



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA RESTAURADORA  
ÁREA OPERATORIA

**“INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS TIPO-OSTEOBLASTO SAOS-2  
EXPUESTAS A ADHESIVOS DENTALES UNIVERSALES”**

**Angélica María Araya Araya**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO  
DE**

**CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Eduardo Fernández Godoy, PhD**

**TUTOR ASOCIADO**

**Prof. Sonja Buvinic Radic, PhD.**

**ASESOR**

**Dr. Felipe Gutiérrez Reyes**

**Adscrito a Proyectos FONDECYT Regular 1170575 (EF)**

**FONDECYT Regular 1151353 (SB)**

**Santiago-Chile**

**2019**





**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA RESTAURADORA  
ÁREA OPERATORIA

**“INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS TIPO-OSTEOBLASTO SAOS-2  
EXPUESTAS A ADHESIVOS DENTALES UNIVERSALES”**

**Angélica María Araya Araya**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO  
DE**

**CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Eduardo Fernández Godoy, PhD**

**TUTOR ASOCIADO**

**Prof. Sonja Buvinic Radic, PhD.**

**ASESOR**

**Dr. Felipe Gutiérrez Reyes**

**Adscrito a Proyectos FONDECYT Regular 1170575 (EF)**

**FONDECYT Regular 1151353 (SB)**

**Santiago-Chile**

**2019**

## **AGRADECIMIENTOS**

*A las mujeres más importantes en mi vida: mi Madre, Mamamaria y Gile, gracias por el apoyo incondicional, el amor y cariño que me mantienen en pie y feliz. Soy la más afortunada al tenerlas.*

*A mi Cristian por su amor y su compañía, por su manera particular de hacerme feliz en los momentos difíciles.*

*A mis amigas y amigos de Odonto: Felipe, Yova, Naty, Cota, Javis, Sheyla, Pame, Gustavo; por su apoyo en los momentos de estrés, por las risas y momentos felices, sin ustedes no habría sido lo mismo. A mi amiga Belén la cual fue importante en el desarrollo de este trabajo, quien me acompañaba, comprendía y alentaba en los momentos de frustración. A mi María Paz, quien siempre brillaba y con su alegría hizo de estos días de universidad más felices, gracias por tu apoyo, consejos y cariño, sos grande.*

*A mi Miti por darme compañía y cariño a su manera.*

*A Nadia por su buena disposición y extrema paciencia para enseñarme cada técnica, cada paso, tips, etc; muchas gracias por el apoyo para la realización de este trabajo.*

*A la Dra. Sonja Buvinic, por la preocupación constante y paciencia que tiene por cada uno de los tesisistas. Definitivamente una de los mejores docentes que conocí en la universidad. Gracias infinitas por guiarme en esta última etapa de mi carrera. Personas como Ud. hacen de la universidad una institución de excelencia.*

*Al Dr. Eduardo Fernández por recibirme como tesisista en su proyecto y confiar en mí para la realización de este trabajo.*

*A mis pacientes por no fallarme, por la paciencia y comprensión de mis errores en este proceso de aprendizaje.*

*A los funcionarios, botiquineras, al Pato, a la Consu, Sisi, y a todos los que hacen posible que la clínica funcione.*

*A mi Alma mater: Universidad de Chile, simplemente la mejor.*

*Gracias*

## INDICE DE CONTENIDOS

1. LISTA DE ABREVIATURAS _____	7
2. RESUMEN _____	8
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA _____	9
4. MARCO TEÓRICO _____	10
4.1 Mecanismos de muerte celular: Generalidades _____	10
4.2 Mecanismos celulares y moleculares de la apoptosis _____	11
4.3 Sistemas adhesivos dentales _____	13
4.4 Sistemas adhesivos dentales y citotoxicidad _____	15
4.5 Sistemas adhesivos y Apoptosis _____	16
5. HIPÓTESIS _____	18
6. OBJETIVO GENERAL _____	18
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS _____	18
8. METODOLOGÍA _____	19
8.1 Tipo de estudio _____	19
8.2. Materiales y métodos _____	19
9. RESULTADOS _____	26
10. DISCUSION _____	31
11. CONCLUSIONES _____	37
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	38

## **INDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Representación esquemática de vías de señalización celular extrínseca e intrínseca.....	12
Figura 2. Efecto citotóxico de CCCP en células Saos-2; curva concentración- respuesta.....	21
Figura 3. Diagrama de citometría de flujo.....	22
Figura 4. Inducción de apoptosis y necrosis en células Saos-2 por adhesivos universales.....	27
Figura 5. Detección relativa de Caspasa 3 escindida en células Saos-2 tratadas con CCCP y tres adhesivos universales.....	28
Figura 6: Núcleos celulares de células Saos-2 cultivadas con diferentes adhesivos universales a 2, 4 y 6 h .....	29
Figura 7. Viabilidad celular de células Saos-2 cultivadas con tres adhesivos universales y con el inhibidor de apoptosis Z-VAD-FMK.....	30

## **INDICE DE TABLAS**

Tabla 1: Adhesivos dentales universales.....	20
----------------------------------------------	----

## 1. LISTA DE ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido desoxiribonucleico

**AIF:** Factores inductores de apoptosis

**APC:** Aloficocianina

**AU:** Ambar Universal

**BisGMA:** Bisfenol glicidil metacrilato

**CCCP:** Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona

**DR4:** Receptor de muerte 4

**FADD:** Dominio de muerte asociado a Fas

**FasL:** Ligando de ácido graso sintetasa

**FasR:** Receptor de muerte de superficie celular Fas

**HEMA:** 2-Hidroxietilmetacrilato

**IAP:** Inhibidores de proteínas apoptóticas

**IP:** yoduro de propidio

**10-MDP:** 10-metacrililoiloxidecil dihidrogenio fosfato

**MPa:** Megapascales

**MTT:** Bromuro de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio

**PB:** Prime and Bond Universal

**PENTA:** Ester-fosfonato-penta-acrilato.

**PVDF:** Membrana de fluoruro de polivinilideno

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**SB:** Single Bond Universal

**TNF:** Factor de Necrosis tumoral

**TRADD:** Dominio de muerte asociado a receptor TNF

**TRAIL:** Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF

**TEGMA:** Dimetacrilato de trietilenglicol

**UDMA:** Dimetacrilato de uretano

**Z-VAD-FMK:** Fluorometil cetona N-benciloxycarbonil-Val-Ala-Asp

## 2. RESUMEN

Se distinguen clásicamente dos tipos de muerte celular, desde una perspectiva morfológica, biológica y biomolecular: apoptosis y necrosis. La apoptosis se puede definir como un proceso coordinado, dependiente de energía, que involucra la activación de un grupo de proteasas denominadas caspasas y una compleja cascada de eventos que unen el estímulo inicial con la desaparición definitiva de la célula. Por otro lado, la necrosis es un proceso desordenado e independiente de energía, que presenta cambios irreversibles en el núcleo celular (cariólisis) y pérdida de la estructura citoplasmática.

Se ha descrito que los adhesivos dentales generan citotoxicidad y que ésta se atribuiría a monómeros residuales no incorporados en la red de polímero que podrían difundir a través de los túbulos dentinarios y llegar al tejido pulpar causando daño y activando vías directamente relacionadas con el control de la muerte celular. Si bien, el tipo de muerte que generan los adhesivos dentales ha sido muy estudiada en adhesivos de lavado y grabado y autograbantes, la información disponible en la literatura es escasa con respecto a la citocompatibilidad de los adhesivos universales, los cuales tienen en su matriz monómeros diferentes a los otros sistemas adhesivos.

Para comprender los mecanismos que generan citotoxicidad causado por adhesivos dentales universales se evaluaron tres sistemas adhesivos: Ambar Universal, Single Bond Universal y Prime and Bond Universal a una concentración de 0.1% v/v en la línea celular Saos-2. Se evaluaron tres marcadores de apoptosis después de 2-4-6 h de incubación con los adhesivos: detección de fosfatidilserina e yoduro de propidio mediante citometría de flujo, detección de caspasa 3 activada por inmunoblot y evaluación de la morfología nuclear mediante microscopía de fluorescencia. La citotoxicidad de los adhesivos se determinó después de 24 h de incubación por ensayo MTT, en ausencia o presencia del inhibidor de apoptosis Z-VAD-FMK. Se observó un mayor porcentaje de células en apoptosis temprana mediante citometría de flujo con el adhesivo Single Bond Universal, mientras que los adhesivos Ambar Universal y Prime and Bond Universal mostraron un aumento significativo de la muerte por necrosis. Solo el adhesivo Single Bond Universal



mostró un aumento significativo de caspasa 3 activada en comparación con el control. La evaluación de imágenes de inmunofluorescencia mostró núcleos celulares compatibles con apoptosis para el adhesivo Single Bond Universal, mientras que los adhesivos Ambar Universal y Prime and Bond Universal presentaron núcleos de tipo necrótico. La prueba de MTT indicó que los tres adhesivos redujeron significativamente la viabilidad celular: Single Bond Universal (47,9%), Ambar Universal y Prime and Bond Universal (0%); el inhibidor de apoptosis Z-VAD-PMK combinado con el adhesivo Single Bond Universal aumentó significativamente la viabilidad de un 47,9 % a 79,8%.

Conocer los mecanismos moleculares relacionados con la muerte celular inducida por adhesivos dentales abre paso a proponer futuras estrategias farmacológicas que contrarresten tales efectos nocivos.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los adhesivos dentales son materiales que se utilizan en la clínica odontológica con el objetivo de adherir materiales de obturación a las preparaciones cavitarias, y además lograr restauraciones de mayor duración, menor filtración marginal, mayor conservación del tejido sano, obliteración de la estructura tubular dentinaria y disminución de la sensibilidad post operatoria. Han sido utilizados a diario en la consulta dental y con los años numerosos fabricantes han simplificado los pasos en su aplicación y maximizado sus indicaciones. Una de las novedades más recientes ha sido la introducción de adhesivos universales en la práctica clínica. Estos nuevos productos se conocen como "multimodo" o adhesivos "multiuso" porque pueden ser utilizados como adhesivos autograbables, de grabado y lavado, o como adhesivos autograbables sobre dentina con grabado selectivo en esmalte. Esta diversidad de aplicaciones ha masificado su uso en la práctica dental. En estos nuevos sistemas universales se han agregado nuevos componentes que proporcionan estas indicaciones y aplicaciones más amplias, pero la información disponible en la literatura es escasa con respecto a su

citocompatibilidad. Además un parámetro importante que se debe considerar es que los pocos estudios *in vitro* que existen en cuanto a citotoxicidad y mecanismos de muerte celular que generan los adhesivos universales se han realizado en líneas celulares que no derivan de tejidos humanos, lo cual no aproxima sus resultados a las condiciones clínicas. Para conocer mejor los mecanismos que generan citotoxicidad causado por este tipo de adhesivos, es fundamental determinar qué tipo de muerte producen y por ello, esta tesis se enfocó en la evaluación de marcadores de apoptosis en la línea celular de osteosarcoma Saos-2 de origen humano, ya que los osteoblastos se encuentran en los tejidos periapicales y representa un buen modelo para la evaluación de mecanismos de muerte celular.

