



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD LEÓN

TÍTULO:

“Respuesta inicial de fibroblastos en adhesión y proliferación en superficies de titanio vs zirconio”

FORMA DE TITULACIÓN:
Tesis

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN ODONTOLOGÍA**

P R E S E N T A:

Araceli Meza Rodríguez



TUTOR: Dr. René García Contreras

Asesor: Dra. Laura Susana Acosta Torres

LEON, GTO. 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mi mamá por quién encontré mi amor por las letras, estoy segura de que ninguna de las dos se imaginó que a aquí me llevarían sus palabras. Muchas gracias mamá.

A mi papá por su interminable paciencia y constante apoyo.

Y a mis hermanos eternos pacientes, gracias por la confianza.

Los amo a todos.

Agradecimientos

A mi tutor el Dr. René García Contreras quien nunca paro de decir “Tú puedes”.

Al proyecto de DGAPA-UNAM, PAPIT IA204516 y a todos quienes trabajan en el Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria en el área de Nanoestructuras y Biomateriales, fue un placer trabajar con ustedes.

Al Dr. Omar Martínez por su apoyo en la caracterización de las muestras por microscopia de Fuerza Atómica.

Índice

Contenido	Pag.
1. Resumen.....	5
2. Abstract.....	6
3. Introducción	7
4. Marco teórico	9
4.1 Historia de los implantes dentales	9
4.2 Generalidades de la implantología	11
4.3 Biomateriales	15
4.4 Microscopía de fuerza atómica	21
4.5 Método MTT	24
5. Antecedentes.....	26
6. Planteamiento del problema	28
7. Hipótesis	30
8. Justificación	31
9. Objetivos	33
10. Metodología	34
11.1 Diseño de estudio	34
11.2 Materiales y métodos	38
11. Implicaciones éticas	43
12. Resultados	44
13. Discusión	46
14. Conclusiones	47
15. Bibliografía	50
16. Anexos	56

1. -Resumen

Introducción: En las últimas décadas, los implantes dentales se han posicionado como una de las mejores opciones de restauración dental integral; su colocación es una tarea multidisciplinar que requiere una sólida comprensión de los principios biológicos, periodontales, quirúrgicos y protésicos. **Objetivo:** El objetivo en este estudio fue el cuantificar la respuesta inicial de fibroblastos gingivales humanos (HGF) *in vitro* en superficies de titanio (Ti) en contraste con superficies de zirconia (Zr). **Metodología:** Se observaron las muestras de Ti y Zr bajo microscopía de fuerza atómica (AFM). Los HGF se inocularon sobre cada muestra para determinar la adhesión y proliferación celular. El reactivo MTT se mezcló en Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) y se inoculó en cada placa. Tres horas más tarde, el formazán se disolvió con dimetilsulfóxido y se inoculó en placas de cultivo de 96 pocillos. La placa se analizó a 540 nm en un espectrofotómetro de microplaca. Los ensayos se realizaron por triplicado de tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados con la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Lilliefors) y la prueba de Kruskal-Wallis y pruebas de Mann-Whitney. **Resultados:** La topografía de las placas de Zr mostraron una mayor rugosidad ($R_a = 0.39\mu\text{m}$) y de Ti ($R_a = 0.049\mu\text{m}$). La cuantificación de la adhesión de HGF fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en el Ti, mientras que la proliferación no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre los grupos. **Conclusión:** Incluso cuando Ti mostró inicialmente una mejor adhesión de células viables, después de 24 h las muestras de Zr mostraron una proliferación similar; lo que demuestra que ambos poseen respuestas biológicas comparables.

2. Abstract

Introduction: In recent decades, dental implants have become one of the best options for comprehensive dental restoration; their placement is a multidisciplinary task that requires a solid understanding of biological, periodontal, surgical and prosthetic principles. **Objective:** The aim of this study was to quantify *in vitro* the adhesion and proliferation of human gingival fibroblasts (HGF) response on titanium (Ti) and zirconia (Zr) surfaces. **Methodology:** Samples of Ti and Zr were observed under atomic force microscopy (AFM). HGF were inoculated in each sample to determine adhesion and cell proliferation. The reagent MTT was mixed with Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) and inoculated in each plate; formazan was dissolved with dimethyl sulfoxide and analyzed at 540nm in a microplate spectrophotometer. The test was performed with three independent experiments. Data were analyzed with Kolmogorov-Smirnov tests (Lilliefors), Kruskal-Wallis tests and Mann-Whitney test comparisons. **Results:** Topography of the Zr plates showed greater roughness ($R_a = 0.39\mu\text{m}$) than Ti ($R_a = 0.049\mu\text{m}$). Quantification of HGF adhesion was significantly higher ($p < 0.05$) in Ti, while proliferation showed no statistically significant differences ($p > 0.05$) between the groups. **Conclusion:** It is noteworthy that, even though Ti initially showed increased cell adhesion on the surface, after 24h Zr samples showed similar proliferation; this demonstrates that both surfaces have a comparable biological response.

3. Introducción

Durante las últimas décadas, los implantes dentales se han posicionado como una de las mejores opciones en la restauración integral de pacientes parcial o totalmente edéntulos⁽¹⁾. Proporcionando a los pacientes la posibilidad de volver a tener una dentadura completa, sana y funcional (desde el punto de vista médico-orgánico) y estética (desde el punto de vista actual).

La colocación de un implante es una tarea compleja y multidisciplinaria por lo que una vez puesta en práctica, el plan de tratamiento abarca ciertas disciplinas dentro del ramo dental que requieren de un sólido conocimiento de los principios biológicos, periodontales, quirúrgicos y protésicos.⁽²⁾

El éxito en la colocación de un implante es determinado por las diferentes condiciones que existen en la cavidad bucal y las respuestas de los tejidos ante estas. La presuposición para el éxito de un implante es el crecimiento de hueso directamente en la superficie de un implante (osteointegración) pues dirige las cargas masticatorias directamente al hueso⁽¹⁾ y la integración del tejido blando ya que establece un sello biológico entre la cavidad oral y el implante. Esta integración de los implantes dentales protege al hueso y a el implante de la penetración bacteriana, evitando la recesión gingival y la resorción ósea impulsada por la inflamación.⁽²⁾

Las respuestas locales y sistemáticas del tejido representan las características de la biocompatibilidad. Es por lo tanto, esencial el entender las características fundamentales de las respuestas de los tejidos a los implantes dentales.⁽³⁾

Anderson⁽⁵⁾ describe el termino biocompatibilidad como la habilidad de un biomaterial, prótesis o aparato medico de realizar una especifica aplicación, con una apropiada respuesta del huésped i.e., la evaluación de las respuestas biológicas son medidas con

la magnitud y duración de las alteraciones adversas en los mecanismos homeostáticos que determinan la respuesta del huésped.

Tan pronto como el implante es colocado en el sitio preparado, dentro de nanosegundos hay una formación de una capa de moléculas de agua alrededor de este, lo cual es principalmente influenciada por la superficie del implante.⁽⁵⁾

Las propiedades de las superficies de los implantes tienen particular relevancia para los procesos interfaciales químicos y biológicos que ocurren en las etapas tempranas de sanación después de la implantación. Esto influye de forma muy importante cuando se tiene que decidir el tipo de material de recubrimiento y acabado que usaremos en el implante dental. ⁽⁵⁾

Los materiales dentales más comúnmente utilizados para implantes dentales son los materiales metálicos de titanio (Ti) y sus variantes, y de cerámicas recubiertos por porcelana (óxido de aluminio y zirconia).⁽³⁾

El Ti y sus aleaciones se han utilizado como materiales base en aplicaciones biomédicas, especialmente en la odontología, ya que se ha demostrado que estos materiales destacan por sus buenas propiedades mecánicas, resistencia a la corrosión y su alta biocompatibilidad.⁽⁷⁾

La Zr tiene adecuadas propiedades mecánicas similares a las del acero inoxidable, tales como alta fuerza flexible y de tensión, alta resistencia a la abrasión y corrosión y baja conductividad térmica. La tasa de supervivencia y fractura por carga después de la simulación de la masticación demostró ser similar a la de los aditamentos de Ti.⁽⁸⁾

Los materiales dentales interactúan con varios tipos de células incluyendo osteoblastos, fibroblastos gingivales, fibroblastos de ligamento periodontal y monocitos.⁽⁹⁾

Los fibroblastos gingivales humanos (HGF) tienen un importante papel en el desarrollo, función y regeneración de las estructuras de apoyo del diente. Son estas células las responsables de la producción total y el volumen de la matriz extracelular y mantienen la síntesis e integridad de los tejidos conectivos gingivales, sin embargo, los fibroblastos también tienen funciones especializadas adicionales pues están involucrados en la reparación, remodelación y regeneración del hueso alveolar y el cemento adyacente.⁽⁹⁾

Así es que los fines de esta investigación fueron el cultivar HGF primarios y a través de un análisis observar la adhesión celular en superficies de titanio (Ti) y zirconio (Zr) mediante ensayo de colorimetría rápida por el método de MTT y de esta manera poder obtener y comparar los beneficios del uso de Ti en oposición al Zr.

4. Marco teórico

La restauración de los dientes perdidos es un aspecto importante en la odontología moderna. Cuando se pierden los dientes debido a caries, traumatismo o enfermedad periodontal, existe una necesidad de reemplazar los mismos por motivos estéticos y/o funcionales.

Un implante es un dispositivo médico fabricado para reemplazar una estructura biológica ausente, suplantar a una estructura dañada, o mejorar una estructura existente.⁽¹⁰⁾

4.1. Historia de los implantes dentales

La pérdida de dientes conlleva a muchas situaciones problemáticas con cuales los pacientes tienen que lidiar día a día, tales como la pérdida del aspecto estético, el deterioro de la eficiencia de la masticación y problemas de habla. Todos estos problemas conducen a situaciones de discapacidad. Como resultado de ello, la sustitución de los dientes perdidos se convirtió en una necesidad.⁽¹¹⁾

Durante siglos, la gente ha intentado reemplazar los dientes perdidos mediante la implantación.

Uno de los primeros indicios de la implantología data desde la época de la cultura Maya, quienes usaban el nácar (“la madre de las perlas”) como implantes dentales, alrededor del año 600 DC, siendo este el primer vestigio de la osteointegración.⁽¹⁰⁾

Más tarde, en los siglos XVI y XVII se usaron implantes de oro y hierro. En los inicios del siglo XX se desarrollaron los implantes metálicos (oro, plomo, iridio, tantalio, acero inoxidable y aleaciones de cobalto). En los años 40 se introdujeron los implantes subperiósticos de cobalto-cromo-molibdeno y en los años 60 los implantes de lámina de Ti. Desde los años 50 hasta los 80 éstos fueron los implantes más populares y exitosos

pero su falta de predictibilidad y su morbilidad a largo plazo supusieron su menosprecio y consecuente abandono. ⁽¹²⁾

En 1985 Branemark *et al.* acuñó un nuevo término "osteointegración" para esta la interfaz definida como "una conexión estructural y funcional directa entre ordenado, hueso vivo y la superficie de un implante de soporte de carga".⁽¹¹⁾ Brenemark describió desde su descubrimiento de la osteointegración y su investigación básica y clínica, hasta sus ensayos clínicos de a 12 años de seguimiento con los tornillos de Ti en 2 fases. A partir de este diseño en forma de raíz (el más difundido), se desarrollaron multitud de implantes sólidos y tornillos huecos, en formas cilíndricas, etc.

El trabajo de Branemark nunca ha sido superado en importancia en la historia de la implantología y el descubrimiento de la osteointegración constituye uno de los avances científicos más significativos de las últimas décadas. Más tarde los avances se han concentrado en el desarrollo de nuevos recubrimientos en las superficies de los implantes.⁽¹²⁾

4.2. Generalidades de la implantología

Componentes de los implantes

Para comprender las características y función de un implante deben conocerse primero sus partes. Aunque cada sistema de implante varía, las partes, básicamente, se conservan (Fig. 1.1).

La fijación es el componente del implante que se une al hueso. Dependiendo del sistema, la fijación puede tener diferentes superficies: roscada, con surcos, perforada, pulverizada con plasma o recubierta. Cada tipo de superficie está diseñado para un objetivo concreto.

