro indica el 70% de viabilidad celular, las barras debajo de este indicaron un efecto citotóxico. * $p < 0.05$ ** $p < 0.0001$ cuando se comparan los medios condicionados con el grupo control negativo (EMEM)

Tabla 8. Porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos L929 después de la exposición a las diluciones de los medios condicionados de los cementos Geristore® y EQUIA Forte® Fil a las 72 horas. ** $p < 0.0001$ en comparación con la viabilidad de fibroblastos con Geristore®.

72h	100%	85%	70%	50%	40%	25%	10%
Geristore®	45.61	5.51	70.47	73.56	82.61	95.29	98.53
EQUIA Forte® Fil	8.98**	20.55**	29.62**	38.67**	45.11**	64.95**	89.66

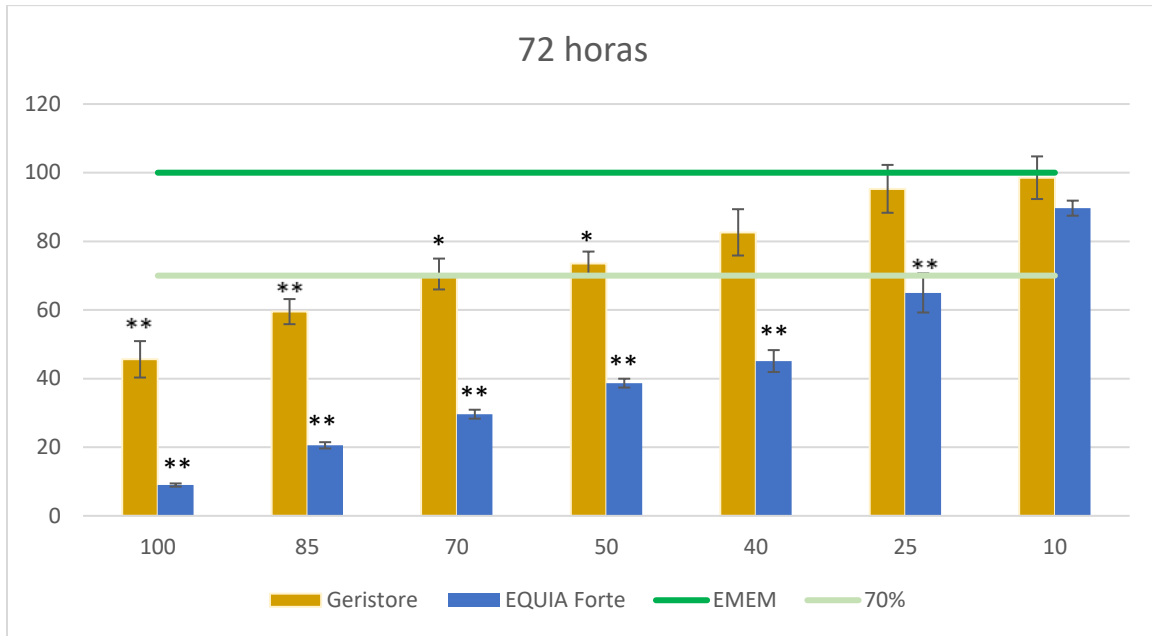


Figura 15. Porcentaje de viabilidad celular de los fibroblastos L929 después de la exposición a las diluciones del medio condicionado de Geristore® y EQUIA Forte® Fil a las 72 horas, analizados con sulforrodamina B. Las barras indican el promedio de dos experimentos por triplicado \pm SE. Las barras amarillas indican medio condicionado de Geristore®, las barras azules indican medio condicionado de EQUIA Forte® Fil y la línea verde oscura indica el valor de medio de cultivo EMEM a las 72h, que es tomado como el 100% de viabilidad celular. La línea verde claro indica el 70% de viabilidad, las barras debajo de este indican un efecto citotóxico. * $p < 0.05$ ** $p < 0.0001$ cuando se comparan los medios condicionados con el grupo control negativo (EMEM).

DISCUSIÓN

En el presente estudio in vitro se evaluó la citotoxicidad de los cementos de ionómero de vidrio Geristore® y EQUIA Forte® Fil sobre la línea celular L929 en tres diferentes tiempos 24, 48 y 72 h utilizando dos parámetros, la morfología y la viabilidad celular.