## **4. MARCO TEÓRICO**

### **4.1 Mecanismos de muerte celular: Generalidades**

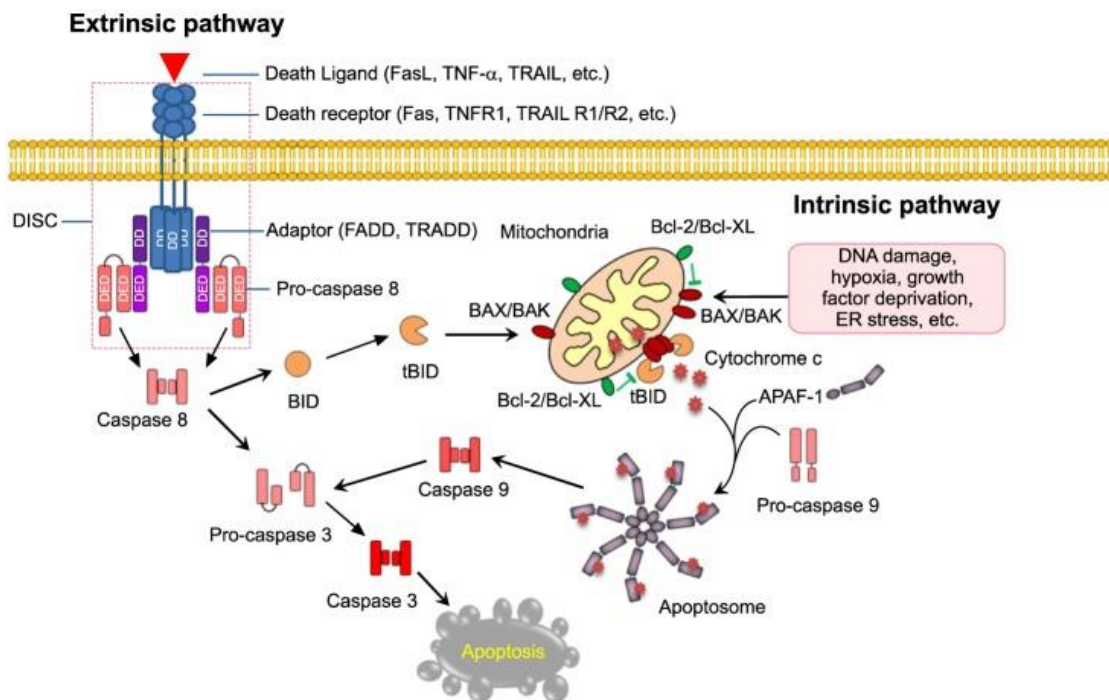
Se distinguen clásicamente dos tipos de muerte celular, desde una perspectiva morfológica, biológica y biomolecular: apoptosis y necrosis. La apoptosis se puede definir como un proceso coordinado, dependiente de energía, que involucra la activación de un grupo de proteasas denominadas caspasas y una compleja cascada de eventos que unen el estímulo inicial con la desaparición definitiva de la célula (Elmore, 2007). La apoptosis, como un proceso activo, se estimula por señales de desarrollo o factores ambientales; se caracteriza por cambios en la morfología celular que incluyen condensación de cromatina, fragmentación nuclear, redondeo y contracción celular, y formación de cuerpos apoptóticos. (Elkholany y cols., 2012). Se ha reportado que el tiempo que le toma a una célula en llevar a cabo este proceso depende del tipo celular y las características de activación, pero en promedio es de 2 a 3 horas (Elmore, 2007).

El segundo tipo de muerte celular es la necrosis, un proceso desordenado e independiente de energía, que presenta cambios irreversibles en el núcleo celular (cariólisis) y pérdida de la estructura citoplasmática. Además hay una clara disfunción en las mitocondrias y aumento en el volumen celular, desencadenando citólisis y liberando el material citoplasmático hacia el exterior de la célula. Por este motivo, la necrosis generalmente induce fenotipos inflamatorios y mucho daño circundante en los tejidos afectados (Martínez, 2009).

La muerte celular inducida por apoptosis o necrosis en un determinado tipo celular se puede caracterizar de acuerdo a cambios celulares en su estructura (fragmentación nuclear, contracción celular, etc.), o por aumento de los niveles o activación de marcadores moleculares específicos.

#### **4.2 Mecanismos celulares y moleculares de la apoptosis.**

Se describen dos tipos principales de vía de iniciación apoptótica: extrínseca e intrínseca (Figura 1). Elmore (2007) reporta adicionalmente la vía mediada por el sistema Perforina / Granzima, que se presenta en linfocitos T citotóxicos. La vía de señalización extrínseca que inicia apoptosis se denominó así ya que involucra interacciones mediadas por receptores transmembrana; se ha descrito que esta vía es iniciada por unión de: 1) TNF (Factor de Necrosis tumoral) a TNF receptor; 2) el TRAIL (en inglés: TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) a los receptores DR4 (en inglés: Death Receptor-4) y DR5 o 3) FasL (en inglés: Fatty acid synthetase Ligand) al receptor FasR. Estas asociaciones reclutan moléculas adaptadoras como FADD (del inglés: Fas-Associated Death Domain) o TRADD (del inglés: TNF Receptor-Associated Death Domain), las cuales activan caspasas iniciadoras 8 y 10 y finalmente se da la activación de caspasas ejecutoras 3, 6 y 7, culminando en un fenotipo celular apoptótico (Martínez, 2009).



**Figura 1. Representación esquemática de vías de señalización celular extrínseca e intrínseca (Sarvothaman y cols., 2015).**

En la cascada de señalización intrínseca se ha reportado una serie de estímulos intracelulares, específicamente en la mitocondria, que causan cambios estructurales en la membrana mitocondrial, por apertura de poros de transición y alteración del potencial transmembrana, lo que conlleva a una liberación hacia el citosol de sustancias pro-apoptóticas que en estado normal permanecen dentro del espacio intermembranal (Elmore, 2007). Estos componentes liberados corresponden a citocromo *c*, proteínas Smac/Diablo y HtrA2/Omi. La liberación de citocromo *c* activa la proteína Apaf-1 y la procaspasa-9, estableciendo un complejo proteico denominado “apoptosoma”, que activa la caspasa-3, iniciando la vía efectora de apoptosis. Las proteínas Smac/Diablo y HtrA2/Omi promueven apoptosis por inhibición de IAP (inhibidores de proteínas apoptóticas) como cIAP1, cIAP2 y XIAP. También se liberarían desde la mitocondria factores inductores de apoptosis (AIF), endonucleasa G y DNasa activada por caspasas (CAD). Estos últimos se liberan hacia el citosol, entran en el núcleo y fragmentan el ADN (Elmore, 2007). La degradación de ADN por endonucleasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  generan fragmentos de 180 a 200 pares de bases; este patrón de fragmentos es altamente específico, y es un factor muy claro que diferencia

operacionalmente este tipo de muerte celular programada con la necrosis, la cual no presenta patrón de degradación ni especificidad en los tamaños de los fragmentos (Elmore, 2007)

Las proteínas reguladoras de los cambios estructurales en la membrana mitocondrial son de la familia Bcl-2, cuya función puede ser apoptótica o anti-apoptótica, quienes a su vez son controladas por la proteína supresora de tumores p53. Las proteínas anti-apoptóticas incluyen Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG. Algunas de las proteínas pro-apoptóticas incluyen Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, y Blk. Estas proteínas pueden ser detectadas como un referente de gran confianza de la activación del proceso apoptótico (Elmore, 2007).

La translocación de fosfatidilserina desde la cara interna a la cara externa de la membrana plasmática es característica en células apoptóticas. Esto permite el reconocimiento de estos cuerpos apoptóticos por células fagocíticas que secretan citoquinas e inhiben la inflamación. Este fenómeno es un biomarcador efectivo para la detección de una célula apoptótica (Martínez, 2009).

### **4.3 Sistemas adhesivos dentales**

Los sistemas adhesivos dentales son materiales que se utilizan en la clínica odontológica con el objetivo de lograr restauraciones de mayor duración, menor filtración marginal, mayor conservación del tejido sano, obliteración de la estructura tubular dentinaria y disminución de la sensibilidad postoperatoria (Mantelline y cols., 2003).

El desarrollo de los sistemas adhesivos ha generado sucesivamente varias generaciones de ellos con el objetivo de ir superando sus distintas limitaciones. La primera generación de adhesivos no poseía adhesión química a la dentina y su fuerza de unión era muy baja (1-3 megapascales, MPa), dando muy pobres resultados clínicos (Sofan y cols., 2017). Los sistemas adhesivos dentales pertenecientes a la segunda generación llegaron a alcanzar los 4-5 MPa. Aparecen posteriormente los sistemas adhesivos dentales de tercera generación los cuales destacan por la incorporación de monómeros hidrófilos, principalmente el 2-Hidroxietilmetacrilato (HEMA); esto permitió mejorar los niveles de adhesión

hasta llegar a los 10 MPa. Los sistemas adhesivos de cuarta generación aparecen en 1990 con la incorporación novedosa de una sustancia promotora de la adhesión llamada "primers". Los materiales de cuarta generación fueron los primeros en lograr la eliminación completa de la capa residual o barro dentinario (*smear layer*), y todavía se les considera como la técnica de referencia (*gold standard*) en adhesivos. La resistencia de enlace para estos adhesivos es del rango de 20 MPa (Sofan y cols., 2017). A mediados de los noventa, se incorpora la idea del grabado total y aparecen los adhesivos de quinta generación que conllevan el acondicionamiento ácido no sólo de esmalte sino también de la dentina llegando a lograr una adhesión del orden de los 25- 30 MPa. Con posterioridad se han desarrollado sistemas adhesivos dentales de sexta y séptima generación que tienden a simplificar su instrumentación (Sofan y cols., 2017).

Otro método de clasificación de los sistemas adhesivos actuales es según la estrategia de unión, encontrando adhesivos de grabado y lavado, y adhesivos de autograbado (Van Meerbeek y cols., 2003). Los adhesivos de autograbado son clasificados basados en el número de pasos de su aplicación clínica en: adhesivos de un paso o de dos pasos (Giannini y cols., 2015).

Una de las novedades más recientes fue la introducción de adhesivos universales, que se han utilizado desde 2011 en la práctica clínica. Estos nuevos productos se conocen como "multimodo" o "multiuso" porque pueden ser utilizados como adhesivos autograbables, de grabado y lavado, o como adhesivos autograbables sobre dentina y de grabado-lavado sobre esmalte, técnica comúnmente referida como "grabado selectivo del esmalte" (Perdigão y Swift 2015).