El segundo componente es el pilar transepitelial, que proporcionan la conexión entre la fijación del implante y la fijación de la prótesis que será fabricada posteriormente. Habitualmente, el pilar se conecta a la fijación por medio de un tornillo, aunque también puede ser cementado o colocado por fricción.⁽¹³⁾

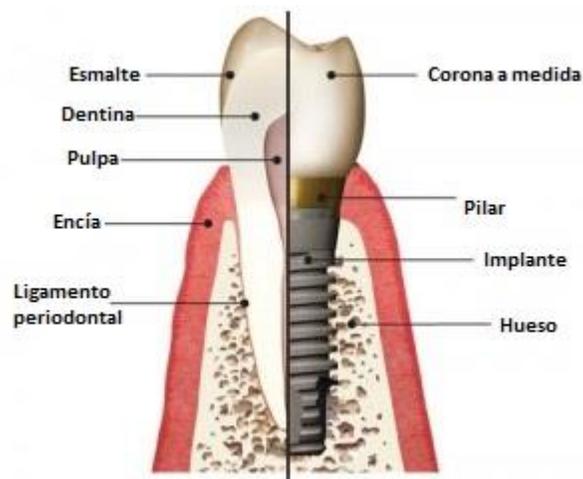


Fig 1.1 Manchado, A. (2016) Componentes de un implante de Ti. Recuperado de <http://www.clinicadentalsieiro.es/el-precio-de-los-implantes-dentales/>

Interfase implante-encía

La unión de los implantes endoóseos a los tejidos blandos peri-implantarios es muy similar a la de los dientes y depende en gran parte de la naturaleza de la superficie del implante.

Llamamos tejidos mucosos o blandos peri-implantarios, al epitelio y tejido conectivo presentes alrededor del cuello de los implantes.⁽¹⁴⁾

El tejido supracrestal que rodea los implantes se denomina mucosa peri-implantaria y está compuesto por el epitelio gingival queratinizado, el epitelio de unión y el tejido conectivo que se encuentra entre las células más apicales del epitelio de unión y el hueso alveolar.⁽¹⁵⁾

El epitelio gingival queratinizado posee una vertiente interna y otra externa. Su vertiente interna da lugar al surco y en la parte más apical del mismo se continúa con las células del epitelio de unión; en su vertiente externa el epitelio gingival está recubierto por epitelio bucal queratinizado. El epitelio de unión es una extensión no queratinizada del epitelio gingival y constituye la pared más externa del surco peri-implantario. En el surco peri-implantario al igual que en el surco periodontal, se produce fluido crevicular que contiene proteínas del complemento, enzimas e inmunoglobulinas.⁽¹⁵⁾

El tejido conectivo sano alrededor del implante tiene la capacidad mantener el sellado entre el medio ambiente intraoral y el sistema de soporte interno de los implantes.

Basados en este principio el rol esencial del epitelio durante la cicatrización de la herida es cubrir la superficie de cualquier tejido conectivo descubierto durante la cirugía, las células epiteliales localizadas en la periferia de la herida, producidas al momento de la instalación del implante son codificadas para dividirse y migrar a través de las partes injuriadas hasta que la continuidad epitelial sea restaurada.⁽¹⁴⁾

Las interacciones de las células adhesivas son complicados mecanismos que integran la unión de una membrana de proteínas a la matriz extracelular (ECM), la reformación intracelular del citoesqueleto y transducción de señales.⁽¹⁶⁾

Es mucho más fácil estudiar las interacciones de las células en una caja de cultivo que con una matriz extracelular localizada dentro de un animal. Por consiguiente, gran parte del conocimiento actual sobre las interacciones entre la célula y la matriz se obtuvo del estudio de células adheridas a varios sustratos *in vitro*.⁽¹⁷⁾

En la fig. 1.2 se muestran las etapas de la unión de un fibroblasto a la superficie de un recipiente de cultivo a base de vidrio.

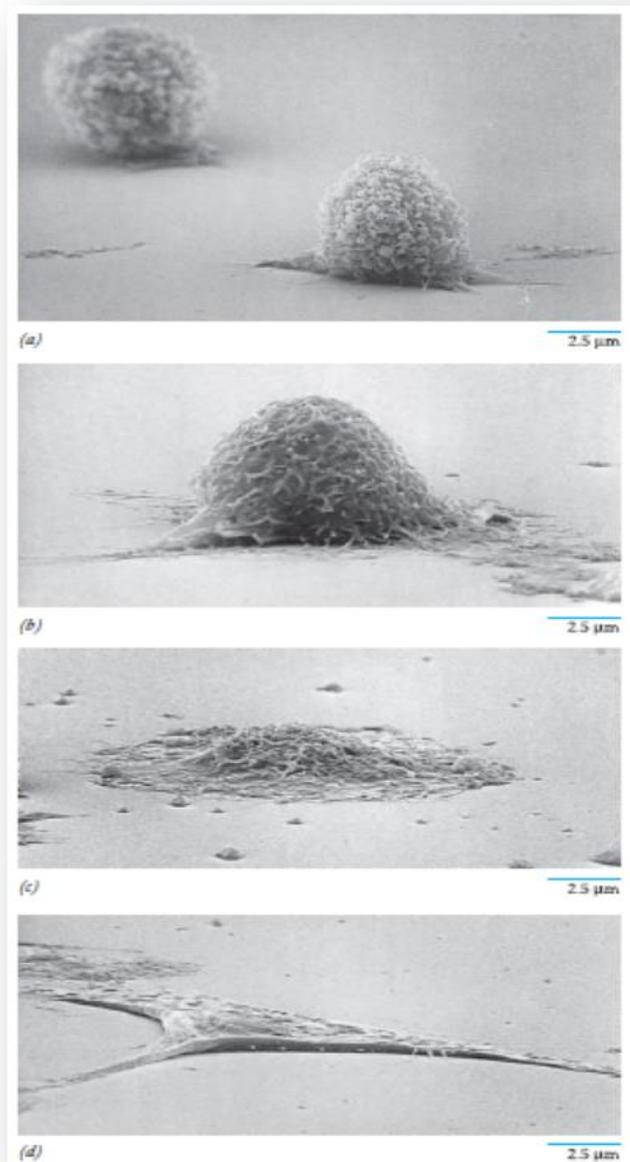


Fig. 1.2. J. J. Rosen y L. A. Culp. *Exp. Cell Res.* 107:141, (1977). Pasos en el proceso de diseminación celular. Micrografías electrónicas de barrido que muestran la morfología de fibroblastos de ratón en momentos sucesivos durante su unión y diseminación sobre cubreobjetos de vidrio. Las células se fijaron después de (a) 30 minutos, (b) 60 minutos, (c) dos horas y (d) 24 horas de su unión. Recuperada de *Cell and molecular biology: Concepts and experiments*.

En microfotografías tomadas de microscopía electrónica de transmisión y de barrido, procedentes de implantes de zafiro instalados en perros, se aprecian numerosas estructuras de imagen densa en la región más próxima al implante. ⁽¹⁸⁾

Con mayor resolución se confirma la existencia de una lámina basal ordenada asociada con los hemidesmosomas de la membrana celular. Al área entre el epitelio crevicular regenerado de la encía y la superficie del implante la denominaron zona de sellado biológico. ^(18,19)

Las características ultraestructurales del epitelio de unión peri-implantario alrededor de implantes de zafiro instalados en monos son casi idénticas a las del epitelio de unión de la dentición natural. Las células más internas del epitelio de unión del implante se unen a la superficie del implante por medio de estructuras similares a la lámina basal, de un grosor aproximado de 500 a 1.000 Å y parecidas a los hemidesmosomas. Una estructura continua similar a la lámina basal también está presente a lo largo de las células basales entre el epitelio de unión del implante y el tejido conectivo gingival. ⁽²⁰⁾

4.3. Biomateriales

Los biomateriales son materiales artificiales o naturales, que se utilizan en la fabricación de estructuras o implantes, para reemplazar la estructura biológica perdida o enferma y reemplazar su forma y función. Por lo tanto, los biomateriales ayudan a mejorar la calidad de vida y la longevidad de los seres humanos; el campo de los biomateriales ha demostrado un rápido crecimiento para poder mantener las demandas de una población que envejece. Los biomateriales se utilizan en diferentes partes del cuerpo humano como válvulas artificiales en el corazón, los implantes de reemplazo en hombros, rodillas, caderas, codos, orejas y en las estructuras bucodentales. ⁽²¹⁾

La elección de un adecuado material para aplicar en un organismo vivo es definida por su aplicación. En el caso de los implantes que están dedicados al reemplazo de tejido óseo, los puntos clave son las propiedades mecánicas; el módulo de Young, ductilidad, resistencia a la tracción, resistencia a la fractura, resistencia a la fluencia y resistencia a la fatiga.⁽²²⁾

Una clasificación general divide a los biomateriales en 3 principales categorías: metálicos, cerámicos y polímeros.⁽²³⁾

Metales

Los metales son materiales inorgánicos que poseen enlaces metálicos no direccionales con gran movilidad de electrones. Además de su capacidad para conducir la electricidad, los metales son fuertes y se pueden moldear relativamente fácilmente en formas complejas.⁽²²⁾

El desarrollo de implantes metálicos fue primordialmente impulsado por las demandas por nuevos enfoques en la reparación de huesos, típicamente fracturas internas y la fijación de largos huesos.⁽²⁴⁾

La demanda de materiales de implante metálicos se caracteriza por muchos ensayos clínicos. Se recomiendan por su alta resistencia mecánica que asegura una transmisión de las cargas durante un largo tiempo, así como por su rigidez mecánica cerca al hueso.

La resistencia a la corrosión de los metales en el organismo vivo es una de los principales requisitos previos para evitar el deterioro de las propiedades de los materiales debido a la degradación. Por otra parte, la biocompatibilidad se debe garantizar.

Desde el siglo XIX los implantes a base de metales han dominado el campo de la medicina, desarrollándose de manera principal en la cirugía ortopédica, ya sea para el reemplazo total de la articulación como cadera, la rodilla o el hombro, o para la fijación de fracturas o vasos en forma de clavos, tornillos o stents. Por otra parte, hoy en día los metales nobles también se pueden encontrar en el campo de la ortodoncia y la cirugía oral incluyendo implantes dentales, placas de Ti para cirugía ortognática, mallas para reconstrucción de suelo orbitario, maxilar y mandíbula, etc. ⁽²²⁾

El material más popular utilizado para implantes en la actualidad es el Ti. Como resultado de los amplios estudios de Branemark, el Ti se ha convertido en el patrón de referencia de los materiales implantológicos. ⁽¹³⁾

Titanio

Características físicas

El Ti puro pertenece al grupo de los elementos en transición. Presenta un aspecto plateado-grisáceo, brillante, aunque no tanto como otros materiales o aleaciones dentales, sino que es más apagado. Su densidad es de $4,5 \text{ g/cm}^3$, lo que le confiere el hecho de ser el metal más ligero de los utilizados hasta ahora en el campo dental. Cristaliza en el sistema hexagonal, característica que le permite tener una relativa resistencia a la deformación plástica (como el cobalto, manganeso, cinc, etc.), más incluso que los materiales que cristalizan en el sistema cúbico. Sin embargo, el Ti presenta cierto grado de ductilidad. ⁽²⁵⁾

Características mecánicas

Maleable, permite la conducción de láminas muy delgadas. Dúctil, permite la fabricación de alambre delgado. Duro; escala de Mohs 6, muy resistente a la tracción, gran

tenacidad, permite la fabricación de piezas por fundición y moldeo, material soldable, permite varias clases de tratamientos tanto termoquímicos como superficiales, puede mantener una alta memoria de su forma.⁽²⁶⁾

Características químicas

Tiene un número atómico de 22 y su peso atómico es de 47, 88 uma.

La resistencia a la corrosión que presenta es debida al fenómeno de pasivación que sufre (se forma un óxido que lo recubre). Es resistente a temperatura ambiente, a los ácidos y también a las bases.⁽²⁶⁾

Los ensayos clínicos de Ti se remontan a 1965 cuando Branemark *et al.*⁽¹⁰⁾ desarrollaron el implante dental de titanio y simultáneamente introdujeron el concepto de la osteointegración. Desde entonces, el Ti y sus aleaciones se han utilizado típicamente en aplicaciones médicas, especialmente en los implantes ortopédicos e implantes dentales.