El ensayo sulforrodamina B es un método sensible y rápido para evaluación de citotoxicidad en cultivos celulares que fue elegido con base en la norma ISO 10993-5:2009. La sulforrodamina B aumenta su afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas en condiciones ácidas por lo que proporciona un índice del contenido de la proteína celular. El colorante unido a las células viables se extrae con solución de Tris Base lo que permite leer su absorbancia. Por lo que, los datos obtenidos fueron interpretados de la siguiente forma. A mayor tinción mayor porcentaje de viabilidad celular, esto al ser sulforrodamina B preciso y lineal en la estimación de poblaciones celulares. (37)

Con base en la norma ISO 10993-12:2012 se deben preparar eluciones 1:6 de los materiales que se presenten en estado sólido y de forma irregular. De los medios condicionados de los cementos ionómero de vidrio se obtuvo lixiviado, es decir el medio de cultivo arrastró gran cantidad de los compuestos presentes en el sólido que atravesó (los cementos), lo que permitió la evaluación de su citotoxicidad. Los medios condicionados se obtuvieron a las 24, 48 y 72 h sin embargo si pensamos en el sellado de un diente con un defecto radicular, los materiales estarán en contacto con los tejidos periarradiculares mayor tiempo, por lo que sería adecuado complementar los resultados de viabilidad tomando periodos de tiempos mayores a las 72 h.

Los fibroblastos al ser expuestos a las siete diferentes diluciones de Geristore®, disminuyeron su viabilidad celular manera dosis-dependiente. En un estudio de citotoxicidad de Geristore® se utilizó ensayos con MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium], una sal bio-reducida por las células a un producto llamado formazán que es soluble en el medio de cultivo celular y tiene una coloración que puede medirse por espectrofotometría UV a 490nm. Los medios condicionados que evaluaron fueron concentrados (100%) y diluidos a la mitad (50%) a las 24 h, 1, 2 y 3 semanas. A las 24h, la viabilidad de los fibroblastos expuestos a Geristore® al 100% no tuvo diferencia con los fibroblastos L929 no expuestos más que al medio de cultivo ($p=0.1$). En contraposición, en nuestro estudio se obtuvo una viabilidad celular del 43.61% ($p<0.001$). Un dato interesante fue que cuando compararon la dilución al 50% hallaron una menor viabilidad celular de 76% ($p<0.0045$), similar a la que nosotros encontramos del 73.56% ($p=0.006$). (18)

Los resultados obtenidos de la viabilidad celular de la línea celular L929 expuesta a los medios condicionados de Geristore® fue independiente al tiempo. Un estudio que evaluó la citotoxicidad de este cemento con MTT a los mismos tiempos (24,48 y 72 h) coincide con nuestros resultados, no hallaron diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad entre los tiempos de exposición. Sin embargo este trabajo se diferencia del nuestro ya que no encontraron diferencias significativas con el grupo control negativo (medio de cultivo) ($p=0.09$). (17) Por otro lado, en un estudio de citotoxicidad con MTT, no encontraron diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control negativo (medio de cultivo DMEM) con los fibroblastos expuestos a los medios condicionados durante 24 y 48 h. Lo que llama la atención es que a las 72h la diferencia con el medio de cultivo fue estadísticamente significativa, esto debido

a que hubo un aumento en la proliferación celular. (16) Finalmente, en un estudio más reciente también con MTT, hallaron que Geristore® a las 24 h fue estadísticamente mejor que el los fibroblastos incubados en el medio de cultivo y que a las 48h aumento la proliferación significativamente ($p < 0.005$). (19).

En los resultados obtenidos para EQUIA Forte® Fil, los fibroblastos al ser expuestos a las diferentes diluciones del medio condicionando tuvieron un efecto citotóxico en todas las diluciones estudiadas excepto en las concentraciones de 25 % y 10%. Se encontraron solamente dos estudios in vitro han evaluado la citotoxicidad de EQUIA Forte® Fil sobre Fibroblastos de la línea L929. Un primer estudio que evaluó la viabilidad celular con MTT. A las 24 h obtuvieron una viabilidad para EQUIA Forte® Fil de 122.33% y no existieron diferencias estadísticamente significativas con los tiempos de 48 y 72h.(24) En nuestro estudio la viabilidad obtenida al 100% para los tiempos de 24h, 48h y 72h fueron significativamente diferentes al grupo control ($p < 0.0001$) con bajos porcentajes de viabilidad celular de 11.79%, 14.11% y 8.98% respectivamente y obtuvimos que a diluciones del 85% al 25% la viabilidad celular obtenida a las 72h disminuyó significativamente cuando se la compara con la viabilidad a las 24 h ($p < 0.05$). Así mismo, un segundo estudio realizado con WTS-1 difiere del nuestro ya que obtuvieron niveles aceptables de biocompatibilidad para EQUIA Forte® Fil (95,73%) a las 72 h.(20) Probablemente estas diferencias en los resultados obtenidos en los diferentes estudios es debido a que la preparación de los medios condicionados fue a diferentes eluciones, lo que afecta a la concentración de compuestos lixiviados en el medio de cultivo y por lo tanto a la evaluación de la citotoxicidad.