La formulación química de los sistemas adhesivos generalmente comprende monómeros con grupos hidrofílicos e hidrofóbicos tales como: bisfenol glicidil metacrilato (BisGMA), hidroxietilmetacrilato (HEMA), dimetacrilato de trietilenglicol (TEGDMA) o dimetacrilato de uretano (UDMA), además de iniciadores, estabilizantes, solventes y rellenos inorgánicos. A pesar de las similitudes entre adhesivos, la composición de un adhesivo universal difiere de otros sistemas por la incorporación de monómeros de fosfato que se unen iónicamente al calcio encontrado en la hidroxiapatita. Por ejemplo, el 10-metacrilatoiloxidecil fosfato

dihidrogenado (10-MDP) es un monómero hidrofílico con propiedades de grabado suave que permite utilizar un adhesivo universal con cualquier técnica de grabado, Además, algunos adhesivos universales pueden contener silano en su formulación, para eliminar la silanización cuando se utiliza con coronas cerámicas (Sofan y cols., 2017).

#### **4.4 Sistemas adhesivos dentales y citotoxicidad**

Muchos de los materiales dentales usados a diario en la consulta dental pueden generar citotoxicidad, tales como: resinas adhesivas, aleaciones metálicas, entre otros. Por ejemplo, se han evaluado 4 aleaciones metálicas en la línea celular L929, encontrando que 3 de los materiales metálicos investigados mostraron propiedades citotóxicas (Pan y cols., 2017).

A pesar de todas las ventajas que han proporcionado los adhesivos dentales, diversos autores han demostrado que sus componentes pueden ser citotóxicos. La citotoxicidad de los adhesivos dentales se atribuye a componentes de su formulación, que corresponden a monómeros residuales no incorporados en la red de polímero que podrían difundir a través de los túbulos dentinarios y llegar al tejido pulpar causando daño. Se ha evaluado la citotoxicidad de constituyentes de adhesivos dentales en fibroblastos de ratones después de 24 y 72 h de exposición, obteniendo el siguiente ranking de toxicidad: Bis-GMA> UDMA> TEGDMA> HEMA (Ratanasathien y cols., 1995). Este resultado de clasificación citotóxica de monómeros dentales también se ha registrado en líneas celulares humanas tipo osteoblastos: MG-63, Saos-2 y hFOBs (Kraus y cols., 2017). El monómero BisGMA disminuye la viabilidad celular, de manera dosis y tiempo dependiente en cultivos de fibroblastos humanos (Cohn y cols., 2005). Concentraciones mínimamente tóxicas de 10-MDP promueven una respuesta inflamatoria y suprimen la diferenciación odontoblástica de células pulpares dentales humanas (Kim y cols., 2015). También se ha evaluado la citotoxicidad de diversos sistemas de adhesivos en la línea celular de fibroblastos de ratón L929, encontrando que todos presentan toxicidad pero en distinto grado, atribuyéndolo a

los diferentes tipos de monómeros que presentan (Cortés y cols., 2017; Gурpinar y cols., 2006). En sistemas de grabado y lavado, autograbantes y universales, se ha demostrado que reducen significativamente el metabolismo celular de la línea celular de fibroblastos de ratón L929, independientemente del tiempo de polimerización, el período de almacenamiento y el sistema adhesivo (Elías y cols., 2015.). En otro trabajo, se evaluaron diversos sistemas adhesivos (grabado y lavado, autograbante y universal), encontrando que todos reducen la viabilidad celular en la línea celular de fibroblastos 3T3 y que los adhesivos universales no presentan una mayor citotoxicidad comparado con los otros sistemas (Pupo y cols., 2017).

Recientemente se demostró que dos adhesivos universales: Ambar Universal y Prime and Bond Universal, evaluados a distintas concentraciones (1, 0.1 y 0.01 % v/v) durante 24 h, presentan citotoxicidad en células tipo-osteoblasto Saos-2 obteniendo viabilidades menores al 40% con la concentración 0.1 v/v y cercanas a 0% con la concentración 1 v/v (Gutiérrez y cols., 2019).

La muerte celular causada por los sistemas adhesivos estaría directamente relacionada con el tipo y la cantidad de monómero liberado. Los monómeros residuales libres son capaces de cambiar el microambiente celular por estrés oxidativo, ya que son capaces de inducir la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y reducir la cantidad de antioxidantes como el glutatión, que conduce a un desequilibrio oxidativo; por lo tanto, un aumento en los niveles de ROS actuaría como una señal para la activación de vías directamente relacionadas con el control de la muerte celular (Elías y cols., 2015).

#### **4.5 Sistemas adhesivos y Apoptosis**

En numerosos estudios se ha descrito que los monómeros ejercen citotoxicidad a través de una vía principal: la apoptosis. El monómero HEMA genera estrés oxidativo al aumentar la formación de ROS, daño a nivel del ADN y finalmente muerte vía apoptosis (Gallorini y cols., 2014). La apoptosis inducida por monómeros es una respuesta celular a niveles de ROS que exceden la capacidad



de las células para mantener la homeostasis redox y compuestos como el TEGDMA y HEMA son citotóxicos (vía apoptosis), inducen efectos genotóxicos y retrasan el ciclo celular (Krifka y cols., 2012). Tres tipos de adhesivos dentales de autograbado generan distintas tasas de apoptosis en una línea celular de odontoblastos de ratón (El-kholany y cols., 2012). En un trabajo realizado con células pulpares de ratón, se concluyó que el adhesivo utilizado induce apoptosis y no necrosis; y la mayoría de las células que no eran apoptóticas presentaron detención del ciclo celular (Mantelline y cols., 2003). Se han evaluado los efectos citotóxicos de adhesivos de autograbado de un solo paso, encontrando que todos los adhesivos reducen la viabilidad en cultivos de odontoblastos de ratón, preferentemente por apoptosis (Lee y cols., 2016).

Para conocer mejor los mecanismos que generan citotoxicidad causado por los adhesivos universales es fundamental determinar qué tipo de muerte producen. Se sabe que el tipo y cantidad de monómeros que poseen en su composición está relacionado con la citotoxicidad, pero la información es escasa con respecto a adhesivos universales. En virtud de esto, el presente trabajo buscó evaluar 3 adhesivos universales que comparten en su formulación el compuesto 10-MDP, pero difieren en los otros monómeros que los componen. Los adhesivos elegidos fueron: Ambar Universal (FGM), el cual contiene 10-MDP, UDMA, HEMA; Single Bond Universal (3M ESPE) posee 10-MDP, HEMA, Bis-GMA y Prime and Bond Universal (Dentsply Sirona) tiene 10-MDP y PENTA. Se evaluaron diferentes marcadores de apoptosis buscando conocer los mecanismos relacionados con la muerte celular inducida por estos adhesivos.

## **5. HIPÓTESIS.**

Los adhesivos dentales universales Ambar Universal, Single Bond Universal y Prime and Bond Universal promueven muerte celular de células Saos-2 vía apoptosis.

## **6. OBJETIVO GENERAL.**

Determinar si los adhesivos dentales universales Ambar Universal, Single Bond Universal y Prime and Bond Universal inducen la muerte de células Saos-2 por apoptosis.

## **7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

*7.1.- Determinar si los adhesivos dentales universales Ambar Universal, Single Bond Universal y Prime and Bond Universal inducen marcadores de apoptosis en células Saos-2.*

Actividades:

- Determinar la exposición de fosfatidilserina por citometría de flujo.
- Evaluar los niveles de Caspasa 3 activada por inmunoblot.
- Analizar la condensación de cromatina y fragmentación nuclear por microscopía de fluorescencia.

*7.2.-Determinar si la muerte de células Saos-2 inducida por adhesivos dentales universales Ambar Universal, Single Bond Universal y Prime and Bond Universal ocurre por apoptosis*

- Comparar la citotoxicidad de los adhesivos dentales universales (ensayos MTT) en células Saos-2 en presencia o ausencia del inhibidor farmacológico de apoptosis Z-VAD-FMK.

## 8. METODOLOGÍA.

### 8.1.- Tipo de estudio

Estudio experimental *in vitro*

### 8.2.- Materiales y métodos

#### a) Cultivo celular

La línea celular tipo-osteoblasto Saos-2 (ATCC® HTB-85™), se cultivó en el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany) suplementado con suero fetal bovino 10% (FBS; Thermo Fisher Scientific) y una solución de penicilina-estreptomicina al 1% (Thermo Fisher Scientific), a 37° C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> en 95% de aire. El medio se cambió cada 2-3 días. Después de alcanzar la confluencia, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS: NaCl 150 mM; KCL 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM; pH 7.2) y se separaron de los recipientes de cultivo mediante un breve tratamiento con tripsina al 0,05% durante 5 min (Gutiérrez y cols., 2019). Las células fueron contadas en cámara de Neubauer por exclusión de azul de tripán, y re-sembradas en el número adecuado para cada experimento.

#### b) Adhesivos

Se evaluaron 3 sistemas adhesivos universales: Ambar Universal (AU), Single Bond Universal (SB) y Prime and Bond Universal (PB) cuyas composición se muestra en la Tabla 1. Cada material testeado fue diluido en agua destilada autoclavada y luego agregado directamente al medio de cultivo celular llegando a una dilución final de 0.1 % v/v. Esta concentración ha demostrado ser citotóxica en la línea celular Saos-2 (Gutiérrez y cols., 2019).

Nombre comercial	Fabricante	Ingrediente Activo	Otros ingredientes
Ambar Universal	FGM	10-MDP, monómeros metacrilatos (UDMA, HEMA) fotoiniciadores, co-iniciadores, estabilizantes.	Relleno inorgánico (nanopartículas de sílica) y solvente (etanol).
Single Bond Universal	3M	10-MDP, HEMA, Bis-GMA, Decametileno dimetacrilato, 1,10-Decanodiol fosfato metacrilato, Copolímero de acrílico y ácido itacónico, Caforquinona, N-Dimetilbenzocaína	Relleno inorgánico (sílica tratada con silano), solvente (etanol), agua
Prime and Bond Universal	Dentsply Sirona	10-MDP, PENTA, Ácido fosfórico modificado con acrilato de resina, Acrilato multifuncionales, Acrilato bifuncionales, Acrilatos acídicos.	Isopropanol Agua, Iniciadores, Estabilizante

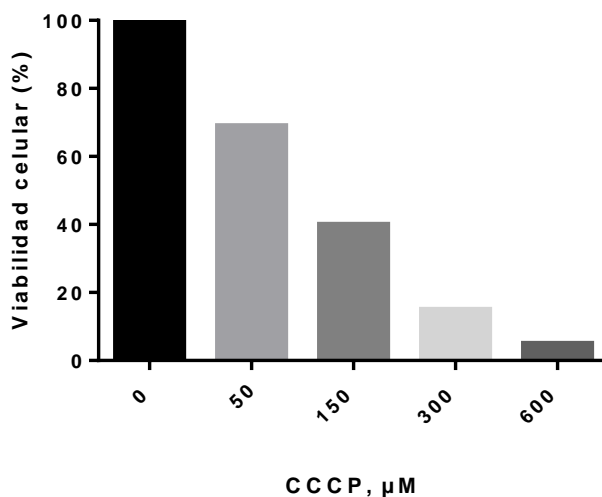
**Tabla 1. Adhesivos dentales universales.**

Descripción de los adhesivos universales utilizados en este estudio. Se detalla fabricante y su composición.