En comparación con otros biomateriales metálicos tradicionales, tales como aleaciones de Co-Cr y los aceros inoxidable, las aleaciones de Ti poseen un módulo más bajo, biocompatibilidad superior y aumentan la resistencia a la corrosión. Estas actuaciones atractivas promueven el desarrollo y la aplicación de nuevas aleaciones de Ti en el campo médico.⁽¹⁶⁾

Cerámicos

Los cerámicos son materiales inorgánicos compuestos por iones o enlaces covalentes no direccionales y son por lo general formados a temperaturas elevadas. El tipo de cerámicos biocompatibles consisten principalmente en materiales cristalinos tales como el aluminio, el zirconio y fosfato de calcio. Los cerámicos son muy duros y más

resistentes a la degradación en muchos ambientes que algunos metales. Sin embargo, son más frágiles debido a la naturaleza de sus enlaces iónicos. La similitud en la composición química de la cerámica y la del hueso nativo, hace que la cerámica se utilice a menudo como parte de los implantes ortopédicos o como materiales dentales. Sobretodo cerámicas biocompatibles se utilizan de forma coherente con el esqueleto humano, huesos, articulaciones y dientes. En la medicina dental de los materiales cerámicos se utilizan como reemplazo de los dientes, debido a la alta resistencia a abrasivos.⁽²²⁾

Zirconio

Los materiales cerámicos que están especialmente desarrollados para uso médico y dental se denominan biocerámicos. La reciente introducción de las cerámicas basadas en Zr como material de restauración dental ha generado un considerable interés en la comunidad dental, la tecnología de óxido de zirconio ha impulsado un rápido desarrollo en la odontología libre de metal que puede proporcionar una alta biocompatibilidad, una mayor estética y una mayor fuerza en el material. El amplio conocimiento adquirido con respecto a la química de cerámica de la zirconia, cristalografía, y la producción de estas cerámicas de ingeniería llevaron a prometedoras aplicaciones dentales.^(27,28)

Características físicas

Existe zirconio puro en una forma cristalina como un metal blanco y dúctil y en una forma amorfa como un polvo de color azul-negro. El zirconio tienen un punto de fusión de 2128 K (1855 ° C o 3371 ° F), un punto de 4682 K (4409 ° C o 7968 ° F) de ebullición y una densidad de 6 g/cm³.⁽²⁷⁾

Características mecánicas

Límite de resistencia 1.200 MPa (flexión), elongación (0,1%), módulo de elasticidad 200 GPa, resistencia a la tracción 350 MPa y dureza-Vickers de 85-100.⁽¹³⁾

Características químicas

Entre los elementos en la corteza terrestre el zirconio está en el puesto 18 en abundancia, sin embargo, este elemento en particular no se produce en la naturaleza en estado puro, pero sólo en conjunción con los óxidos de silicio ($\text{SiO}_2 \times \text{ZrO}_2$) o como el óxido libre (ZrO_2).⁽²⁸⁾

Polímeros

Al contrario de las otras dos clases de materiales biocompatibles, los polímeros son materiales orgánicos que poseen largas cadenas con un gran número de pequeñas unidades repetitivas (monómeros) que se mantienen unidas por enlaces covalentes direccionales.⁽²⁹⁾

Los polímeros son ampliamente utilizados en aplicaciones biomédicas debido a la gama de propiedades físicas y químicas posibles con estos materiales. Los polímeros se pueden fabricar fácilmente en diferentes formas y estructuras complejas y, además, las propiedades de la superficie se pueden ajustar fácilmente. Los polímeros que se utilizan como materiales de implante pueden ser derivadas ya sea de fuentes naturales tales como proteínas o de fuentes sintéticas. Al utilizar los polímeros en los dispositivos biomédicos varios puntos que son cuestiones críticas. Los polímeros tienden a absorber fácilmente el agua y biomoléculas de los alrededores y por lo tanto pueden alterar la química de la superficie.^(13,29)

Por otra parte, los polímeros son en comparación con los metales o cerámicas, materiales blandos que pueden sufrir desgaste mecánico y la descomposición. Para la esterilización de los polímeros tiene algunas dificultades como los procedimientos de esterilización de uso común puede influir en las propiedades químicas y mecánicas.⁽²²⁾

El avance que han tenido los biomateriales, la nanotecnología y la ciencia del implante; mejorada por la biotecnología; y el entendimiento de la interface del hueso-implante han tenido como resultado la expansión en el uso de los implantes. La mejora en las técnicas de imagenología para la ayuda en el diagnóstico; una amplia variedad de geometrías, superficies y de refinadas técnicas quirúrgicas han hecho posible para la mayoría de los pacientes saludables el poder recibir un implante.⁽³⁰⁾

4.4. Microscopía de fuerza atómica

El microscopio de fuerza atómica (AFM) es una de las técnicas que se encuentran dentro de la familia de instrumentos del Scanning Probe Microscopy (SPM). La primera técnica del SPM fue el Microscopio de Efecto Túnel desarrollado por Binnig y Tohrer en 1985 por lo que les otorgaron el Premio Nobel de Física en 1985. Posteriormente, Gerar Binnig y *cols.* desarrollaron el microscopio de fuerza atómica en 1986.⁽³¹⁾

El AFM ha sido utilizado para estudiar espesores de los materiales en el campo de las telecomunicaciones, biológicas, químicas, automotoras, aeroespaciales e industrias de energía. Los estudios con el AFM son aplicados básicamente para analizar los fenómenos de abrasión, adhesión, limpieza, corrosión, grabado, fricción, lubricación y pulido.⁽³²⁾

Cualquiera que sea la aplicación en que se utiliza, todos los AFM cuentan con los siguientes componentes:

- 1.- Una punta muy aguda montada sobre un cantilever o lámina.

- 2.- Una manera de medir la deflexión de la lámina.
- 3.- Un sistema de retroalimentación para monitorear y controlar la deflexión (y por lo tanto la fuerza de interacción).
- 4.- Un sistema mecánico de barrido (usualmente un piezoeléctrico), que mueve a punta sobre la muestra o a la inversa, la muestra respecto a la punta.
- 5.- Un sistema de despliegue visual, que convierta los datos medidos en una imagen.⁽³³⁾

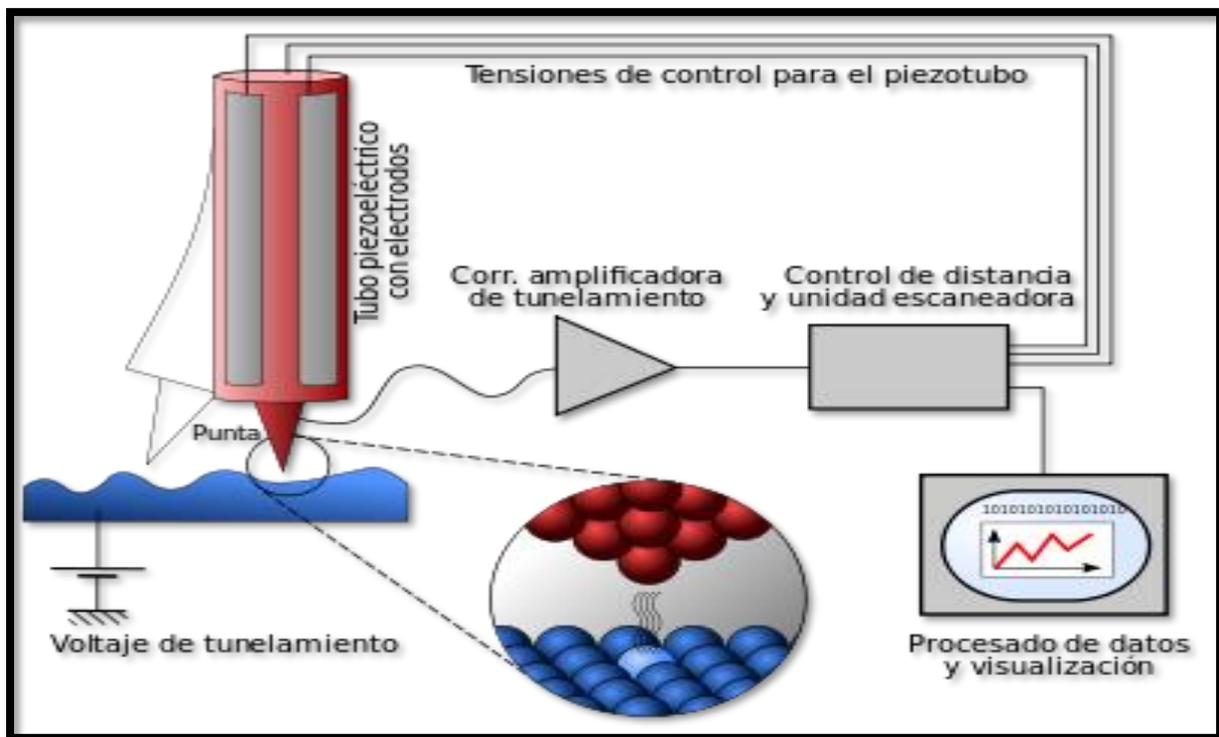


Fig 1.3 Michael Schmid and Grzegorz Pietrzak. (2011) Esquema del microscopio SPM. Recuperado de Rastertunnelmikroskop-schema es.svg.

El AFM tiene por objeto para observar la topografía de la superficie de estudio, aumentándola hasta una resolución nanométrica e incluso atómica, que ayuda a comprender la topografía y características superficiales de los materiales.

El AFM es una técnica de alta resolución y una de las ventajas de esta técnica es que requiere una muestra pequeña, no se daña al examinarla y la preparación de ésta es mínima.

Los principios del funcionamiento del microscopio de fuerza atómica son simples, consta de una cabeza cuya punta muy fina se pone en contacto con el material, la punta hace un barrido sobre la muestra y las vibraciones que se obtienen son leídas a través de una láser. Esa información se muestra en la pantalla de la computadora donde aparece la topografía de la superficie observada. ^(34,35)

Especificando un poco más, la punta está atómicamente afilada y es de Si o Si₃Na₄ de 2 micras de largo y con un diámetro menor a los 100 Angstroms. Al barrerse sobre la superficie mantiene una fuerza constante de 10⁻¹¹ a 10⁻⁶ Newtons, por medio de mecanismos piezoeléctricos para poder obtener información de la altura y de la superficie de la muestra examinada. Mientras la punta examina la superficie de la muestra moviéndose de arriba hacia abajo en el contorno de la superficie, un fotodetector mide las diferencias en intensidad de luz y las convierte en voltaje. Mediante un software se obtiene una imagen de la superficie analizada con una resolución lateral de 5 nm y una resolución vertical de 0.01 nm en todo tipo de muestreo. ⁽³⁶⁾

Los parámetros de rugosidad más usados en ingeniería son la rugosidad promedio, (R_a) y la rugosidad Rms (R_{rms}). El R_{rms} representa el promedio a la altura media, es la desviación estándar de la distribución estadística de alturas, que a su vez es la raíz

cuadrada de la varianza o segundo momento respecto a la media. R_a corresponde a los valores absolutos de las desviaciones del perfil, en los límites de la longitud básica l .⁽³⁴⁾

4.5. Método de MTT

Este método es simple y se usa para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo lo cual es capaz de medirse mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables.⁽³⁷⁾

El MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazólico), es captado por las células y reducido por la enzima succinato deshidrogenasas mitocondrial a su forma insoluble formazán. El producto de la reacción, el formazán queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas. De esta forma es cuantificada la cantidad de MTT reducido mediante un método colorimétrico, ya que se produce como consecuencia de la reacción un cambio de coloración del amarillo al azul.⁽³⁸⁾

La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir al MTT a formazan después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa.⁽³⁹⁾

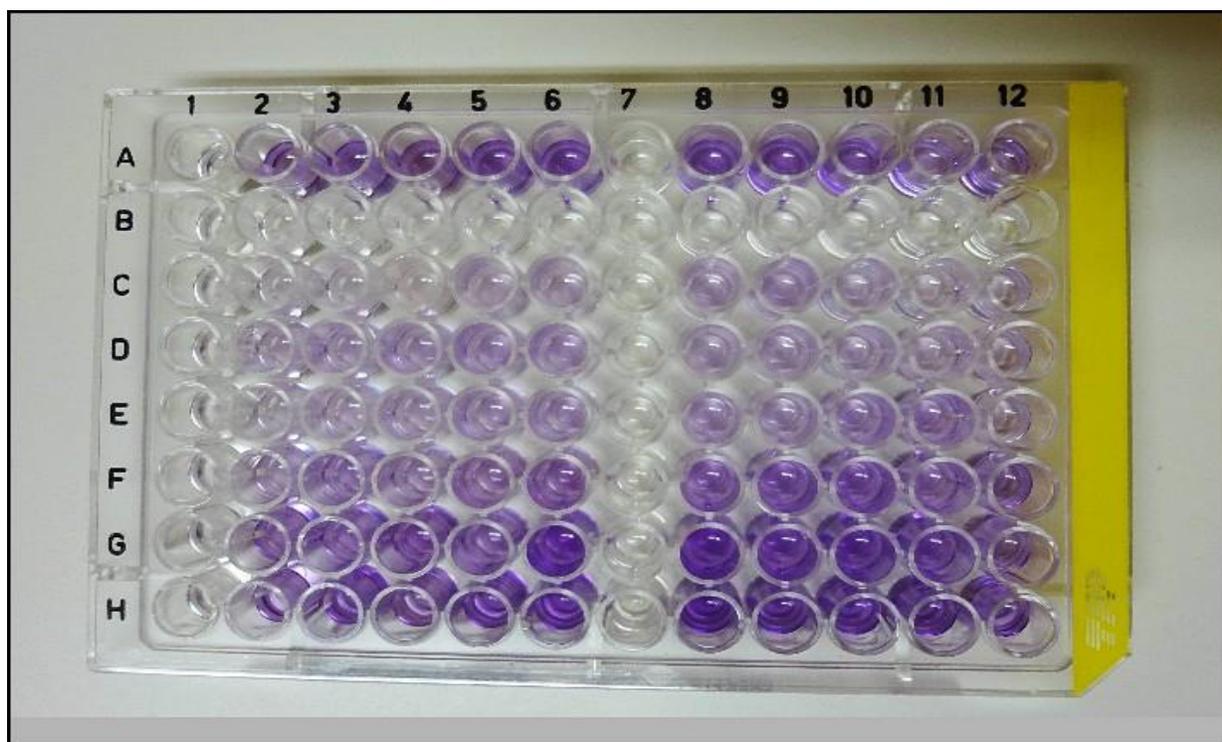


Fig. 1.4. Flow Laboratories (2015) Placas de 96 pocillos en donde se realiza el método de MTT. Recuperado de:

http://bosquedebialowieza.blogspot.mx/2015_06_01_archive.html

5. Antecedentes

El objetivo de la ingeniería de las superficies de los implantes dentales no es sólo adaptarse a las demandas sociales, fisiológicas y estructurales a las que tienen que responder dichos materiales, pero también poder evitar los efectos negativos que producen los materiales implantados en el tejido circundante y mejorar la interacción entre el material técnicamente diseñado y la materia viva.⁽²²⁾