No existen estudios que comparen la citotoxicidad de los cementos ionómero de vidrio Geristore® y EQUIA Forte® Fil sobre la línea celular L929. En este trabajo se evaluó la citotoxicidad de EQUIA Forte® Fil sobre fibroblastos debido a que dentro las indicaciones recomendadas por el fabricante están las restauraciones de la superficie de la raíz. Se decidió compararlo con Geristore® porque es este el cemento ionómero de vidrio el más utilizado y estudiado para el sellado de los defectos radiculares, sin embargo, no es comercializado en México. Los resultados obtenidos son contrastantes con otros estudios previos. Nosotros obtuvimos que son cementos citotóxicos. La citotoxicidad de EQUIA Forte® Fil fue significativamente mayor a Geristore®, por lo que sería adecuado complementar los resultados de viabilidad celular con otras técnicas o dado el caso mejorar la biocompatibilidad de estos materiales. Finalmente continuar en

la búsqueda de materiales alternativos con mejor biocompatibilidad al momento de tratar complicaciones de defectos radiculares.

CONCLUSIONES

- Geristore® presenta una citotoxicidad severa. Más del 70% de las células presentan una morfología redonda y en cultivo se observa más del 50% de inhibición del crecimiento celular.
- EQUIA Forte® Fil presenta una citotoxicidad severa. Existe una pérdida de más del 70% de las células y más del 50% de inhibición del crecimiento celular.
- Tanto EQUIA Forte® Fil como Geristore® reducen significativamente la viabilidad celular de los fibroblastos L929 más de un 70% concentrados, por tanto, tienen un efecto citotóxico.
- EQUIA Forte® Fil es más citotóxico que Geristore®

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la M.C Isabel Gracia Mora y al M.C Francisco Sánchez Bartéz, por su apoyo para la realización de este trabajo. El proyecto se realizó con el apoyo de la Unidad de Investigación Preclínica (UNIPREC). Los cementos de ionómero de vidrio fueron provistos por la alumna Andrea Verónica Perez Sanjines

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Glickman GN, Koch KA. 21st-century endodontics. *J Am Dent Assoc.* 2000;131 Suppl:39s-46s.
2. Soares IJ, Goldberg F. Endodoncia Técnica y fundamentos. Buenos Aires: Panamericana; 2002.
3. Alkan A, Keskiner I, Yuzbasioglu E. Connective tissue grafting on resin ionomer in localized gingival recession. *J Periodontol.* 2006;77(8):1446-51.
4. Scherer W, Dragoo MR. New subgingival restorative procedures with Geristore resin ionomer. *Pract Periodontics Aesthet Dent.* 1995;7(1 Suppl):1-4.
5. Nathani TI, Carreño Muriel MA, Morente Cabezas M, Jose. N, Duran-Sindreu Terol FS, Abella Sans F. Multidisciplinary management of an external cervical resorption and cemental tear. *Giornale Italiano Di Endodonzia.* 2021;35:6.
6. Alhadainy HA. Root perforations. A review of literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994;78(3):368-74.
7. Amid R, Torshabi M, Tabari k, Kadkhodazadeh M, Eslami S, Grazizadeh Ahsaie M. Assessment of Gingival Fibroblast Attachment to Root Surfaces Restored with Three Different Dental Materials: An in Vitro Study. *J Periodontol Implant Dent* 2016;8:9.
8. Camp MA, Jeansonne BG, Lallier T. Adhesion of human fibroblasts to root-end-filling materials. *J Endod.* 2003;29(9):602-7.