### c) Estimulación celular

Las células se incubaron con los diferentes adhesivos universales por distintos tiempos (2h-4h-6h) para evaluar marcadores moleculares de apoptosis y por 24 h para evaluar citotoxicidad. Como control negativo se utilizó sólo medio de cultivo y como control positivo de apoptosis se usó carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP). Se realizó una curva de concentración CCCP/viabilidad para determinar la concentración a usar en los ensayos (Figura 2), se optó por la concentración 300  $\mu$ M, que reducía en un 80% la viabilidad celular. Para los ensayos de inhibición de apoptosis, se utilizó el inhibidor general de caspasas Fluorometil cetona N-benciloxicarbonil-Val-Ala-Asp (Z-VAD-FMK) a una concentración de 100  $\mu$ M. Ésta concentración ha sido utilizada en células Saos-2 en trabajos previos

para inhibir apoptosis (Hunter y cols., 2001; Pucci y cols., 1999). El inhibidor de caspasas fue aplicado 4 h antes de la estimulación celular con los adhesivos, como lo realizado en el trabajo de Zeng y cols., 2013.



**Figura 2. Efecto citotóxico de CCCP en células Saos-2; curva concentración-respuesta.**

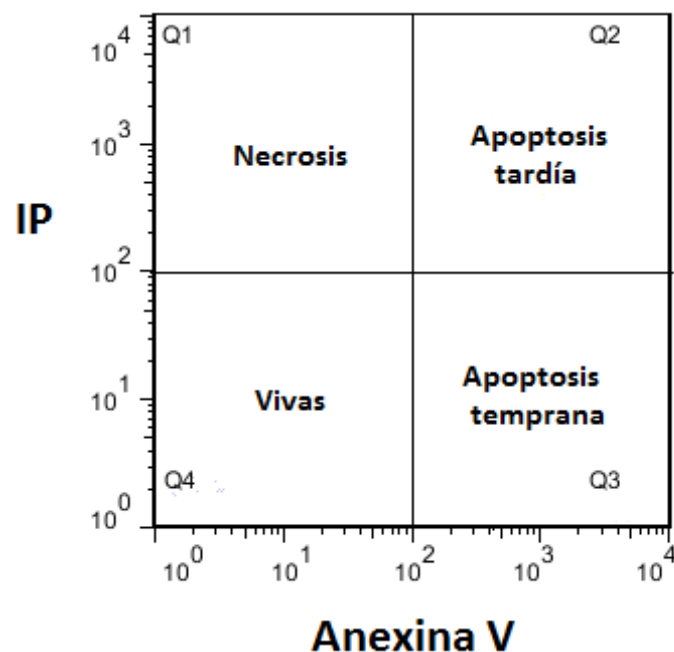
Células Saos-2 se incubaron durante 24 h con diferentes concentraciones de CCCP. Se utilizó el método MTT para registrar la viabilidad celular. Los resultados se expresan respecto de células tratadas solo con medio de cultivo (n=1).

d) Detección de la exposición de fosfatidilserina por tinción con anexina V

Se sembraron 500.000 células por pocillo en placas de 35 mm, se dejaron por 24 h para su adherencia y crecimiento. Posteriormente, las células se incubaron por 2-6 h en presencia o ausencia de los diferentes adhesivos universales. Una vez terminado el experimento se descartó el medio de cultivo. Se agregó 1 mL de PBS 2% FBS. Se rasparon los pocillos y los extractos recolectados se centrifugaron a 2138 g durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en buffer de unión a anexina V (Hepes 10 mM, NaCl 140 mM,  $\text{CaCl}_2$  2,5 mM, pH = 7,4) a una concentración de  $1 \times 10^6$  células  $\times \text{ml}^{-1}$ . Las células fueron marcadas con los siguientes fluorocromos para determinar cambios asociados a la apoptosis: yoduro

de propidio, IP ( $10 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ , Sigma-Aldrich) para evaluar la integridad de la membrana plasmática y anexina V-APC ( $1 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ , Molecular Probes-Invitrogen) para la evaluación de la exposición de fosfatidilserina.

Se agregaron  $5 \mu\text{L}$  del kit Anexina V-APC y  $1 \mu\text{L}$  de yoduro de propidio a  $100 \mu\text{L}$  de suspensión y se incubó a temperatura ambiente por 30 min en oscuridad. Luego se agregaron  $400 \mu\text{L}$  de buffer de unión. Posteriormente se centrifugaron a  $2138 \text{ g}$  por 5 min, se descarto sobrenadante y se resuspendieron en  $200 \mu\text{L}$  de buffer FACS (PBS, 5 % v/v BSA, EDTA 2 mM,  $\text{NaN}_3$  2 mM), se transfirieron a tubos de citometría y se leyeron dentro de los 30 min siguientes. Las muestras se analizaron en un citómetro FACS Calibur BD (USA) y se registraron 10.000 eventos para cada una de ellas, como lo sugiere el protocolo de Crowley y cols., 2016. Los resultados se analizaron con el software FlowJo versión 7.6.1. Se consideraron células vivas aquellas negativas para la tinción con IP y Anexina V; células en apoptosis temprana las positivas para Anexina V y negativas para IP; células en apoptosis tardía aquellas positivas para Anexina V e IP; células necróticas aquellas negativas para Anexina V pero positivas para IP (Figura 3).



**Figura 3. Diagrama de citometría de flujo.**

Representación simultánea de dos parámetros medibles a través de citometría de flujo Eje X representa el valor de la señal de Anexina V; eje Y representa el valor de la señal de yoduro de propidio (IP).

### e) Detección de activación de Caspasa 3

Se sembraron 200.000 células por pocillo en placas de 35 mm. Se estimularon en ausencia o presencia de diferentes adhesivos universales por distintos tiempos (2-4-6h) ò con CCCP 300 µM. Una vez terminado el experimento, las células fueron lavadas 3 veces con PBS y posteriormente homogenizadas con tampón de lisis RIPA (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, desoxicolato de sodio 0,25 %, NP-40 1%, SDS 0,1%, EDTA 1mM, EGTA 1mM, pH 7,4) suplementado con inhibidores de proteasas (PMSF 1mM, AEBSF, Aprotinina, Bestatina, E-64, Leupeptina y Pepstatina). Los extractos recolectados se sonicaron por 3 min, se incubaron por 30 min en hielo, y luego se centrifugaron a 14254 g por 10 min a 4°C en una Microcentrífuga Hettich Mikro 200. La concentración de proteína de los sobrenadantes se determinó con Coomassie Plus™ Protein Assay (Thermo Fisher) usando albúmina bovina como estándar. Se utilizaron 50 µg de proteínas de cada lisado y se resuspendieron en buffer de carga (Glicerol 40%, β-mercaptoetanol, SDS 10%, Tris, Azul Bromofenol, pH 6.8). Se resolvieron por electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida al 12% a 90 V por dos 2 h. Las proteínas fueron luego transferidas a membranas de PVDF (Di-fluoruro de polivinilideno) a 30 mA durante toda la noche. Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% por 1 h, posteriormente fueron incubadas en la presencia del anticuerpo primario Anti-Caspasa 3 activada (#9661, Cell Signaling) durante toda la noche a 4°C. Después de ser lavadas 3 veces con tampón TTBS (TBS 20X, Tween 20) por 10 min, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano, 1h a temperatura ambiente, y se lavaron 3 veces con tampón TTBS por 10 min. La visualización de la marca quimioluminiscente se realizó con el kit Rapid Step™ ECL Reagent (Calbiochem) en el equipo Amersham Imager 600 RGB (GE Healthcare Life Sciences). La intensidad de las bandas se determinó por densitometría con el programa Image J versión 2.0.0 (National Institute of Health, NIH, EE.UU). La detección de la proteína Tubulina se usó como control de carga de los geles.

f) Microscopía de Fluorescencia.

Se sembraron 20.000 células en cubreobjetos de vidrio (12 mm). Se estimularon en ausencia o presencia de los diferentes adhesivos universales por distintos tiempos (2-4-6h). Una vez terminada la estimulación se descartó el medio de cultivo y se realizaron dos lavados suaves con 500 µL de PBS por 2 min. Se fijaron con 500 µL de paraformaldehído al 4% v/v en PBS durante 30 min. Posteriormente, las muestras se lavaron con PBS. Se agregaron 500 µL de Glicina 100 mM y se incubaron durante 5-10 min a temperatura ambiente. Se lavó con 500 µL de PBS dos veces por 2 min. Posteriormente se permeabilizaron las células con 300 µL de PBS-Tritón X100 0.1% por 10 min a temperatura ambiente y se lavó con 500 µL de PBS dos veces por 2 min. Se incubó con una solución de Hoechst 33342 (ThermoFischer, EEUU) 10 µg/mL en PBS, en oscuridad por 30 min. Luego las células se lavaron nuevamente con 500 µL de PBS dos veces por 2 min y el montaje se realizó con el reactivo anti-fading Dako (Dako, Dinamarca). Las imágenes fueron obtenidas con el microscopio de epifluorescencia Nikon TiE (objetivos de 40X y 60X) y se analizaron con el software Image J versión 2.0.0 (National Institute of Health, NIH, EE.UU). Se utilizó el protocolo de Crowley y cols., (2018) para la categorización de los núcleos.

g) Ensayo de citotoxicidad

El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos en triplicado. Se sembraron 10.000 células por pocillo en un volumen final de 100 µL. Después de 24 h las células fueron tratadas en presencia o ausencia de los distintos adhesivos. Se utilizó Z-VAD-FMK como bloqueador general del proceso de apoptosis (4 h antes y durante los adhesivos). Se incubó a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> en 95% de aire. Se repitió el experimento por al menos 3 veces. Se determinó la viabilidad celular con el kit Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay (Thermo Fisher Scientific). Después de la estimulación por 24 h, el medio de



cultivo fue removido y reemplazado con 100  $\mu$ L de medio de cultivo fresco. Se agregó a cada pocillo 10  $\mu$ L de la solución stock MTT 12 mM (preparada acorde a las instrucciones del fabricante) y se incubó a 37°C por 2 h. Después de esto, se agregaron 100  $\mu$ L de la solución SDS-HCl (HCL 0.01M) a cada pocillo. La placa fue incubada a 37 °C por 4 h en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> en 95% de aire. La detección de la marca colorimétrica se realizó en un lector de absorbancia de microplacas iMark™ (BioRad), a 490 nm, con corrección a 670 nm. La viabilidad celular fue calculada y normalizada de acuerdo al promedio del grupo control negativo (sólo medio de cultivo, 100% viabilidad).