En el organismo, la adhesión es muy importante por una variedad de procesos fisiológicos y patológicos, tales como la respuesta del huésped a los dispositivos implantados y la integración de construcciones de ingeniería de tejido.⁽¹⁶⁾

Bajo estos parámetros varios investigadores se han dedicado a analizar las propiedades de adhesión que poseen diferentes tipos de materiales para implantes dentales.

E. Rompen, *et al.* Realizaron un análisis de la literatura del efecto de las características de los materiales, sus componentes, la topografía de la superficie y las conexiones de los implantes con la integración de los tejidos blandos.⁽⁴⁰⁾

E. Velazco-Ortega, *et al.* Investigaron sobre que aspectos son relevantes para la viabilidad celular en las superficies de implantes dentales de Ti; enfocándose primordialmente en las características topográficas y la rugosidad de las mismas.⁽⁴¹⁾

Con las nuevas propuestas acerca del uso de materiales cerámicos⁽⁴²⁾; entre ellos el uso del Zr para su implementación en el campo de los implantes dentales⁽⁴³⁾, diversas investigaciones se han publicado.

G. Soon, *et al.* Presentaron un análisis de la literatura del Zr como biocerámica: las modificaciones de su superficie y la respuesta celular.⁽⁴⁴⁾

N. Esfahanizadeh, *et al.*⁽⁴⁵⁾ A. Pae, *et al.*⁽⁴⁶⁾ y Yamano, *et al.*⁽⁴⁷⁾, analizaron la proliferación y viabilidad de los HGF sobre superficies de Ti y Zr.

Aun con todos estos antecedentes, las bases para el uso del Zr como material para implantes dentales no están cementadas adecuadamente, por lo tanto, más investigaciones al respecto tienen que ser conducidas.

6. Planteamiento del problema

En las últimas décadas los implantes dentales se han posicionado como una de las mejores opciones para la rehabilitación oral en el campo de la odontología, por lo tanto, su innovación está en un constante proceso; en la actualidad el número de implantes fabricados dentro de este campo ha proliferado de tal manera que se ha convertido en un verdadero dilema poder declarar la mejor opción de elección; aun así, el Ti sigue siendo el estándar de oro, en cuanto a materiales de fabricación para implantes dentales.

Sin embargo, desde la experiencia clínica, el color gris nunca a armonizado con el color de la encía y a pesar del gran esfuerzo que se ha realizado para incrementar la adherencia celular peri-implantaria, aún no se han logrado resultados completamente satisfactorios.

De acuerdo con el conceso de la Academia Americana de Periodontología, las enfermedades peri-implantarias se encuentran entre las principales causas en el fracaso de la implantología, estas se presentan en 2 formas: peri-implantitis y mucositis peri-implante.

La mucositis peri-implante ha sido descrita como “una enfermedad en la cual la presencia de inflamación esta confinada a los tejidos suaves que rodean el implante dental sin señales de perdida de soporte óseo siguiendo después de la remodelación ósea inicial durante la sanación”.

La periimplantitis se ha descrito como “un proceso inflamatorio alrededor de un implante, que incluye tanto los tejidos blandos y la pérdida del hueso de soporte más allá de la remodelación ósea biológica”.⁽³⁰⁾

Ambas enfermedades están íntimamente ligadas a la adhesión que tienen los fibroblastos gingivales a los materiales de implantes dentales.

El resultado de un pobre sello biológico alrededor del implante conlleva a que la presencia de la flora microbacteriana normal de la boca invada la interfase tejido-implante resultando en enfermedades peri-implantarias que a largo plazo sobrellevan al fracaso clínico del implante.⁽⁴⁸⁾

Aunque el logro de una cantidad suficiente de mucosa peri-implante y su mantenimiento sería el objetivo por conseguir, la realidad es que la migración gingival es uno de los problemas más constantes en la implementación de implantes dentales, en especial cuando su uso es en el sector anterior dental.^(49,50)

Una opción viable sería elegir un pilar de un color igual y/o similar al de la superficie del diente, de esta manera se pueda mezclar con el entorno y no llamar la atención cuando existan cambios tales como; la recesión del tejido peri-implante y/o la remodelación de los tejidos circundantes, de este modo puede existir una transición del color del pilar al del diente.

De acuerdo con la literatura consultada el Zr es un material que compite en todas las cualidades que el Ti tiene para ofrecer.

De ahí enunciamos la siguiente cuestión:

¿Existe una diferencia significativa en la adhesión celular inicial de fibroblastos entre las superficies del Zr en contraste con el Ti?

7. Hipótesis

Hipótesis de investigación

La adhesión inicial y proliferación de fibroblastos gingivales humanos en superficies de Zr es mayor a la existente con el Ti.

Hipótesis nula

La adhesión inicial y proliferación de fibroblastos gingivales humanos en el Zr es menor o igual a la existente con el Ti.

8. Justificación

Dado que la tendencia actual es un incremento en la colocación de implantes dentales, con un aumento del 6% por año,⁽⁵¹⁾ donde el público demanda cada vez mejores y más estéticos materiales en la odontología,⁽⁵²⁾ las casas comerciales son impulsadas a una competencia cada vez más intensa en la investigación y desarrollo de los materiales dentales.

Investigaciones clínicas a largo plazo (con más de 10 años de seguimiento) tienen reportes muy favorables, con tasas de hasta un 94% de supervivencia que colocan al Ti y sus aleaciones como el estándar de oro en biomateriales.⁽⁵³⁾

No obstante, la sola supervivencia, definida por la osteointegración del implante (con o sin peri-implantitis, o con problemas asociados como la estética) no representa de manera suficientemente el cuadro clínico global.⁽⁴⁸⁾

En la práctica clínica actual la mayoría de los pacientes consideran el resultado estético final como el aspecto más importante en su rehabilitación oral, por lo tanto, una adecuada osteointegración no es suficiente para declarar el éxito de un implante; y cuando se considera el éxito en lugar de la supervivencia, las tasas disminuyen significativamente de un 93,9% a un 73,5%.^(48,54) Debido a que, en algunos casos, el color del implante de Ti puede percibirse a través de la mucosa periimplantaria causando inconvenientes estéticos:

Por lo tanto, el desarrollo del Zr como material en implantes dentales ha sido el resultado de una búsqueda para encontrar nuevas alternativas en materiales para la implantología dental con características físicas y químicas similares al Ti, pero con una mejora en la integración de los tejidos blandos con los implantes dentales.⁽⁵⁵⁾

La cerámica de Zr parece ser un material adecuado para los implantes dentales debido a su color de dientes, sus excelentes propiedades mecánicas y su buena biocompatibilidad.⁽⁵⁶⁾ Estudios recientes en animales han demostrado una osteointegración exitosa de los implantes dentales de Zr en condiciones descargadas y cargadas.^(57,58)

Pero debido a la falta de información clínica en el uso de implantes de Zr a largo plazo, su uso no ha sido difundido e investigado a más profundidad.

9. Objetivos

General

Cuantificar el número de fibroblastos gingivales humanos adheridos sobre superficies de Ti y Zr.

Específicos

- Determinar la rugosidad de las superficies pulidas de las placas de Ti y de Zr.
- Observar mediante microscopía de fuerza atómica la topografía de las superficies de Ti y de Zr.
- Estimar el número de fibroblastos gingivales humanos primarios adheridos sobre las superficies de Ti y Zr a una hora de incubación y la proliferación a 24 horas de incubación mediante el estudio de MTT.

10. Metodología

10.1. DISEÑO DE MUESTRA

Se trata de un estudio experimental puro, comparativo, descriptivo y prospectivo.

MUESTRA

El muestreo fue de tipo no probabilístico por cuotas que correspondió a un total de 18 muestras (9 muestras de Ti con dimensiones de 10x10x0.5mm y 9 de Zr con dimensiones de 10x10x10 mm) en un total de 3 experimentos independientes. El grupo de muestras de Ti fue utilizado como grupo control y el de Zr como grupo experimental. Los experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria (LII), Área de Nanoestructuras y Biomateriales perteneciente a la ENES Unidad León, UNAM.

Criterios de inclusión

- Muestras de Ti con dimensiones de 10x10x0.5 mm.
- Muestras de Zr con dimensiones de 10x10x10 mm.
- Células de fibroblastos gingivales humanos primarios.

Criterios de no inclusión

- Aleaciones comerciales de Ti o Zr.
- Muestras de Ti o de Zr tratadas adicionalmente con factores externos.

- Muestras no pulidas.
- Cultivos de fibroblastos gingivales humanos con más de 15 divisiones celulares.

Criterios de eliminación

Placas de Ti y Zr:

- Muestras no esterilizadas apropiadamente.

Células de fibroblastos gingivales humanos primarios:

- Células con presencia de contaminación.
- Inoculación de las células sobre la placa de Ti o de Zr que se extendieron más allá de la superficie de la placa.

Análisis de variables independientes

Variable	Definición	Definición operacional	Tipo	Escala y unidad de medición
Rugosidad superficial	Es el conjunto de irregularidades de la superficie real, definidas convencionalment e en una sección donde los errores de forma y las	Se calculó con un medidor de superficie en micrómetros (μm), en base a R_a que es la media aritmética del punto de partida de la rugosidad de la superficie en base a	Cuantitativa. Continua.	De razones $0\mu\text{m}---2\mu\text{m}$

	ondulaciones han sido eliminados. ⁽³⁵⁾	una línea media y R_{ms} que es la distancia vertical entre el punto más alto y el punto más bajo dentro de la longitud a medir.		
Tipo de muestra	Biomateriales usados para la fabricación de implantes dentales que incluyen metales (Ti), cerámicos (Zr) y polímeros. ⁽⁵¹⁾	Se seleccionaron muestras de superficies de implantes dentales, las cuales están diseñadas para estar en relación directa con diferentes estructuras bucodentales.	Cualitativa	Nominal Ti puro tipo 1 Zr (Zirkonzahn)

Variables dependientes

Variable	Definición	Definición operacional	Tipo	Escala y unidad de medición
<p>Cuantificación <i>in vitro</i> de HGF adheridos y proliferados.</p>	<p>Es el número de células HGF al unirse a elemento del medio externo o a otras células, cuantificadas por medio de la actividad mitocondrial celular.⁽⁵⁹⁾</p>	<p>Se utilizó el método de MTT por medio de la actividad mitocondrial cuantificada en el lector de microplaca por absorbancia en nm (nanómetros). La adherencia celular correspondió a 1 hora y la proliferación a 24 horas.</p>	<p>Cuantitativa. Continua.</p>	<p>De razones 0—n absorbancia</p>

10.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Medio esencial mínimo de Eagle alfa (α -MEM) (Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, EUA), medio modificado de Eagle de Dulbecco (DMEM), suero fetal bovino (FBS), penicilina G y sulfato de estreptomicina (Life Technologies, Gibco, Carlsbad, CA, EUA), puro titanio de tipo 1 (99,5%) (Tokuriki, Melters, Tokio, Japón) y zirconio (Zirkonzahn, An der Ahr, Gais, Deutschland), MTT (azul de tiazolilo tetrazolio, Sigma-Aldrich), Dimetil sulfóxido (J. T. Baker, Center Valley, PA, EE.UU.)