9. Al-Hiyasat AS, Al-Sa'Eed OR, Darmani H. Quality of cellular attachment to various root-end filling materials. *J Appl Oral Sci.* 2012;20(1):82-8.
10. Hakki SS, Bozkurt SB, Ozcopur B, Purali N, Belli S. Periodontal ligament fibroblast response to root perforations restored with different materials: a laboratory study. *Int Endod J.* 2012;45(3):240-8.
11. Dazey S, Senia ES. An in vitro comparison of the sealing ability of materials placed in lateral root perforations. *J Endod.* 1990;16(1):19-23.
12. Al-Sabek F, Shostad S, Kirkwood KL. Preferential attachment of human gingival fibroblasts to the resin ionomer Geristore. *J Endod.* 2005;31(3):205-8.
13. Dragoo MR. Resin-ionomer and hybrid-ionomer cements: Part I. Comparison of three materials for the treatment of subgingival root lesions. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1996;16(6):594-601.
14. Behnia A, Strassler HE, Campbell R. Repairing iatrogenic root perforations. *J Am Dent Assoc.* 2000;131(2):196-201.
15. Breault LG, Fowler EB, Primack PD. Endodontic perforation repair with resin-ionomer: a case report. *J Contemp Dent Pract.* 2000;1(4):48-59.
16. Al-Sa'eed OR, Al-Hiyasat AS, Darmani H. The effects of six root-end filling materials and their leachable components on cell viability. *J Endod.* 2008;34(11):1410-4.
17. Pourabbas R, Faranjnia S, Kimya S, Mohammandnejad L, Johnson A, Nejatian T. *In vitro* assessment of cytotoxicity of giomer on human gingival fibroblasts. *Afr J Biotechnol.* 2009;8:5.
18. Modareszadeh MR, Chogle SA, Mickel AK, Jin G, Kowsar H, Salamat N, et al. Cytotoxicity of set polymer nanocomposite resin root-end filling materials. *Int Endod J.* 2011;44(2):154-61.
19. Gupta SK, Saxena P, Pant VA, Pant AB. Adhesion and biologic behavior of human periodontal fibroblast cells to resin ionomer Geristore: a comparative analysis. *Dent Traumatol.* 2013;29(5):389-93.
20. Campos F, Aníbal-Rodríguez M, Durand-Herrera D, Sakalian C, Uribe-Echeverría J, Rodríguez IA. Analysis of the biocompatibility of high viscosity glass ionomer cements 2017 [5].
21. GC. EQUIA Forte Tokio, Japan: GC; 2015 [Available from: <http://gclatinamerica.com/descripcion/equia-forte>].
22. Ilisulu SC, Oztop NE, Akkoc T, Seymen F. In vitro evaluation of pediatric restorative materials on human dental pulp stem cells. *Tissue Cell.* 2022;77:101871.
23. Collado-González M, Pecci-Lloret MR, Tomás-Catalá CJ, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Llena C, et al. Thermo-setting glass ionomer cements promote variable biological responses of human dental pulp stem cells. *Dent Mater.* 2018;34(6):932-43.
24. Ersahan S, Oktay EA, Sabuncuoglu FA, Karaoglanoglu S, Aydın N, Suloglu AK. Evaluation of the cytotoxicity of contemporary glass-ionomer cements on mouse fibroblasts and human dental pulp cells. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2020;21(3):321-8.
25. Capan BS, Duman C, Ordueri NE, Elgun T. In Vitro Examination of The Cytotoxicity of Alkasite Restorative Material on Dental Pulp Stem Cells. *Research Square*; 2022.
26. Pecci Lloret MR. Citocompatibilidad de dos nuevos cementos de Ionómero de vidrio (GICS) en células madre de pulpa dental. España: Universidad de Murcia; 2018.
27. Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J.* 2003;36(2):75-85.

28. Evaluación Biológica de los productos sanitarios Parte5: Ensayos de citotoxicidad in vitro, ISO 10993-5:2009 (2009A).
29. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*. 2006;1(3):1112-6.
30. De Bruyne MA, De Moor RJ. The use of glass ionomer cements in both conventional and surgical endodontics. *Int Endod J*. 2004;37(2):91-104.
31. Pitt Ford TR. The leakage of root fillings using glass ionomer cement and other materials. *Br Dent J*. 1979;146(9):273-8.
32. Mohammadi Z, Shalavi S. Clinical applications of glass ionomers in endodontics: a review. *Int Dent J*. 2012;62(5):244-50.
33. Attam K, Tiwary R, Talwar S, Lamba AK. Palatogingival Groove: Endodontic-Periodontal Management—Case Report. *Journal of Endodontics*. 2010;36(10):1717-20.
34. Sooratgar A, Tabrizzade M, Nourelahi M, Asadi Y, Sooratgar H. Management of an Endodontic-Periodontal Lesion in a Maxillary Lateral Incisor with Palatal Radicular Groove: A Case Report. *Iran Endod J*. 2016;11(2):142-5.
35. Francois P, Fouquet V, Attal JP, Dursun E. Commercially Available Fluoride-Releasing Restorative Materials: A Review and a Proposal for Classification. *Materials (Basel)*. 2020;13(10).
36. Cosgun A, Bolgul B, Duran N. In vitro investigation of antimicrobial effects, nanohardness, and cytotoxicity of different glass ionomer restorative materials in dentistry. *Niger J Clin Pract*. 2019;22(3):422-31.
37. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*. 1990;82(13):1107-12.