#### h) Análisis estadístico

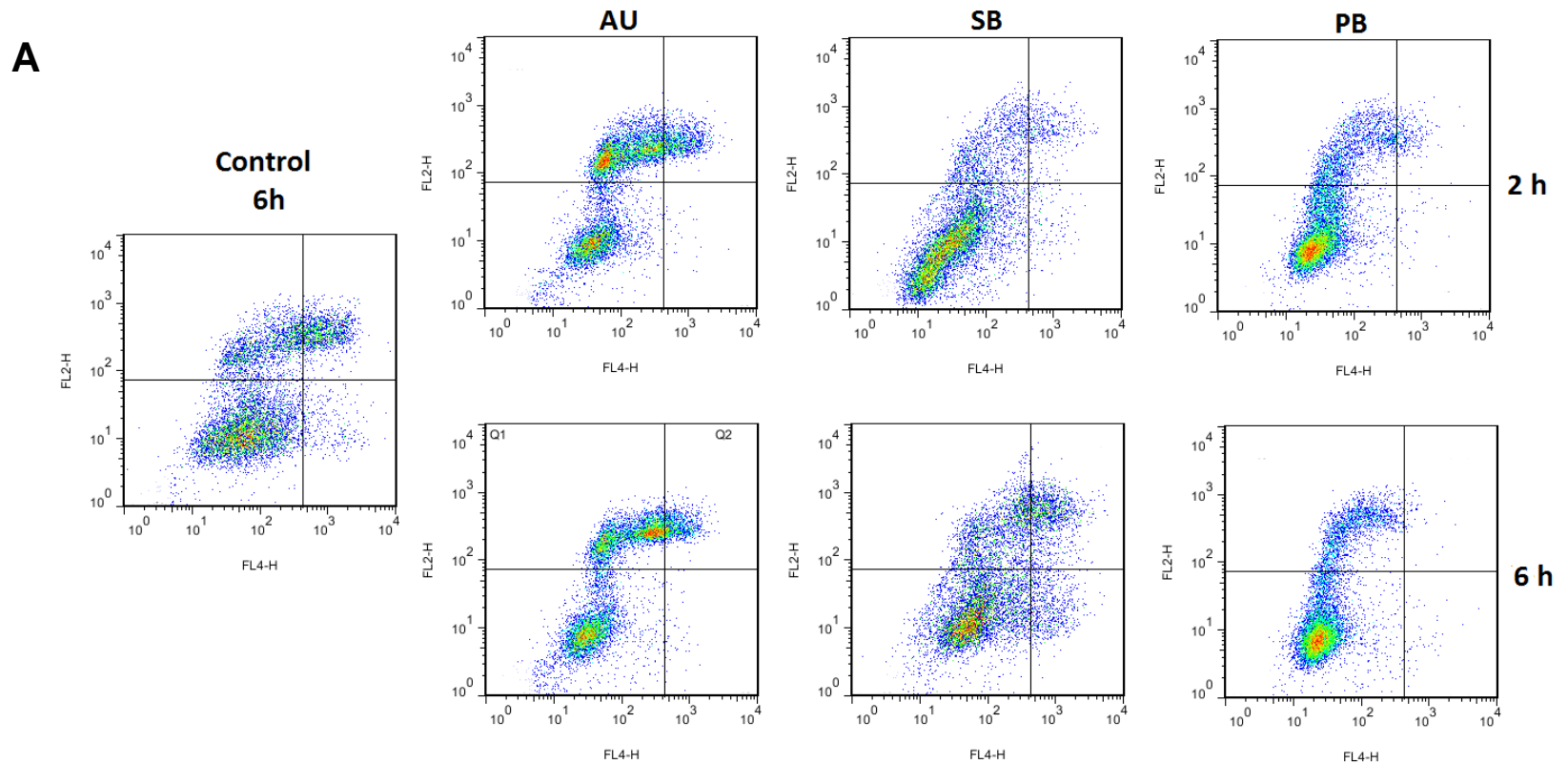
Los resultados fueron presentados como promedio  $\pm$  error estándar del promedio del número de experimentos independientes indicados (n) o como ejemplo representativo de experimentos realizados de forma independiente. Las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante el test Mann Whitney, para datos en que se comparó una única condición contra un control. Para comparaciones múltiples, se utilizó el test de Kruskal Wallis seguido de la prueba post-hoc de Tukey. Un valor  $p < 0,05$  fue considerado como límite de significancia. Se utilizó el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego CA, USA) para los análisis.

## **9. RESULTADOS.**

### **9.1 Marcadores de apoptosis en células Saos-2 inducidos por adhesivos dentales universales**

Para determinar si los adhesivos universales testeados inducen la expresión de marcadores de apoptosis se evaluó: 1. Expresión de fosfatidilserina como un marcador en la superficie externa de la membrana plasmática (técnica cuantitativa); 2. Detección de cantidades relativas de Caspasa 3 escindida como marcador temprano de apoptosis (semi-cuantitativo) y 3. Análisis de la condensación de cromatina y fragmentación nuclear como indicador de estados tardíos de apoptosis (método cualitativo).

En la Figura 4 (A), se puede observar que los adhesivos AU y PB presentaron una preferencia por muerte vía necrosis, se muestra que las poblaciones celulares se concentran en los cuadrantes superior izquierdo, no pasando en gran medida por los cuadrantes derechos en los cuales se detecta fosfatidilserina. Por otro lado, para el adhesivo SB, observamos una tendencia a la muerte vía apoptosis temprana a las 6 h, donde se presentan más células en los cuadrantes derechos. Los porcentajes de células vivas, en apoptosis temprana, en apoptosis tardía y en necrosis, obtenidas con la citometría de flujo son mostrados en la Figura 4 (B). La tasa de apoptosis tardía fue significativamente diferente para el adhesivo SB a las 2h y para el adhesivo PB a las 2 y 6 h comparadas con el control, siendo menores que éste último. En cuanto a necrosis, el adhesivo AU mostró un aumento significativo de esta vía tanto a las 2 y 6 h, comparada con el control.



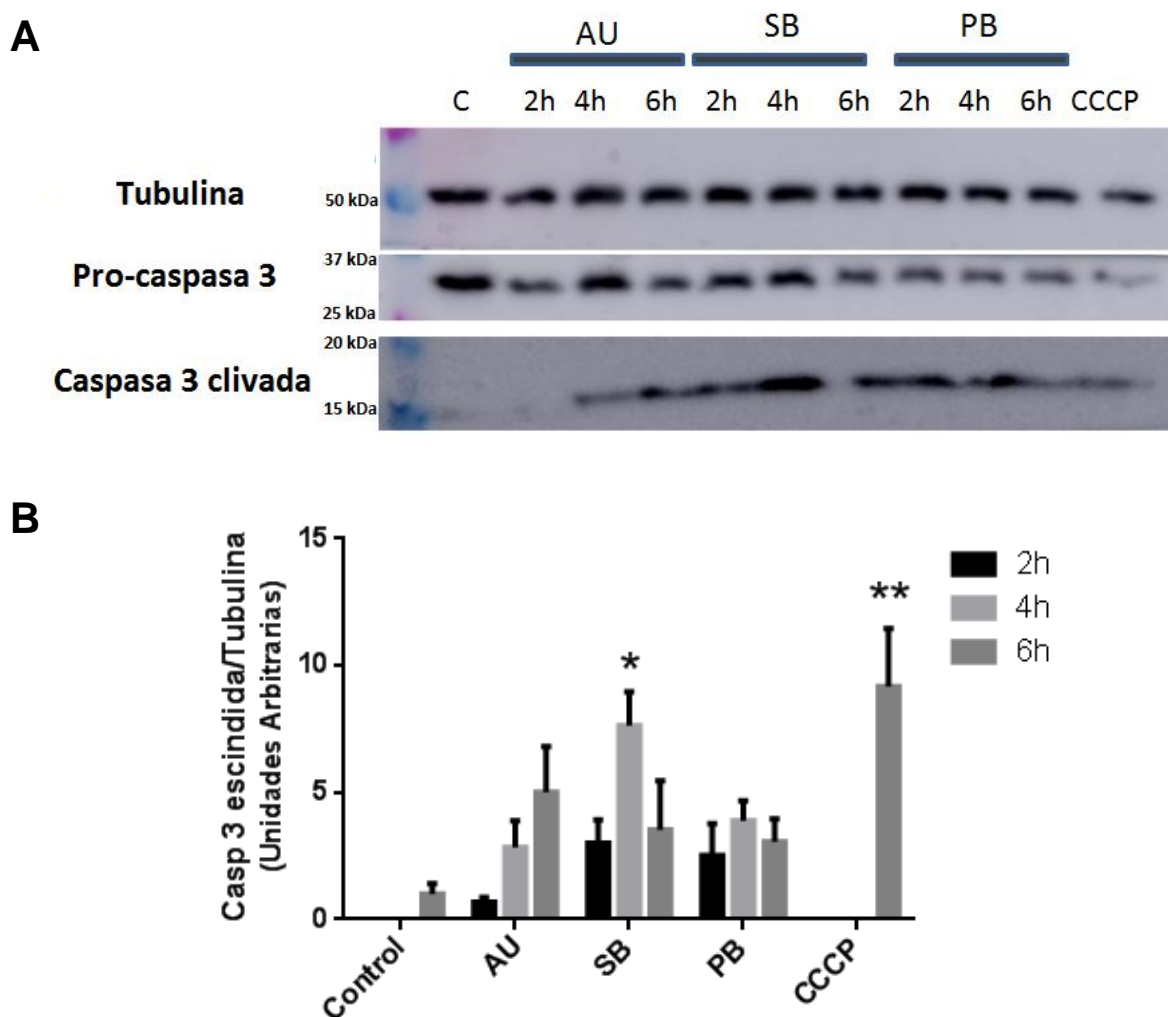
**B**

	Vivas		Apoptosis temprana		Apoptosis tardía		Necrosis	
	2h	6h	2h	6h	2h	6h	2h	6h
<b>Control</b>		63,8 ± 6,3		3,7 ± 1,3		18,9 ± 5,1		13,5 ± 3,6
<b>AU</b>	50,4 ± 9,1	43,9 ± 0,9	0,8 ± 0,5	0,9 ± 0,3	11,3 ± 3,1	11,8 ± 3,1	37,5 ± 7,0**	43,2 ± 3,1***
<b>SB</b>	77,9 ± 4,1	65,7 ± 4,4	3,5 ± 1,8	5,6 ± 1,1	6,3 ± 2,6*	9,4 ± 2,6	12,2 ± 0,3	19,1 ± 1,5
<b>PB</b>	76,7 ± 3,5	73,4 ± 4,0	0,5 ± 0,2	0,3 ± 0,1	4,2 ± 1,0*	3,3 ± 2,6*	18,5 ± 3,1	22,8 ± 2,4

**Figura 4. Inducción de apoptosis y necrosis en células Saos-2 por adhesivos universales.**

Células Saos-2 fueron tratadas con 3 adhesivos universales diferentes a una concentración de 0.1 % v/v por 2 y 6h. Fueron marcadas con yoduro de propidio y Anexina V y analizadas por tinción dual mediante citometría de flujo. (A). Imágenes representativas de citometría de flujo para los adhesivos AU, SB y PB a las 2 y 6h. (B). El porcentaje de células vivas, necróticas, en apoptosis temprana y tardía fueron calculados y analizados, Los datos están expresados como porcentaje del total de células evaluadas. Se muestra el promedio ± error estándar (n=3). El análisis de los resultados se llevó a cabo a test de Kruskal Wallis seguido de la prueba post-hoc de Tukey. \*, p< 0.05; \*\*, p< 0.01; \*\*\*, p<0.001 comparado con control a las 6 h.