Preparación de las muestras

Preparación de las muestras de Ti: Se prepararon muestras de Ti puro de tipo 1 (99,5%) en placas de 10x10x0.5mm (n= 9). Las muestras se colocaron en resina epoxi y fueron pulidas por una pulidora automática giratoria (160-200 rpm, Buehler, Lake Bluff, IL, EE.UU.) con diferentes tipos de acabado de superficies con lijas de agua, # 400, 800, 1000, 1500 y 2000 (Fuji star, Sankyo, Rikagaku, Okegawa, Japón) y 0,05 a 1 micra suspensión de diamante con un paño de limpieza (Chemomet, Buehler).

Las muestras se retiraron y la resina epóxica, fue limpiadas por un lavado ultrasónico con agua destilada, etanol 99,5% y 99,5% de acetona durante 10 minutos y después se secaron por corriente de aire.

Preparación de las muestras de Zr: Se prepararon muestras de Zr de 10x10x10mm (n=9). Las muestras se sinterizaron tradicionalmente en un horno a 2822 ° F durante 6 horas y después la temperatura se disminuyó gradualmente durante 3 horas, a continuación, que fueron cortadas y pulidas con abrasión mecánica y chorro de arena.

Todas las placas de Ti y Zr fueron reutilizados a través de experimentos después de repulido, lavado y esterilización ultrasónica

Observación y medición de la superficie

Las superficies de Ti y Zr fueron evaluadas usando microscopía de fuerza atómica (NANOSURF FlexAFM, Liestal, Suiza). La rugosidad de la superficie se estimó, en modo tapping, con base a Ra (Media aritmética de los valores absolutos de las coordenadas de los puntos del perfil de rugosidad en relación con la línea media dentro de la medida de longitud) y Rms (La mayor rugosidad parcial presente en la superficie de medición) sobre una superficie de 80x80µm en modo de derivación basado sobre ISO 4287: 1997: Especificaciones de productos geométricos (GPS)-Textura de la superficie: Método del perfil.

Esterilización de muestras

Las muestras fueron lavadas en ultrasónico (Pro-sonic 1000) durante 5 minutos, se retiraron las muestras, se secaron y se introdujeron en bolsas de papel termo-resistentes. Se esterilizaron utilizando el método húmedo con una autoclave marca Cristofoli.

Cultivo celular

Los fibroblastos gingivales humanos (HGF) se obtuvieron a través de una biopsia de tejido gingival de un tercer molar de un paciente de 18 años de edad, con el anterior consentimiento informado por escrito de los padres. El proyecto fue autorizado por el Comité de Bioética de ENES, UNAM, Unidad León. El tejido se lavó dos veces con PBS, 2% de clorhexidina. Explantes de aproximadamente 1 x 1 mm fueron suspendidos

en α -MEM suplementado con 20% de suero bovino fetal inactivado por calor, 100 U/ml de penicilina G y 100 mg/ml de sulfato de estreptomicina. Las células se incubaron a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ durante dos semanas de crecimiento exponencial con los cambios en el medio de cultivo cada tres días. HGF tiene una esperanza de vida *in vitro* de aproximadamente 40 PDL (Población Nivel de duplicación).

Las células se desprendieron enzimáticamente usando 0,25% de tripsina-EDTA 0,025%-2Na en PBS para cada experimento. Después de que el cultivo celular primario fue establecido, los experimentos subsecuentes fueron realizados con medio de cultivo DMEM complementado con 10% de FBS y antibióticos.(60)

Cuantificación de la adherencia y proliferación celular

Las células de HGF fueron sub-cultivadas como células adherentes y se inocularon en 2x10⁶ células/ml en de cada una de las muestras Ti y Zr y se dejó incubar a temperatura ambiente (23 °C) durante 60 minutos. Las placas se lavaron dos veces con PBS para eliminar las células no adheridas.

En el caso de la proliferación celular, se incubaron las células durante otras 24 horas más a 37 °C con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. El número de células viables se determinó por el método MTT. Brevemente, se disolvió 0,2 mg/ml de un reactivo MTT en DMEM+10% FBS y se incubó durante 4 horas. El formazán se disolvió completamente con Dimtilsulfóxido (DMSO) y fueron transportados a una placa de 96 pocillos, y después se analizaron a 540 nm usando un lector de microplaca (Thermo Fisher Scientific).

En la adhesión y la proliferación celular se utilizaron las placas de Ti como valor de base estándar del número de células viables en la superficie. Los datos se reprodujeron por triplicado a partir de tres experimentos independientes.

Análisis estadístico

Se calculó la media, la desviación estándar y el porcentaje. Todos los datos fueron sometidos a pruebas de Kolmogorov-Smirnov de normalidad (Lilliefors), prueba de Kruskal-Wallis y comparaciones múltiples de Mann-Whitney. La significancia estadística fue considerada con un valor $p < 0.05$ con un intervalo de confianza del 95%.

Diagrama experimental

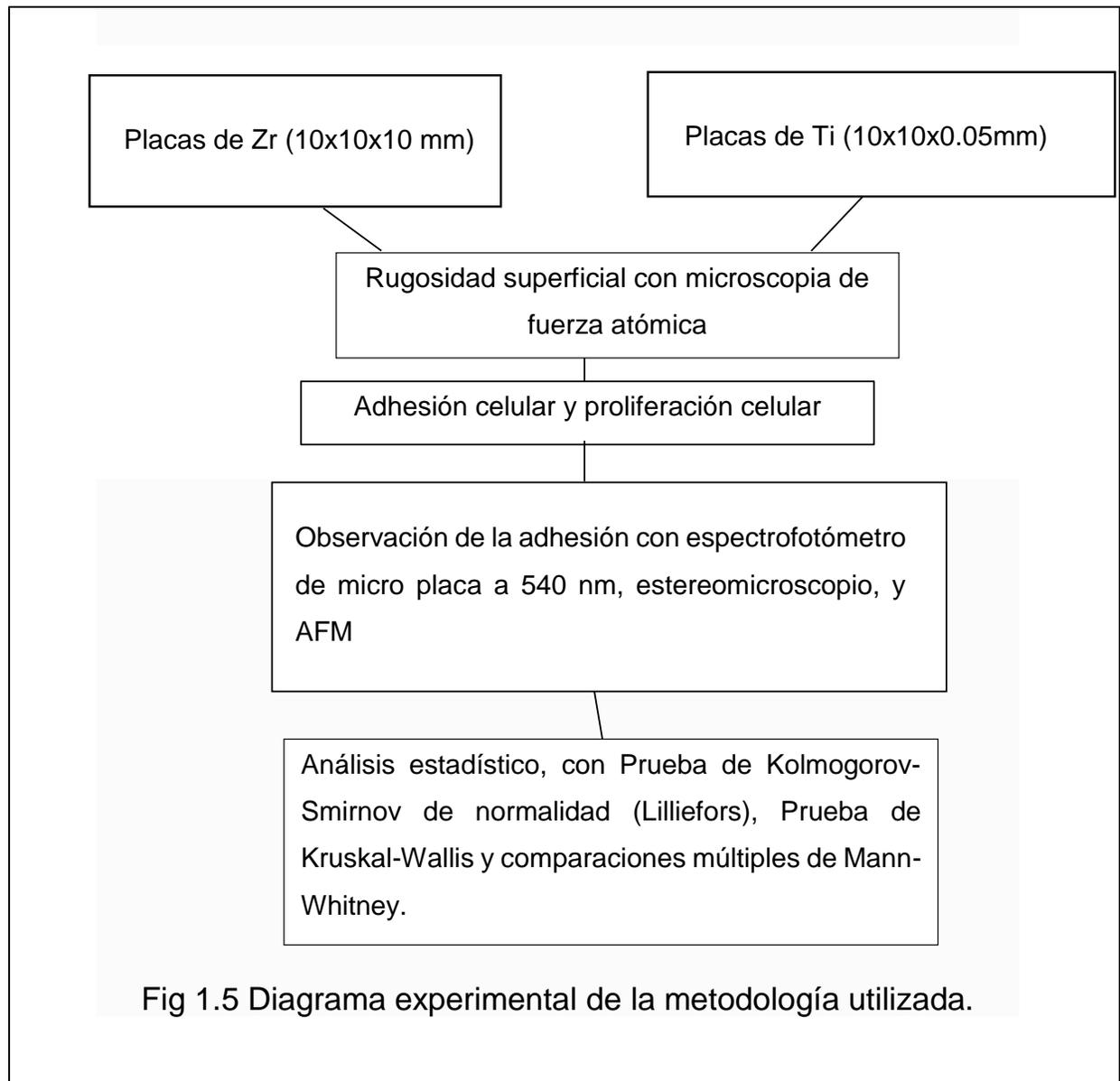


Fig 1.5 Diagrama experimental de la metodología utilizada.

11. Implicaciones éticas

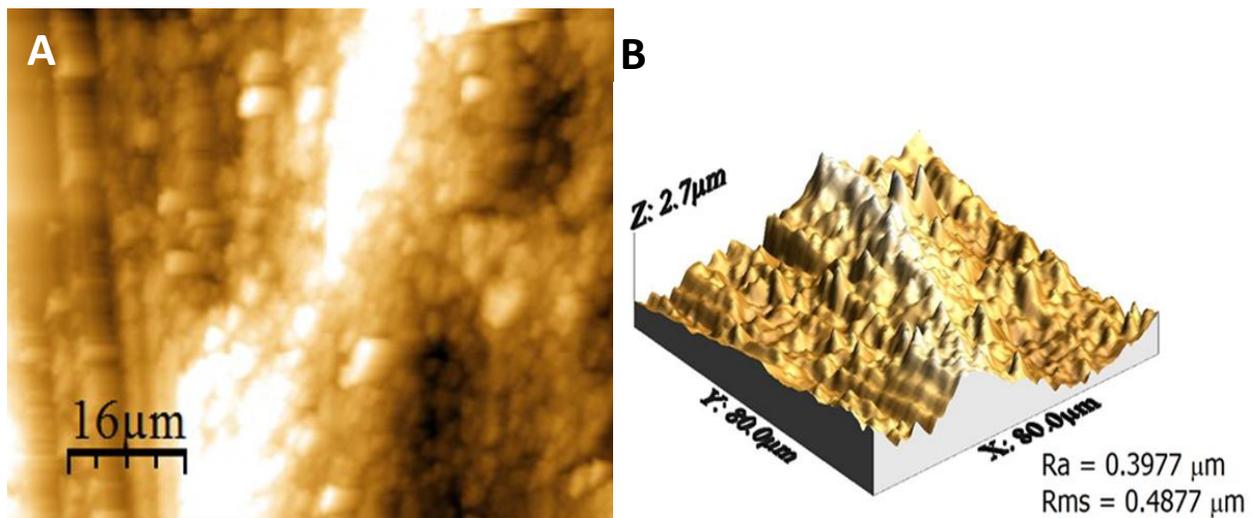
La Asociación Médica Mundial (AMM) ha promulgado la Declaración de Heilsinki como una propuesta de principios éticos para la investigación médica en seres humanos, incluida la investigación del material humano y de información identificables. ⁽⁶¹⁾

Instados en estos principios el protocolo de esta investigación fue basado y posteriormente realizado.

Al incluir material humano este protocolo de investigación se utilizó un consentimiento informado en el que el donador de tejido accedió a que este se utilizará con los fines propuestos en esta investigación.

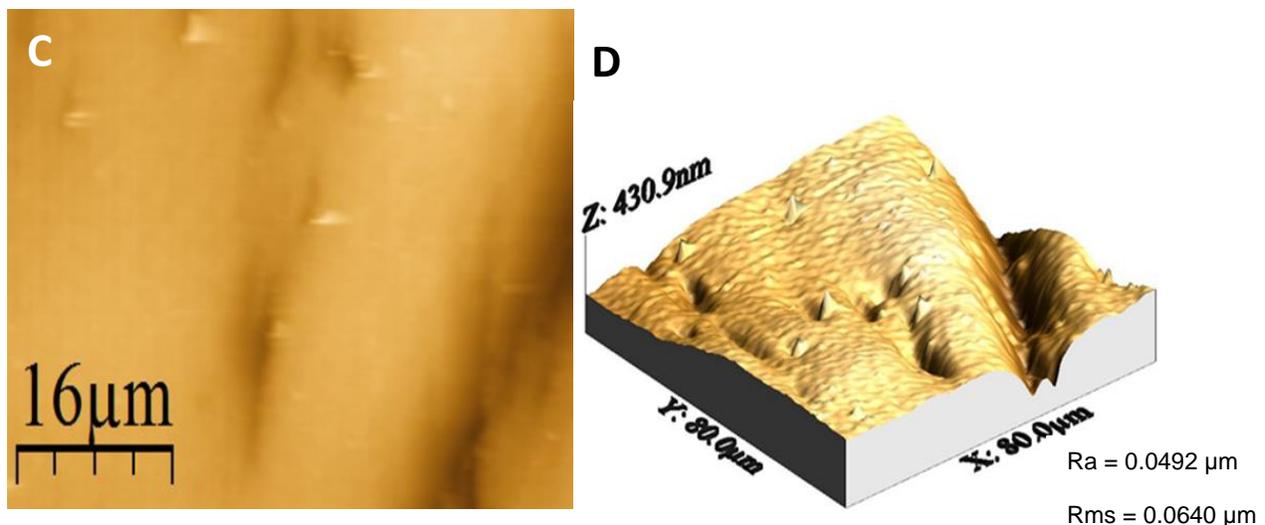
12. Resultados

La topografía de las placas de Zr mostró una mayor rugosidad ($R_a = 0,39$ micras) ($R_{ms} = 0,48$ micras) (Fig. 1.4) que el Ti ($R_a = 0,049$ micras) ($R_{ms} = 0,06$ micras) (Fig. 1.5). Las muestras de Ti exhiben una superficie casi plana con algunos rasguños y microsurcos al contrario las placas de Zr mostraron una superficie rugosa con una alta presencia de microporos.



[Fig. 1.6]. Micrográficas de fuerza atómica de la superficie de Zr en 2-D (A) y 3-D (B)

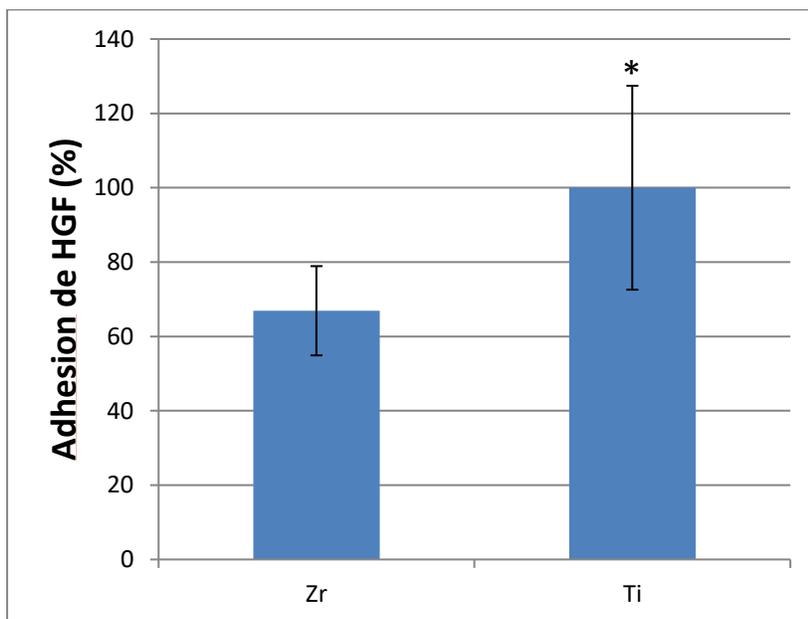
Fuente: Directa



[Fig. 1.7]. Micrografía de fuerza atómica de la superficie de Ti en 2-D (C) y 3-D (D)

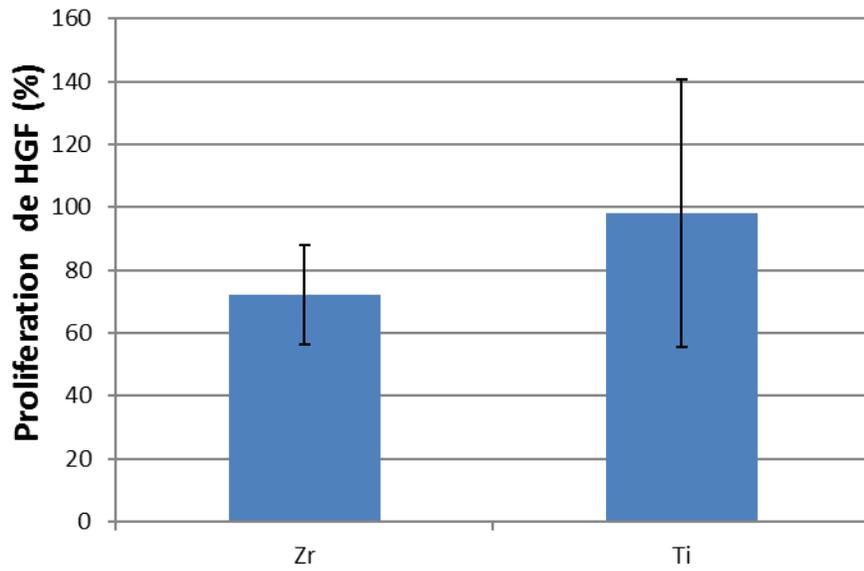
Fuente: Directa.

La cuantificación de los HGF adheridos fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en el Ti con 42% ($\pm 18,2\%$) más células adheridas que las muestras de Zr (Fig. 1.6), mientras que la proliferación mostró células más viables en Ti con un 37% ($\pm 27,4\%$) sin mostrar diferencias estadísticas en los dos grupos (Fig. 1.7).



[Fig. 1.6]. Grafica de adhesión de HGF (%) comparando muestras de Zr y Ti. Los valores de las superficies de Ti se usaron como control de valor. Las barras representan la media \pm desviación estándar en triplicado de tres experimentos independientes.

* $p < 0,05$ comparaciones múltiples de Mann-Whitney. Fuente: Directa.



[Fig. 1.7]. Grafica de proliferación de HGF (%) comparando muestras de Zr y Ti. Los valores de las superficies de Ti se usaron como control de valor. Las barras representan la media \pm desviación estándar en triplicado de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ comparaciones múltiples de Mann-Whitney. Fuente: Directa.

13. Discusión

La prevalencia de complicaciones biológicas asociadas con los implantes dentales aumenta con su uso y estas comúnmente comienzan por un defecto y/o ausencia del sello tejido suave peri-implantario. La búsqueda de soluciones a este problema ha despertado el interés de la comunidad odontológica y el uso del Zr ha sido propuesto como una solución.⁽⁶²⁾

Por lo tanto, diferentes autores han realizado estudios comparando las propiedades entre el Ti y el Zr, tales como N. Esfahanizadeh, *et al.*⁽⁴⁵⁾, A. Pae, *et al.*⁽⁴⁶⁾ y Yamano, *et al.*⁽⁴⁷⁾, analizaron la proliferación y viabilidad de los HGF sobre estas superficies, sin encontrar diferencias significativas entre los materiales; resultados que emulan a los nuestros.

B. Größner-Schreiber, *et al.*⁽⁶³⁾ analizaron la adhesión focal de HGF en superficies modificadas de implantes dentales de Ti y Zr, seleccionaron 17 diferentes tipos de modificaciones en la rugosidad de los implantes; incluyendo técnicas de pulido de superficies con diferentes tamaños de granos, de tipo espejo, con revestimiento de vidrio, etc. Los resultados apuntaron a que las superficies más lisas tenían el mayor número de contactos de adhesión focal.

En la cuestión acerca de que tipo de superficie en los materiales de implantes dentales promueven una mayor adhesión de HGF, es donde la bibliografía encontrada es controversial; ^(56,63,64) Yamano, *et al.*⁽⁴⁷⁾ en sus investigaciones identifican a las superficies lisas como un factor que promueve de una manera más rápida la adhesión de los HGF; en cambio las investigaciones de A. Pae, *et al.*⁽⁴⁶⁾ sugieren que al existir una mayor rugosidad en los materiales para implantes se incrementa la adhesión de HGF, por otra parte Esfahanizadeh *et al.*⁽⁴⁵⁾ exponen que no existen diferencias

estadísticamente significativas entre los tipos de superficies, estas últimas afirmaciones conciertan con los resultados de nuestra investigación.

El presente estudio es preliminar y por lo tanto son necesarias más pruebas para estudiar la correlación entre el tejido peri-implantario y la rugosidad superficial de los materiales de implantes dentales; estas incluyen ensayos con otras células de tipo peri-implantarias como células de ligamento periodontal, expresión genética y análisis de puntos de adhesión focal. Incluyendo las diversas formas de tratamiento que recibe el Zr al ser trabajado, en la actualidad existen en el mundo más de 10 compañías que manejan implantes de Zr, cada uno con sus propia metodología de producción.⁽⁶⁵⁾

Futuros ensayos deberían enfatizarse en la modificación de las superficies de los materiales en combinación con el uso de sustancias con propiedades de estimulación celular como P. Krawczyk, *et al.* Con el uso de Histanina 1.⁽⁶⁶⁾

14. Conclusiones

Incluso cuando Ti mostró una mejor adhesión inicialmente, después de 24 hrs las placas de Zr y Ti no mostraron diferencia en proliferación celular; lo que muestra respuestas biológicas comparables.

A pesar de las limitaciones del presente estudio, se concluye que al Zr puede proporcionar un sello biológico e inhibir el descenso epitelial con resultados no estéticos; serían necesarios más estudios para demostrar cuáles son las características de las superficies que influyen más en la adhesión de fibroblastos.

Pero se llega a la conclusión que es el tipo de superficie y no el tipo de material que hace una diferencia en la adhesión de HGF y por consecuente el sello de los tejidos periimplantarios.

15. Bibliografía

1. Wen B, Freilich M, Kuhn L. Bone Tissue Engineering Around Dental Implants. In: Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences [Internet]. 2015. p. 749–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397157-9.00059-X>
2. Anderson JM. Biological Responses To Materials. *Annu. Rev. Mater. Res.* [Internet]. 2001;81–110. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.matsci.31.1.81>.
3. Gómez-Florit M, Ramis JM, Xing R, Taxt-Lamolle S, Haugen HJ, Lyngstadaas SP, et al. Differential response of human gingival fibroblasts to titanium- and titanium-zirconium-modified surfaces. *J Periodontal Res* [Internet]. 2013;425–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23919718>
4. Rs AB. Tissue Response : Compromised Osseous tissue Biomaterials Dental implants Tissue response Osseous lesions. *Dent Clin NA* [Internet]. Elsevier Inc; 2015;59(2):305–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cden.2014.10.010>
5. Chug A, Shukla S, Mahesh L, Jadwani S. Osseointegration-Molecular events at the bone-implant interface: A review. *J Oral Maxillofac Surgery, Med Pathol* [Internet]. Elsevier Ltd.; 2013;25(1):1–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajoms.2012.01.008>
6. Wen B, Freilich M, Kuhn L. Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences [Internet]. *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*. Elsevier; 2015 [cited 2015 Aug 12]. 749-764 p. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012397157900059X>
7. He X, Hartlieb E, Rothmund L, Waschke J, Wu X, Van Landuyt KL, et al. Intracellular uptake and toxicity of three different Titanium particles. *Dent Mater* [Internet]. The Academy of Dental Materials; 2015;31(6):734–44. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0109564115001074>
8. Kwon Y-D, Choi H-J, Lee H, Lee J-W, Weber H-P, Pae A. Cellular viability and genetic expression of human gingival fibroblasts to zirconia with enamel matrix derivative (Emdogain®). *J Adv Prosthodont* [Internet]. 2014;6(5):406–14. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4211057&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
9. Pivodovaa V, Frankovaa J, Ulrichovaa J. Osteoblast and gingival fibroblast markers in dental implant studies. *Biomed Pap.* [Internet]. 2011;155(2):109–16. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21804619>
10. Rivera Rodas R. Historia de la implantología y la oseointegración, antes y después de Branemark. *Rev Estomatol Hered.* [Internet]. 2013;23(1):39–43. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=421539374008>
11. Pal TK. Fundamentals and history of implant dentistry. *J Int Clin Dent Res Organ* [serial online] 2015 [cited 2017 Sep 6];7, Suppl S1:6-12. Available from: <http://www.jicdro.org/text.asp?2015/7/3/6/172933>
12. Gonzalez Lagunas, Javier, Hueto JA. Manual básico de implantología [Internet]. segunda. Madrid: Ripano. Madrid; 2009. 289 p. Available from: <http://eds.a.ebscohost.com/eds/detail/detail?vid=4&sid=921cfead-8baa-488a->

a1d9-

9becffc29235%40sessionmgr4006&hid=4205&bdata=Jmxhbmc9ZXMmc2l0ZT1lZHMtbGl2ZQ%3D%3D#AN=lib.MX001001188059&db=cat02025a