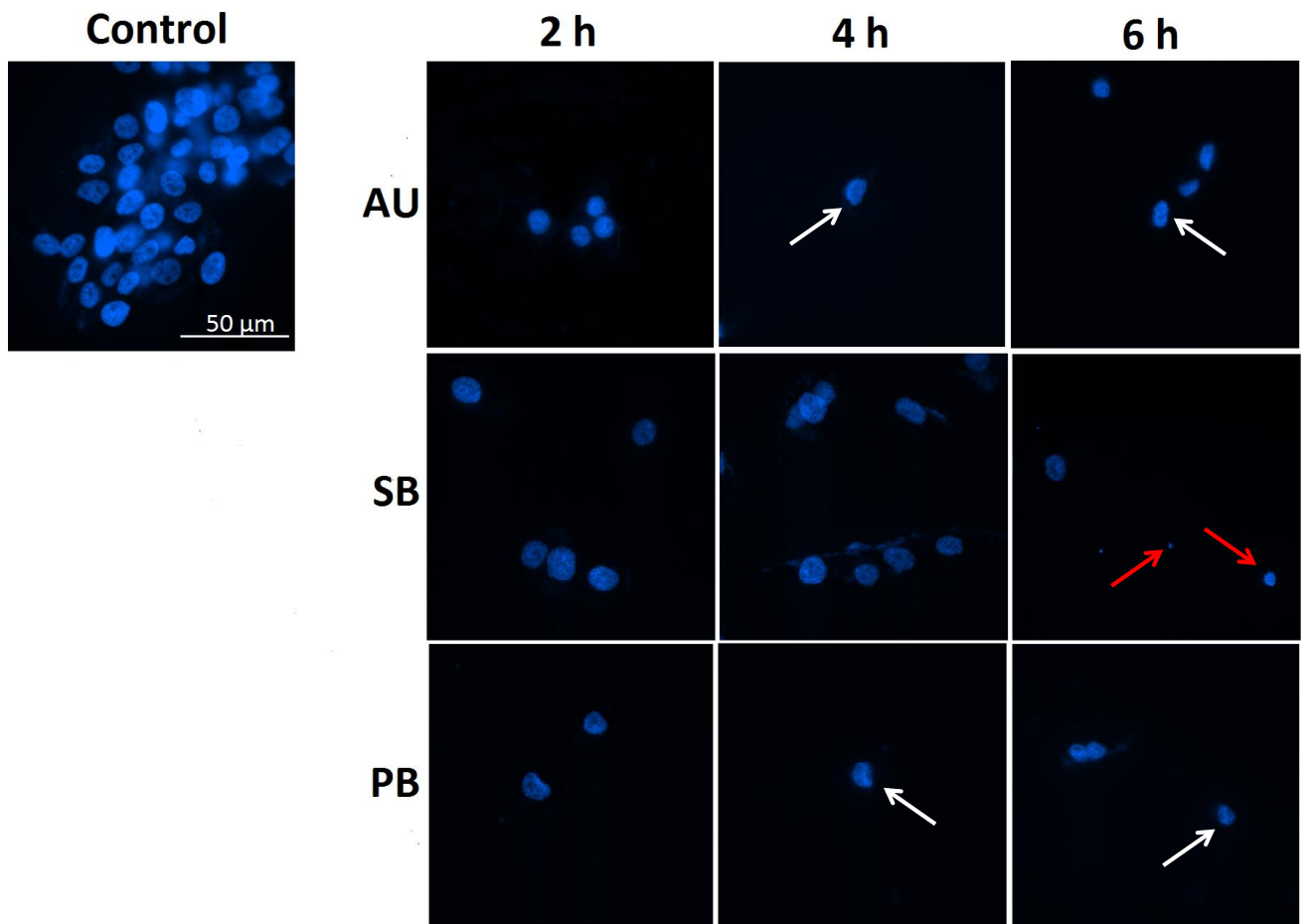
Para la detección de Caspasa 3 escindida se realizaron inmunoblots. Los resultados obtenidos se resumen en la Figura 5. La activación de Caspasa 3 coincide con una reducción en la intensidad de las bandas de pro-caspasa (35 KDa) en paralelo con el aumento de las bandas correspondientes a los fragmentos activos (17 KDa). En la figura 5 (B) se observa que la presencia del inductor de apoptosis CCCP aumentó tres veces la aparición del fragmento procesado de Caspasa 3. También observamos que para el control (medio de cultivo) la activación de Caspasa fue muy baja. De todos los adhesivos evaluados SB a las 4h genera un aumento significativo de Caspasa 3 escindida.



**Figura 5. Detección relativa de Caspasa 3 escindida en células Saos-2 tratadas con CCCP y tres adhesivos universales.**

(A). Inmunoblot representativo de la activación de Caspasa 3 inducida por adhesivos universales y CCCP a las 2, 4 y 6h. (B). Grafico representativo de la cuantificación relativa de Caspasa 3 activada. Cada muestra se normalizó respecto a Tubulina. Los datos se muestran como promedio  $\pm$  error estándar (n=3). El análisis de los resultados se llevó a cabo a través del test Mann Whitney. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  con respecto al control.

Las imágenes de inmunofluorescencia son mostradas en la Figura 6. En el grupo control, las células Saos-2 exhiben núcleos redondeados y teñidos uniformemente, y un gran número celular. Por otro lado, las células en el adhesivo AU y PB pasada las 4 h muestran núcleos de menor tamaño con bordes menos definidos (flechas blancas) compatibles con núcleos necróticos y además se aprecia un menor número celular,. En las células tratadas con el adhesivo SB se observa que a las 4 h está comenzando el proceso de fragmentación nuclear, y a las 6 h se observa la presencia de cuerpos apoptóticos (flechas rojas) teñidos más intensamente debido a la condensación del ADN.

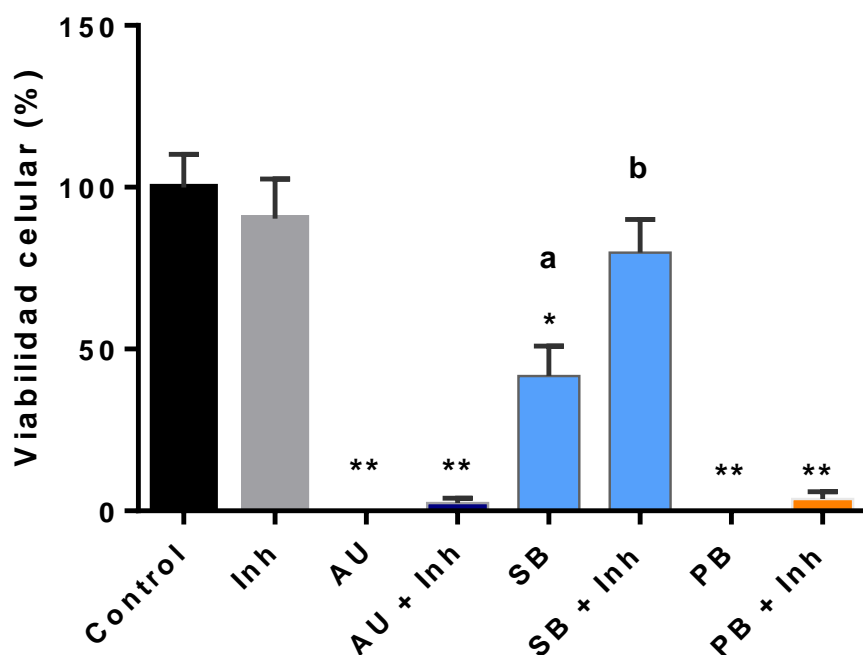


**Figura 6. Núcleos celulares de células Saos-2 cultivadas con diferentes adhesivos universales a 2, 4 y 6 h.**

Se utilizó la tinción Hoechst 33342 (azul) para marcar los núcleos celulares. Flechas blancas señalan núcleos irregulares y flechas rojas indican cuerpos apoptóticos. La barra de escala corresponde a 50  $\mu\text{m}$ . Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio de epifluorescencia Ti-E Nikon (60X) y procesados usando el software ImageJ.

## 9.2 Ensayo de viabilidad en células Saos-2 en presencia del inhibidor farmacológico de apoptosis Z-VAD-FMK.

En la figura 7 se muestran los resultados obtenidos con el ensayo MTT. Se puede apreciar que los tres adhesivos reducen la viabilidad celular de forma significativa: SB (47,9%), AU y PB (0%); el adhesivo SB resultó ser el menos agresivo de los 3 evaluados. Al utilizar el inhibidor de caspasas Z-VAD-PMK combinado con los distintos adhesivos, solo en el adhesivo SB se observó un aumento significativo en la viabilidad (79,8%), similar al resultado obtenido para el control. Los adhesivos AU y PB no presentaron un aumento significativo en la viabilidad con el inhibidor de apoptosis.



**Figura 7: Viabilidad celular de células Saos-2 cultivadas con tres adhesivos universales y con el inhibidor de apoptosis Z-VAD-FMK**

Resultados de ensayo MTT de células Saos-2 cultivadas en presencia de tres adhesivos universales y combinados con el inhibidor de apoptosis Z-VAD-FMK (Inh) durante 24 h. Los datos se muestran como promedio  $\pm$  error estándar (n=6). El análisis de los resultados se llevó a cabo a través del test de Kruskal Wallis seguido de la prueba post-hoc de Tukey. Letras diferentes representan diferencias significativas. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  con respecto al control.

## 10. DISCUSION

En este estudio se evaluó el efecto de tres adhesivos universales: AU, SB y PB sobre la vía de muerte celular que provocan en células Saos-2. Se eligieron tres marcadores que se inducen durante la Apoptosis, algunos se expresan al inicio del proceso de apoptosis y otros en su etapa tardía.

La expresión de marcadores en la superficie externa de la membrana plasmática es un hecho característico en células apoptóticas. Se ha observado una translocación de fosfatidilserina desde la cara interna de la membrana hacia la externa gracias a la acción de proteínas de membrana translocasas, ofreciendo un mecanismo de reconocimiento para las células fagocíticas, éste fenómeno es un biomarcador efectivo para la detección de una célula apoptótica en etapa temprana (Elmore, 2007; Martínez, 2009). Se ha evidenciado que la combinación de Anexina V y el marcador catiónico yoduro de propidio es un método cualitativo que puede garantizar la diferenciación de células vivas, células en apoptosis temprana, tardía y células necróticas. Muchos trabajos que han evaluado adhesivos dentales y/o sus componentes han utilizado esta técnica (Chang y cols., 2010; Elías y cols., 2015; Mantellini y cols., 2003; Li y cols., 2012; Lee y cols., 2016; Tuncer y cols., 2012).

En los resultados obtenidos en este estudio para la citometría de flujo, podemos observar primero, la temporalidad del fenómeno de muerte celular a las 2 y 6 h, donde se aprecia que para el adhesivo AU hay diferencias significativas en cuanto al porcentaje de necrosis comparado con el control tanto a las 2 como 6 h. Los resultados para el adhesivo PB aunque no son significativos también muestran una tendencia a muerte vía necrosis, además éste adhesivo obtuvo los menores porcentajes para apoptosis temprana y tardía en ambas horas. Ambos adhesivos fueron capaces de causar un daño irreversible en la membrana citoplasmática de las células Saos-2, ya que el yoduro de propidio es un marcador nuclear que penetra exclusivamente en células que tienen una membrana celular dañada. Al observar la temporalidad en los gráficos de puntos se muestra que la detección de fosfatidilserina es baja para ambos adhesivos (cuadrante inferior derecho), sugiriendo que en estos adhesivos no hay un marcado paso por apoptosis. Con respecto al adhesivo SB, se obtuvo un porcentaje de células necróticas similares a

las del control. Se observó un porcentaje mayor de detección de fosfatidilserina en apoptosis temprana para este adhesivo, mostrando más bien una tendencia a la vía apoptótica. Por otro lado, cabe mencionar que el porcentaje de células vivas para los adhesivos SB y PB pareciera no ser diferente al grupo control, aunque muestran una tendencia a disminuir. No obstante, esto puede deberse a que el número de mediciones es bajo (sólo 3 n de cada condición) lo que dificulta la interpretación de los resultados, o una mayor variabilidad entre un experimento y otro para estas células. Crowley y cols., 2016 sugieren seguir el ensayo de citometría hasta su finalización, aumentando el número de mediciones en el tiempo hasta que todas las células queden positivas para IP o midiendo otras características de muerte celular, como la activación de caspasa 3, fragmentación del ADN, etc. Es probable, que realizando este tipo de ensayo hasta las 24 h se pueda observar una marcada disminución en la viabilidad como lo obtenido en los resultados de los ensayos MTT.

Una de las características distintivas del proceso apoptótico, es la activación de enzimas proteolíticas caspasas. La familia de las caspasas humanas se divide en tres grupos: Grupo I comprende las caspasas inflamatorias -1, -4, y -5; Grupo II está formado por caspasas efectoras de la apoptosis -3, -6, y -7, que son clásicamente descritas como las “ejecutoras de la apoptosis”; finalmente, el Grupo III incluye las caspasas iniciadoras -8, -9, y -10 (Julien y Wells, 2017; Elmore, 2007). La proteasa Caspasa-3 es una de las claves en la ejecución de apoptosis, es el componente común de las dos cascadas o vías principales de inducción de este mecanismo de muerte; además está involucrada en el clivaje proteolítico de proteínas clave como la Poli ADP-Ribosa (PARP), que en última instancia determina la fragmentación del ADN y la muerte apoptótica (Núñez y cols., 1998). Algunos trabajos que han evaluado el tipo de muerte generado por adhesivos dentales utilizan la detección de Caspasa 3 escindida como un marcador eficiente de apoptosis (Mantellini y cols., 2003; Li y cols., 2012). Los hallazgos de este trabajo mostraron que en todas las condiciones experimentales se observó activación de Caspasa 3, pero fue en el adhesivo SB donde se presentó un incremento significativo, corroborando los resultados de la citometría de flujo que indican que para este adhesivo existe una tendencia a muerte celular programada



(apoptosis). Si bien en los adhesivos AU y PB también se encontró activación de Caspasa 3 faltarían a futuro aumentar el tamaño muestral para poder sacar conclusiones.

La observación de características morfológicas es otro parámetro clave que puede revelar la presencia de células apoptóticas según criterios morfológicos generales y diferenciarlas de las células necróticas (Martínez, 2009). Las características que deben estar presentes en la observación deben ser, según Elmore (2007): 1) núcleo electrodenso; 2) fragmentación nuclear; 3) membrana celular intacta; 4) desorganización de organelos citoplasmáticos; 5) vacuolas claramente alargadas; y 6) protuberancias irregulares (en inglés: blebs) en la superficie celular. En este trabajo se analizó la morfología nuclear por microscopía de fluorescencia, visualizando primero una reducción en el número celular para todos los adhesivos; segundo, núcleos con características necróticas tales como bordes del núcleo celular claramente menos definidos y ADN menos condensado (Crowley y cols., 2018) para los adhesivos AU y PB; tercero, en el adhesivo SB a las 4 h se observó fragmentación nuclear, proceso que ocurre antes de la formación de cuerpos apoptóticos, característico de la apoptosis tardía, y que vemos en este mismo adhesivo pero a las 6 h. Este resultado nos sugiere dos vías de muerte diferente para los adhesivos estudiados, pero deben complementarse con los otros marcadores evaluados en este trabajo, debido a que es un método cualitativo y subjetivo a las capacidades del investigador en cuanto a observación y detección.

El ensayo MTT consiste en una prueba de biosíntesis enzimática, que ha demostrado ser de gran confiabilidad para evaluar la actividad enzimática a nivel mitocondrial. En ésta prueba, la deshidrogenasa mitocondrial, oxida la molécula amarilla de MTT, generando una coloración azul (formazán); esto constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de viabilidad celular (Maya y cols., 2010). Este método ha sido usado en estudios previos para testear la citotoxicidad de adhesivos dentales y sus componentes, porque es simple, rápido y reproducible (Cortes y cols., 2017; Catunda y cols., 2017; Cohn-Inostroza y cols., 2015; Elías y

cols., 2015; Gutiérrez y cols., 2019; Kim y cols., 2015; Kraus y cols., 2017; Lee y cols., 2016; Pupo y cols., 2017; Ratanasathien y cols., 1995). En este trabajo se utilizó el ensayo MTT para evaluar la citotoxicidad de los tres adhesivos universales de manera independiente y con el inhibidor de caspasas Z-VAD-PMK. Todos los adhesivos evaluados redujeron la viabilidad en más de un 30%, lo que de acuerdo a la norma internacional ISO 10993-5 (ISO 10993. 2009) es considerado como un efecto citotóxico. El adhesivo SB mostró la viabilidad más alta de los tres evaluados (47,9 %), mientras que los adhesivos AU y PB la redujeron a cero. El resultado para el adhesivo SB fue consistente con el encontrado por Elías y cols., (2015), en el cual este adhesivo causó una reducción en la viabilidad entre 49 a 53 % en la línea celular de fibroblastos L929. Sin embargo, en otro estudio, usando la línea celular de fibroblastos 3T3 los sistemas adhesivos SB y AU fueron mejor tolerados, obteniendo 97,4 y 96 % de viabilidad respectivamente (Pupo y cols., 2017). Estas diferencias pueden atribuirse a las concentraciones en que se utilizaron los adhesivos (distintas a las usadas en este trabajo) y además a que diferentes líneas celulares pueden mostrar variabilidad en sus respuestas citotóxicas (Cao y cols., 2005; Goldberg, 2008). Además de estimar la citotoxicidad de los adhesivos, se evaluaron junto al inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK. Este inhibidor es un péptido sintético permeable que se une irreversiblemente al sitio catalítico de las proteasas caspasas e inhibe la inducción de apoptosis (Van Noorden, 2001). Sin embargo, no inhibe todas las caspasas en la misma medida, Rodríguez-Enfedaque y cols., (2012) informaron que Z-VAD-FMK inhibe las caspasas efectoras (3, 6 y 7), pero no inhibe la caspasa-9 iniciadora. Para este estudio se observó un aumento significativo en la viabilidad para el adhesivo SB al utilizar el inhibidor de caspasas, indicándonos que la vía de muerte principal sería apoptosis para este sistema; mientras que en los adhesivos AU y PB no hubo variación en los porcentajes de viabilidad.

El daño celular observado no se limitó a la reducción de la actividad mitocondrial, según lo evaluado con ensayos MTT. Tanto la citometría de flujo como la detección de Caspasa 3 activada y la observación de la morfología nuclear por inmunofluorescencia revelan la capacidad de los sistemas adhesivos evaluados para dañar las células, alterar la morfología y reducir el número de células. Todos

los marcadores evaluados indican una compatibilidad con la muerte celular por apoptosis para el adhesivo SB, mientras que para AU y PB se observan signos indicadores de necrosis. En numerosos estudios se ha descrito que los adhesivos dentales ejercen citotoxicidad a través de una vía principal: la apoptosis (Gallorini y cols., 2014; Krifka y cols., 2012; El-kholany y cols., 2012; Mantelline y cols., 2003; Lee y cols., 2016). Sin embargo, en este estudio se plantean dos vías de muerte diferentes dependiendo del adhesivo evaluado. Para el caso de AU y PB, los cuales mostraron ser los más citotóxicos comparados con el control, generarían muerte vía necrosis. Esto podría ser explicado por los monómeros presentes en su composición. Muchos estudios han evaluado la citotoxicidad de monómeros como HEMA, BisGMA, TEGMA, UDMA; indicando que estos compuestos son capaces de inducir la formación de ROS y reducir la cantidad de antioxidantes como el glutatión, que conduce a un desequilibrio oxidativo y finalmente la muerte celular (Schweikl y cols., 2006; Kraus y col., 2017; Krifka y col., 2013; Gallorini y cols., 2014; Ratanasathien y cols., 1995). Los tres adhesivos evaluados en este estudio contienen 10-MDP en su matriz; se ha reportado que éste monómero a bajas concentraciones genera toxicidad, promueve respuestas inflamatorias y suprime la diferenciación odontoblastica en células pulpares dentales humanas, resultados comparable al monómero TEGMA (Kim y cols., 2015). Aunque los mecanismos que generan su citotoxicidad no han sido aclarados, se ha sugerido que el 10-MDP tiene un alto potencial para causar daño en la membrana celular debido a su fuerte interacción con la capa de fosfolípidos (Fujisawa y cols., 1990). Los adhesivos evaluados comparten en su formulación el compuesto 10-MDP, pero difieren en los otros monómeros presentes en su composición: AU tiene UDMA y HEMA; PB tiene PENTA. El monómero UDMA induce cambios celulares a bajas concentraciones produciendo fenotipos patológicos y muerte celular (Wisniewska y cols., 2011). La variación en las proporciones de monómeros en los sistemas adhesivos es probablemente otro factor relacionado con los diferentes efectos citotóxicos de estos materiales (Chen y cols., 2003). Por otro lado, el adhesivo SB presenta en su composición HEMA y BisGMA. En numerosos trabajos se ha descrito el efecto citotóxico y la inducción de apoptosis que generan estos compuestos (Chang y cols., 2010; Lee y cols.,

2012; Elias y cols., 2015; Szep y cols., 2002). HEMA, considerado el menos tóxico, puede suprimir el crecimiento de muchos tipos celulares, inducir retrasos en la progresión del ciclo celular, incrementar los niveles de ROS y también activar apoptosis (Krifka y cols., 2012; Kierklo y cols., 2012). De forma similar Bis-GMA, considerado el más tóxico, altera el ciclo celular, eleva el estrés oxidativo e induce apoptosis de manera dosis dependiente (Elías y cols., 2015; Chang y cols., 2010). Los diferentes monómeros presentes en un adhesivo pueden interactuar y alterar su citotoxicidad, esas interacciones pueden causar que sean más o menos tóxicas que la suma de las toxicidades individuales (Ratanasathien y col., 1995). En este trabajo, el adhesivo SB fue el menos tóxico de los 3 evaluados, la combinación de 10-MDP, HEMA y BisGMA presentes en su formulación, fue menos tóxica que las otras combinaciones de monómeros y llevo a una muerte preferentemente apoptótica.