13. Anusavice KJ. Phillips ciencia de los materiales dentales. 11a ed. Elsevier España, S.L.U. 2004. P; 764-781
14. López M. Tejidos mucosos peri-implantarios. Rev Estomatol Herediana [Internet]. 2004;14(1-2) : 89 - 94. Available from: <http://www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/REH/article/download/2020/2017>.
15. Guercio E, Dinatale E. Consideraciones estructurales y biológica en la oseointegración. Revisión de la literatura. Acta Odontol Venez. [Internet].2009;47(1):1–7. Available from: <https://www.actaodontologica.com/ediciones/2009/1/art-28/>
16. Rutkunas V, Bukelskiene V, Sabaliauskas V, Balciunas E, Malinauskas M, Baltrikiene D. Assessment of human gingival fibroblast interaction with dental implant abutment materials. J Mater Sci Mater Med [Internet]. Springer US; 2015;26(4). Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-015-5481-8>
17. Karp G. Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments. 7a edi. McGraw Hill: Gerald Karp; 2008. p.62–82.
18. Chai WL, Moharamzadeh K, van Noort R, Emanuelsson L, Palmquist A, Brook IM. Contour analysis of an implant-soft tissue interface. J Periodontal Res. [Internet]. 2013;48(5):663–70. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23442017>
19. Zafra Anta JA. Importancia de los parametros periodontales en el diagnostico precoz de la patologia periimplantaria [Internet]. Universidad de Complutense de Madrid; [cited 2016 Sep 21]. Available from: <http://biblioteca.ucm.es/tesis/19972000/D/0/D0132101.pdf>
20. Zafra Anta JA. Importancia de los parametros periodontales en el diagnostico precoz de la patologia periimplantaria.pdf [Internet]. [Madrid]: Universidad Complutense de Madrid; Available from: <http://biblioteca.ucm.es/tesis/19972000/D/0/D0132101.pdf>
21. Geetha M, Singh AK, Asokamani R, Gogia AK. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review. Prog Mater Sci [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;54(3):397–425. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmatsci.2008.06.004>
22. Bauer S, Schmuki P, von der Mark K, Park J. Engineering biocompatible implant surfaces. Part I: Materials and surfaces. Prog Mater Sci [Internet]. 2012;58(3):261–326. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmatsci.2012.09.001>
23. Wei He BR. Handbook of polymer applications in medicine and medical devices. 1st ed. Oxford: Kayvon Modjarrad y Sina Ebnesajjad; 2014. p. 55–76.
24. Chen Qizhi ATG. Metallic implants biomaterials 2. Elsevier, Mater Sci Eng R; [Internet]. 2014; 87: p. 1-57. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Qizhi_Chen4/publication/278394401_Metallic_implant_biomaterials/links/56c5a60008ae736e704908bf/Metallic-implant-

- [Internet]. 2009;(1987). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470744307.gat043>
38. Balls M, Boobis A. Methods in vitro toxicology. [Internet]. Food Chem Toxicol. 2002 Feb-Mar;40(2-3):193-236. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11893398>
 39. Arencibia DF, Alfredo L. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad.RETEL. [Internet].2003; 2(3):48-49. Available from: https://www.researchgate.net/publication/242644724_Principales_ensayos_para_determinar_la_citotoxicidad_de_una_sustancia_algunas_consideraciones_y_su_utilidad. Rev Toxicol [Internet]. 2016;
 40. Rompen E, Domken O, Degidi M, Pontes AEP, Piattelli A. The effect of material characteristics, of surface topography and of implant components and connections on soft tissue integration: A literature review. Clin Oral Implants Res.[Internet]. 2006;17(SUPPL. 2):55–67. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968382>
 41. Velasco-Ortega E, Alfonso-Rodríguez CA, Monsalve-Guil L, España-López A, Jiménez-Guerra A, Garzón I, et al. Relevant aspects in the surface properties in titanium dental implants for the cellular viability. Mater Sci Eng C [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;64:1–10. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493116302211>
 42. Maté Sanchez de Val JE, et al. Gehrke SA, et al. Peri-implant tissue behavior around non-titanium material: Experimental study in dogs. Ann Anat [Internet]. Elsevier GmbH.; 2016;206:104–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aanat.2016.03.005>
 43. Andreiotelli M, Wenz HJ, Kohal RJ. Are ceramic implants a viable alternative to titanium implants? A systematic literature review. Clin Oral Implants Res.[Internet]. 2009;20(SUPPL. 4):32–47. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19663947>
 44. Soon G, Pinguan-Murphy B, Lai KW, Akbar SA. Review of zirconia-based bioceramic: Surface modification and cellular response. Ceram Int [Internet]. 2016 [cited 2017 Apr 4];42(11):12543–55. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884216306836>
 45. Esfahanizadeh N, Motalebi S, Daneshparvar N, Akhoundi N, Bonakdar S. Morphology, proliferation, and gene expression of gingival fibroblasts on Laser-Lok, titanium, and zirconia surfaces. Lasers Med Sci [Internet]. 2016; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10103-016-1927-6>
 46. Pae A, Lee H, Kim H-S, Kwon Y-D, Woo Y-H. Attachment and growth behaviour of human gingival fibroblasts on titanium and zirconia ceramic surfaces. Biomed Mater [Internet]. 2009;4(2):25005. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19208938>
 47. Yamano S, Ma AK-Y, Shanti RM, Kim S, Wada K, Sukotjo C. The influence of different implant materials on human gingival fibroblast morphology, proliferation, and gene expression. Int J Oral Maxillofac Implants [Internet]. 2011;26(6):1247–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22167430>
 48. HAN A, Tsoi KH, Rodrigues FP, Leprince JG, Palin WM. Bacterial adhesion

- mechanisms on dental implant surfaces. *Int. J. Adhes. Adhes.* [Internet]. 2016;69:58-71. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143749616300707>
49. Myshin HL, Wiens JP. Factors affecting soft tissue around dental implants: a review of the literature. *J Prosthet Dent.*[Internet]. 2005;94(May 2004):440–4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16275304>
 50. Small PN, Tarnow DP. Gingival recession around implants: a 1-year longitudinal prospective study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* [Internet]. 2000;15(4):527–32. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10960986>
 51. Gaviria L, Salcido JP, Guda T, Ong JL. Current trends in dental implants. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2014;40(2):50–60. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4028797&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 52. Succaria F, Morgano SM. Prescribing a dental ceramic material: Zirconia vs lithium- disilicate. *Saudi Dent J* [Internet]. King Saud University; 2011;23(4):165–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sdentj.2011.10.001>
 53. Sanon C, Chevalier J, Douillard T, Cattani-lorente M, Scherrer SS, Gremillard L. A new testing protocol for zirconia dental implants. *Dent Mater* [Internet]. The Academy of Dental Materials; 2014;31(1):15–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2014.09.002>
 54. Santos GB, Miguel Ó, Morales R. Management consierations of dental implants At the Aesthetic Zone. *Rev Fac Odontol Univ Antioquia.*[Internet]. 2009;20(2):191–204. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-246X2009000100010
 55. Dunn DB. The use of a zirconia custom implant- supported fixed partial denture prosthesis to treat implant failure in the anterior maxilla: A clinical report. *J Prosthet Dent* [Internet]. The Editorial Council of the Journal of Prosthetic Dentistry; 2008;100(6):415–21. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3913\(08\)00149-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3913(08)00149-2)
 56. Sennerby L, Dasmah A, Larsson B, Iverhed M. Bone Tissue Responses to Surface-Modified Zirconia Implants: A Histomorphometric and Removal Torque Study in the Rabbit. *Clin Implant Dent Relat Res.* [Internet]. 2005;7(1):13–20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16137083>
 57. Apratim A, Eachempati P, Krishnappa Salian K, Singh V, Chhabra S, Shah S. Zirconia in dental implantology: A review. *J Int Soc Prev Community Dent* [Internet]. 2015;5(3):147. Available from: <http://www.jispcd.org/text.asp?2015/5/3/147/158014>
 58. Harada K, Dds AS, Dds DY. Effect of loading conditions on the fracture toughness of zirconia. *J Prosthodont Res* [Internet]. Japan Prosthodontic Society; 2013;57(2):82–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpor.2013.01.005>
 59. Kim Y-S, Ko Y, Kye S-B, Yang S-M. Human gingival fibroblast (HGF-1) attachment and proliferation on several abutment materials with various colors. *Int J Oral Maxillofac Implants* [Internet]. 2014;29(4):969–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24914814>

60. Contreras RG, Adachi K, Yokote Y, Sakagami H, Hibino Y, Nakajima H, et al. Quantification of enhanced osteoblastic adhesion to ultraviolet-treated titanium plate. *In Vivo*. [Internet] 2010;24(4):519–23. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20668319>
61. de la Luz Casas M. M. Declaración de Helsinki: reflexiones y propuestas para su renovación. *Bioeth Updat* [Internet]. 2016;2(1):47–61. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2395938X16300080>
62. Piconi C, Maccauro G. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials* [Internet]. 1999 Jan [cited 2017 Apr 4];20(1):1–25. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961298000106>
63. Größner-Schreiber B, Herzog M, Hedderich J, Dück A, Hannig M, Griepentrog M. Focal adhesion contact formation by fibroblasts cultured on surface-modified dental implants: An in vitro study. *Clin Oral Implants Res*. [Internet]. 2006;17(6):736–45. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17092235>
64. Heinemann F, Hasan I, Bourauel C, Biffar R, Mundt T. Bone stability around dental implants: Treatment related factors. *Ann Anat* [Internet]. Elsevier GmbH.; 2015;199:3–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aanat.2015.02.004>
65. Sanon C, Chevalier J, Douillard T, Cattani-Lorente M, Scherrer SS, Gremillard L. A new testing protocol for zirconia dental implants. *Dent Mater* [Internet]. 2015 [cited 2017 Apr 4];31(1):15–25. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0109564114006137>
66. Krawczyk PM, Bolscher JGM, Veerman ECI, Stap J. Histatin 1 Enhances Cell Adhesion to Titanium in an Implant Integration Model. *Journal of Dental Research*. [Internet]. 2017;96(4) 430 –436. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0022034516681761>

16. Anexos

Anexo 1: Publicación de un artículo original.

Journal
of Oral
Research



ORIGINAL ARTICLE

Araceli Meza-Rodríguez¹.
Omar Martínez-Álvarez².
Laura Acosta-Torres¹.
Javier de la Fuente-Hernández³.
René García-Contreras¹.

1. Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria, Escuela Nacional de Estudios Superiores, Universidad Nacional de México, León, México.
2. Universidad Politécnica de Guanajuato, Cortázar, México.
3. Área de Salud Pública Bucal, Escuela Nacional de Estudios Superiores, Universidad Nacional de México, León, México.

Corresponding author: René García-Contreras. Blvd. UNAM 2011, Predio el Saucillo y el Potrero Comunidad de los Tepetates León, Gto. C.P.37684. Phone: (01-477) 1940800. Ext. 43414; E-mail: dentist.garcia@gmail.com

Receipt: 06/14/2016 **Revised:** 07/09/2016
Acceptance: 07/26/2016 **Online:** 07/26/2016

Fibroblast response to initial attachment and proliferation on titanium and zirconium surfaces.

Abstract: Introduction: In recent decades, dental implants have become one of the best options for comprehensive dental restoration; their placement is a multidisciplinary task that requires a solid understanding of biological, periodontal, surgical and prosthetic principles. Objective: The aim of this study was to quantify *in vitro* the adhesion and proliferation of human gingival fibroblasts (HGF) response on titanium (Ti) and zirconia (Zr) surfaces. Methodology: Samples of Ti and Zr were observed under atomic force microscopy (AFM). HGFs were inoculated in each sample to determine adhesion and cell proliferation. The reagent MTT was mixed with medium DMEM and inoculated in each plate; formazan was dissolved with dimethyl sulfoxide and analyzed at 540nm in a microplate spectrophotometer. The test was performed with three independent experiments. Data were analyzed with Kolmogorov-Smirnov tests (Lilliefors), Kruskal-Wallis tests and Mann-Whitney test comparisons. Results: Topography of the Zr plates showed greater roughness (Ra= 0.39µm) than Ti (Ra= 0.049µm). Quantification of HGF adhesion was significantly higher (p<0.05) in Ti, while proliferation showed no statistically significant differences between the groups. Conclusion: It is noteworthy that, even though Ti initially showed increased cell adhesion on the surface, after 24h Zr samples showed similar proliferation; this demonstrates that both surfaces have a comparable biological response.

Keywords: Dental implants, Titanium, Zirconium, Biomaterials, Human gingival fibroblasts.

DOI: 10.17126/joralres.2016.043.