Los adhesivos dentales son materiales que se utilizan en la clínica odontológica a diario. Por esto, surge la necesidad de estudiar detalladamente los mecanismos que generan su citotoxicidad. En este trabajo se seleccionaron marcadores que permitieron proponer dos tipos de muerte celular diferentes inducidos por tres adhesivos universales. Pero cabe señalar que sus efectos dañinos dependen tanto del tipo celular como de la concentración del adhesivo que alcancen en las células (ya sea por la cantidad de monómeros residuales o por la tasa de difusión hacia los túbulos dentinarios). Con estos factores en mente, el uso de líneas celulares clínicamente más relevantes (células pulpares dentales), debería ser el siguiente paso hacia la confirmación de los mecanismos que generan citotoxicidad en estos materiales y así finalmente buscar estrategias farmacológicas que los contrarresten y aumenten su bioseguridad.

## **11. CONCLUSIONES**

A través del presente trabajo se pudo demostrar que los adhesivos universales Ambar Universal, Single Bond Universal y Prime and Bond Universal inducen citotoxicidad en células Saos-2, siendo el adhesivo Single Bond el menos agresivo a la concentración estudiada. La detección de marcadores de apoptosis (activación de caspasa 3, exposición de fosfatidilserina y morfología nuclear) y ensayos de MTT sugieren que el adhesivo Single Bond Universal genera principalmente muerte por apoptosis. Los adhesivos Ambar Universal y Prime and Bond Universal muestran una tendencia a muerte celular por necrosis. Comprender los tipos de mecanismos que generan citotoxicidad por adhesivos dentales universales es fundamental para la selección de estrategias que permitan proteger el complejo pulpo-dentinario y para la elección de adhesivos más inocuos o menos agresivos.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Alcaide M, Serrano M, Pagani R, Sanchez-Salcedo S, Vallet-Regí M, Portoles MT (2009). Biocompatibility markers for the study of interactions between osteoblasts and composite biomaterials. *Biomaterials* 30: 45–51.

Cao T, Saw TY, Heng BC, Liu H, Yap A, Lee M (2005). Comparison of different test models for the assessment of cytotoxicity of composite resins. *J Appl Toxicol* 25:101–108.

Catunda R, Cardoso J, De Oliveira E, Da Silva E, Moura V, Da Cruz D (2017). Citotoxicity evaluation of three dental adhesives on vero cells *in vitro*. *J Clin Exp Dent.*;9 (1):e61-6.

Chen R, Liu C, Tseng W, Jeng J, Lin CP (2003). Cytotoxicity of three dentin bonding agents on human dental pulp cells. *J Dent* 31:223–229.

Cohn N, Ehrenfeld P, Pavicic F, Varela C (2015). BisGMA cytotoxic effect on cell cultures of human fibroblasts by MTT assays. *Claves de Odontología*; 74: 9-15.

Cortés O, Alcaina A, Bernabé A (2017). Biocompatibility Evaluation of Four Dentin Adhesives Used as Indirect Pulp Capping Materials. *Acta stomatol Croat.*;51(2):113-121.

Crowley L, Marfell B, Waterhouse N (2018). Analyzing Cell Death by Nuclear Staining with Hoechst 33342. *Cold Spring Harb Protoc*; doi:10.1101/pdb.prot087205.

Crowley L, Marfell B, Scot A, Waterhouse N (2016). Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols* 11, pdb.prot087288. doi:10.1101/pdb.prot087288.

Elias S, Dos Santos AF, Garcia FP, Pereira PN, Hilgert LA, Fonseca-Bazzo YM, Guerra EN, Dias AP (2015). Cytotoxicity of Universal, Self-Etching and Etch-and-Rinse Adhesive Systems According to the Polymerization Time. *Brazilian Dental Journal* 26(2): 160-168.

Elmore S (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35 (4): 495-516.

El-kholany A, Mohsen HA, Abeer E, Ola M (2012). Apoptotic effect of different self-etch dental adhesives on odontoblasts in cell cultures. *Archives of oral biology* 57 7 75 – 783.

Fujisawa S, Kadoma Y, Komoda Y (1990). Hemolysis Mechanism of Dental Adhesive Monomer (Methacryloyloxydecyl Dihydrogen Phosphate) Using a Phosphatidylcholine Liposome System as a Model for Biomembranes. *Dental Materials Journal* 9 (2): 136-146.

Gallorini M, Cataldi A, Di Giacomo V (2014). HEMA-induced cytotoxicity: oxidative stress, genotoxicity and apoptosis. *International Endodontic Journal*, 47, 813–818.

Giannini M, Makishi P, Almeida A, Moreira P, Marin B, Nikaido T, Tagami J (2015). Self-Etch Adhesive Systems: A Literature Review. *Brazilian Dental Journal* 26(1): 3-10.

Goldberg M (2008). In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Invest* 12:1–8.

Gurpinar A, Ali Onur M, Cehreli Z, Tasman F (2006). Cytotoxicity of Two-step Selfetching Primer/Adhesives on L929 Cells. *Journal of BIOACTIVE AND COMPATIBLE POLYMERS*, Vol. 21—January.

Gutiérrez M, Alegría L, Méndez L, Bermudez J, Dávila A, Buvinic S, Hernández N, Reis A, Loguercio A, Farago P, Martin J, Fernández E (2019). Biological, mechanical and adhesive properties of universal adhesives containing zinc and copper nanoparticles. *Journal of Dentistry* 82 45–55.

Humter I, McGregor D, Robin S (2001). Caspase-Dependent Cleavage of Cadherins and Catenins During Osteoblast Apoptosis. *Journal of Bone and Mineral Research* Volume 16, Number 3.

International Organization for Standardization. ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices -Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. ISO 10993-5. 2009.

Julien O, Wells J (2017). Caspases and their substrates. *Cell Death and Differentiation* 24, 1380–1389.

Kierklo A, Pawinska M, Tokajuk G, Popławska B, Bielawska A (2012). Cytotoxicity evaluation of three light-cured dentin adhesive materials on human gingival fibroblasts, *ex vivo*. *Advances in Medical Sciences*, vol. 57, no. 2, pp. 385–390, 2012.

Kim EC, Park H, Lee SI, Kim SY (2015). Effect of the Acidic Dental Resin Monomer 10 Methacryloyloxydecyl Dihydrogen Phosphate on Odontoblastic Differentiation of Human Dental Pulp Cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. Nov; 117(5):340-9. doi: 10.1111/bcpt.12404.

Kraus D, Wolfgarten M, Enkling N, Helfgen EH, Frentzen M, Probstmeier R, Winter J, Stark H. (2017). In-vitro cytocompatibility of dental resin monomers on osteoblast-like cells. *J Dent*. 2017 Oct; 65:76-82. doi: 10.1016/j.jdent.2017.07.008.

Krifka S, Hiller K, Spagnuolo G, Jewett A, Schmalz G, Schweikl H (2012). The influence of glutathione on redox regulation by antioxidant proteins and apoptosis



in macrophages exposed to 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA). *Biomaterials* 33, 5177–86.

Krifka S, Spagnuolo G, Schmalz G, Schweikl H (2013). A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. *Biomaterials* 1-9.

Lee Y, So-Youn A, Yoon-Jung P, Frank H, Joo-Cheol P, Deog-Gyu S (2016). Cytotoxic Effects of One-Step Self-Etching Adhesives on an Odontoblast Cell Line. *SCANNING VOL. 38*, 36–42.

Li Y, Kuan Y, Huang F, Chang Y (2012). The role of DNA damage and caspase activation in cytotoxicity and genotoxicity of macrophages induced by bisphenol-A-glycidyl dimethacrylate. *International Endodontic Journal*, 45, 499–507.

Mantellini MG, Botero TM, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nör JE (2003). Adhesive Resin Induces Apoptosis and Cell-cycle Arrest of Pulp Cells. *J Dent Res* 82(8):592-596.

Martinez M (2009). Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. *Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XI No. 2 Diciembre* 152-166.

Maya C, Vallejo M, Martínez N (2010). Citotoxicidad de los adhesivos dentinarios. *Revista CES Odontología Vol. 23*.

Núñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N (1998). Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17:3237-3245.

Pan Y, Jiang L, Lin H, Cheng H (2017). Cell death affected by dental alloys: Modes and mechanisms. *Dental Materials Journal*; 36(1): 82–87.

Perdigão J, Swift E (2015). Universal Adhesives. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* Vol 17, No 6: 331-334.

Pucci B, Bellincampi L, Tafani M, Masciullo V, Melino G, Giordano A (1999). Paclitaxel Induces Apoptosis in Saos-2 Cells with CD95L Upregulation and Bcl-2 Phosphorylation. *Experimental Cell Research* 252, 134–143

Pupo YM, Bernardo CFF, de Souza FFFA, Michél MD, Ribeiro CNM, Germano S, Maluf DF (2017). Cytotoxicity of Etch-and-Rinse, Self-Etch, and Universal Dental Adhesive Systems in Fibroblast Cell Line 3T3. *Hindawi Scanning Volume 2017*, Article ID 9650420, 7 pages <https://doi.org/10.1155/2017/9650420>.

Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB (1995). Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res*. Sep;74(9):1602-6.

Rodríguez- Enfedaque A, Delmas E, Guillaume A, Gaumer S, Mignotte B, Vayssière JL, Renaud F (2012). zVAD-fmk upregulates caspase-9 cleavage and activity in etoposide-induced cell death of mouse embryonic fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 1823 1343–1352.

Sarvothaman S, Undi R, Pasupuleti S, Gutti U, Gutti R (2015). Apoptosis: role in myeloid cell development. *Blood Res* 2015;50:73-9.

Sofan E, Sofan A, Palaia G, Tenore G, Romeo U, Migliau G (2017). Classification review of dental adhesive systems: from the IV generation to the universal type. *Annali di Stomatologia* VIII (1):1-17.

Szep S, Kunkel A, Ronge K, Heidemann D (2002) Cytotoxicity of Modern Dentin Adhesives—In Vitro Testing On Gingival Fibroblasts. *Journal of Biomedical Materials Research*, 63(1), 53–60.

Tuncer S, Demirci M, Schweikl H, Erguven M, Bilir A, Tuncer A (2012). Inhibition of cell survival, viability and proliferation by dentin adhesives after direct and indirect exposure in vitro. *Clin Oral Invest* 16:1635–1646.

Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P (2003). Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent* 28:215-235.

Van Noorden C (2001). The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition. *Acta Histochem* 103, 241-251.

Wisniewska-Jarosinska M, Poplawski T, Chojnacki C (2011). Independent and combined cytotoxicity and genotoxicity of triethylene glycol dimethacrylate and urethane dimethacrylate. *Molecular Biology Reports*, vol. 38, no. 7, pp. 4603–4611.

Zeng H, Sun M, Zhou C, Yin F, Wang Z, Hua Y , Cai Z (2013). Hematoporphyrin Monomethyl Ether-Mediated Photodynamic Therapy Selectively Kills Sarcomas by Inducing Apoptosis. *PLoS ONE* 8(10): e77727. doi:10.1371/journal.pone.0077727.