Cite as: Meza-Rodríguez A, Martínez-Álvarez O, Acosta-Torres L, de la Fuente-Hernández J & García-Contreras R. Fibroblast response to initial attachment and proliferation on titanium and zirconium surfaces. *J Oral Res* 2016; 5(5): 194-199.

INTRODUCTION.

In recent decades, dental implants have become one of the best options for comprehensive dental restoration in patients with partial or total prosthesis. Dental implants may help patients obtain a complete, healthy, functional and aesthetic dentition¹. Implant placement is a complex, multidisciplinary task involving various disciplines and requiring a deep knowledge of periodontics, surgery and prosthetics².

The successful placement of a dental implant is determined by the environment of the oral cavity and the response of adjacent tissues. The success of an implant is directly related

to bone formation around it (osseointegration), in order to direct the forces of mastication to the bone structure¹; soft tissue integration to provide a biological seal between the oral cavity and the implant² and the appropriate biocompatibility of the tissue at systemic and local level³. As soon as an implant is placed in the appropriate site, there is a molecular interaction covering the implant in just nanoseconds. This is primarily influenced by the implant surface³, which also determines the type of coating and rehabilitation procedures⁴.

Anderson defined the term biocompatibility as the ability of a biomaterial, prosthesis or medical device to perform

a specific function, with an appropriate host response. The evaluation of biological responses is measured by the magnitude and duration of adverse alterations in homeostatic mechanisms that determine the host response⁵.

Biomaterials commonly used for dental implants are manufactured from metal (titanium and its variants) and ceramic materials covered by porcelain (aluminum and zirconium oxide)⁶. Ti is widely used because it has proven to be a biocompatible and bio-inert material, stable and very well tolerated by soft tissues⁷. Although Ti implants have been used as the gold standard in the past 40 years, cell adhesion to this type of material is not always strong, and new formulations and modifications of the surfaces are developed to enhance cell attachment to the implant and accelerate osseointegration⁸.

In response to the above, the use of dental implants based on Zr represents a new frontier in implantology. Ceramic implants have been successfully used in orthopedic surgeries for many years because their biocompatibility tests have yielded positive results, while carcinogenicity and mutagenicity tests have shown negative results. Zr can provide an aesthetic advantage and result in less biofilm accumulation on the surface of the implant⁹. However, due to the lack of information on their performance in the short and long term¹⁰, Zr implants have not been widely used as Ti ones.

The hypothesis proposed in this study is based on the fact that a Zr surface can provide adhesion and proliferation for human gingival fibroblasts (HGF) equal to or greater than a Ti surface¹¹, and therefore show more scientific evidence on the adhesion of fibroblast to Zr surfaces.

The aim of this study was to quantify *in vitro* the adhesion and proliferation of HGF response on Ti and Zr surfaces with a fast and reproducible colorimetric method using MTT bromide salt.

MATERIALS AND METHODS.

Materials

Minimum essential alpha culture medium (α -MEM) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Carlsbad, CA,

USA), fetal bovine serum (FBS, Sigma culture Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), phosphate-buffered saline (PBS, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), penicillin G and streptomycin sulfate (Gibco, Carlsbad, CA, USA), type 1 titanium (99.5% purity) (Tokuriki Melters, Tokyo, Japan) and zirconium (Zirkonzahn, An der Ahr, Gais, Germany). 0.25% trypsin-EDTA 0.025% -2Na (Gibco, Carlsbad, CA, USA). MTT reagent (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), dimethyl sulfoxide (DMSO, JT Baker, Center Valley, PA, USA), 10-cm culture dishes and 96-well plates (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Preparation of Ti samples

Type 1 Ti plates of 10x10x0.5mm (n=3) were prepared. Samples were placed in epoxy resin and polished automatically at 160-200 rpm (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) with water sandpaper of different roughness, # 400, 800, 1000, 1500 and 2000 (Fujistar, Sankyo, Rikagaku, Okegawa, Japan) and diamond suspension from 0.05 to 1 μ m with a cloth (Chemomet, Buehler, Lake Bluff, IL, USA). Samples were removed from the epoxy resin and washed in ultrasound with distilled water, 99.5% ethanol and 99.5% acetone for 10 minutes and dried at room temperature.

Preparation of Zr samples

Zr plates of 10x10x10mm (n=3) were prepared. Samples were sintered in a conventional manner in a furnace at 2822°F for 6 hours and then the temperature was gradually decreased for 3 hours. Then plates were cut, polished and sandblasted. All Ti and Zr plates were reused for each experiment after being re-polished, ultrasonic washed and sterilized.

Observation of samples by AFM

Ti and Zr surfaces were evaluated using atomic force microscopy (NANOSURF FlexAFM, Liestal, Switzerland). The surface roughness was estimated based on Ra (arithmetic mean of the absolute values of the coordinates of the points of the roughness profile in relation to the midline within the length measurement) and Rms (the largest partial roughness present on the measuring

surface) on a surface of 80x80µm in tapping mode based on ISO 4287:1997: Geometrical Products Specifications (GPS)-Surface texture: Profile method.

Cell culture

The human gingival fibroblasts (HGF) were obtained from gingival tissue biopsy of a third molar of an 18-year-old patient, with prior approval and after signing informed consent. The project was authorized by the Committee on Bioethics at ENES, Unit Leon, National Autonomous University of Mexico. The tissue was stored in PBS and 2% antibiotic. The sample was washed twice with PBS and 2% chlorhexidine. The primary cell culture was performed using explants of 1x1mm approximately. The tissue was suspended in α -MEM medium supplemented with 20% FBS, heat inactivated, 100IU/ml penicillin G and 100mg/ml streptomycin sulfate. Cells were incubated at 37°C with an atmosphere of 5% CO₂ and 95% humidity for two weeks changing the culture medium every third day until exponential growth was observed. HGFs have an *in vitro* life expectancy of approximately 40 PDL (population doubling level).

The cells were detached enzymatically from the culture dish with 0.25% trypsin-EDTA 0.025% -2Na for each experiment. After the primary cell culture was established, the experiments were carried out using DMEM+10% FBS

and antibiotics¹².

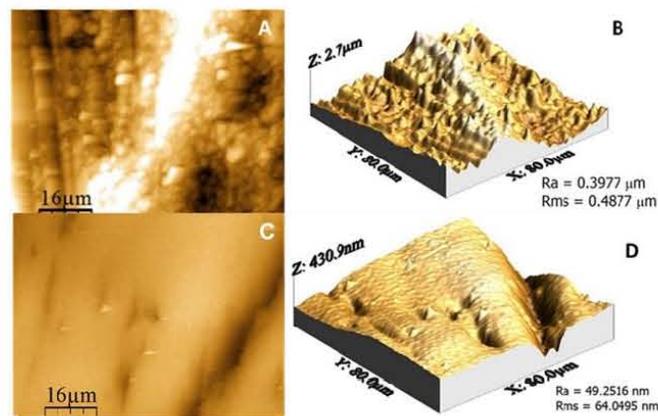
Adhesion assay and cell proliferation.

Cells were inoculated at a density of 2x10⁶ cells/ml in each of the Ti and Zr samples and incubated at room temperature (23°C) for 60 minutes¹². Samples were washed twice with PBS to remove nonadherent cells. In the case of cell proliferation, cells were incubated for 24 hours more at 37°C with 5% CO₂. The number of viable cells attached and proliferated on the surfaces was determined by MTT method. Subsequently, 0.2mg/ml of MTT reagent was mixed in DMEM +10% FBS and incubated for 3 hours at 37°C with 5% CO₂. Formazan was completely dissolved with DMSO, transported to a 96-well plate and analyzed at 540nm in a microplate reader (Thermo Fisher Scientific, St. Louis, Missouri, USA). In cell adhesion and proliferation Ti plates were used as control value. Assays were performed in triplicate from three independent experiments.

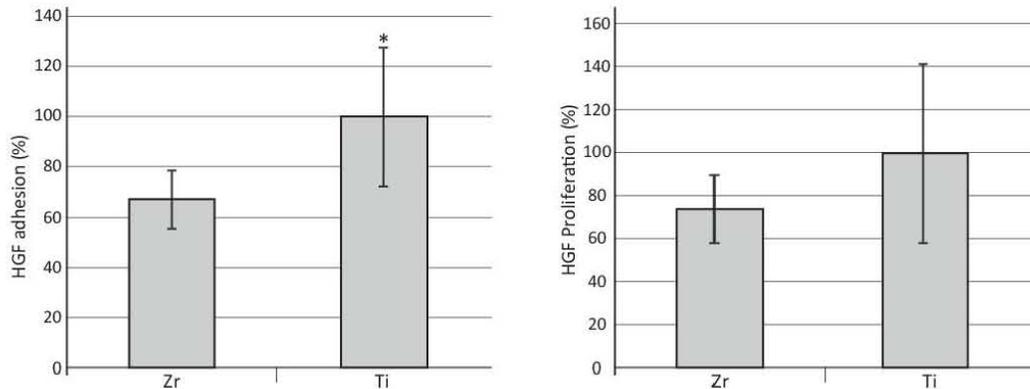
Statistic analysis

The mean, standard deviation and percentage were calculated. All data were tested with Kolmogorov-Smirnov tests of normality (Lilliefors), Kruskal-Wallis test, and multiple comparisons using Mann-Whitney (SPSS, Chicago, IL, USA). Statistical significance was considered at p<0.05 and a 95% confidence interval.

Figure 1. Micrographs of atomic force microscopy.



A) 2-D Zr, B) 3-D Zr, C) 2-D Ti and D) 3-D Ti.

Figure 2. HGF adhesion and proliferation on Ti and Zr.

A) HGF Adhesion B) HGF Proliferation. Fibroblasts were inoculated at 2×10^6 cells/ml. Viable cells adhered and proliferated and were determined by MTT bioassay and analyzed at 540nm by microplate spectrophotometer. The values of Ti surfaces were used as value control. Bars represent the mean \pm standard deviation in triplicate of three independent experiments. * $p < 0.05$ multiple Mann-Whitney comparisons.

RESULTS.

Topography of the Zr plates showed a higher roughness ($R_a = 0.39 \mu\text{m}$) (Fig. 1A and 1B) than Ti ($R_a = 0.049 \mu\text{m}$) (Fig. 1C and 1D). Ti samples showed an almost flat surface with some sipes and micropores, in contrast, Zr plates showed a roughened surface with a high presence of micropores.

Quantification of HGF adhesion was significantly higher ($p < 0.05$) in the Ti with 42% ($\pm 18.2\%$) more when compared to adherent cells in Zr samples (Fig. 2A), while the proliferation revealed a greater number of cells on the surfaces of Ti with 37% ($\pm 27.4\%$) showing no statistical differences (Fig. 2B), having a similar biological response between both surfaces.

DISCUSSION.

The aim of modifying the surfaces of the implants is not only to adapt them to the demands to avoid the negative effects of implanted materials into the surrounding tissue, but to improve the interaction between the material and tissues¹³. The use of current technologies that modify the surface of the implants has become a trend in

marketing and production of new implants, creating different morphologies and chemical treatments to improve and accelerate osseointegration¹⁴.

For a long time, osseointegration was identified as a local factor that could interfere with the success of dental implants. Now, it is known that not only the osseointegration of dental implants contributes to the integration of the adjacent tissues, but also of the soft tissues adjacent to the implant¹¹.

Long-term stability of dental implants, the biological seal of soft tissues and implant interface are important features for the clinical success of oral rehabilitation. The transmucosal part of the dental implant requires sufficient attachment of connective tissue and inhibition of bacterial invasion¹⁵. Conventionally, surfaces in contact with soft tissues, particularly the abutment, are designed with smooth surfaces to prevent bacteria from adhering easily¹⁶.

The aim of this research was to quantify *in vitro* the HGF response on Ti and Zr surfaces by cell adhesion and proliferation. The results shown here indicate that initially Ti surfaces significantly increase HGF adhesion by 42%, while cell proliferation, comparing both surfaces showed

no difference in the number of proliferated cells, suggesting that the biological response in both surfaces after 24 hours can yield similar and comparable results. The type of material with which dental implants are manufactured is critical to their success, also the topography of the implant surface influences integration¹⁴ qualitatively and quantitatively¹⁴.

However, the review of the current literature showed partly contradictory results. Yamano *et al.*¹⁷ identified the topography of the surfaces as an important modulator of fibroblast behavior, both *in vitro* and *in vivo*, demonstrating that smooth Zr surfaces promote more adhesion and proliferation of fibroblasts. The difference between their results and this research could be caused by the polishing of the surfaces. Furthermore, Pae *et al.*¹⁶ suggest that microporosity allows greater diffusion and alignment of fibroblasts, when compared to the smooth surface. The controversy lies not only in the topography of the Zr surfaces. Velasco-Ortega *et al.*⁸ found that osteoblastic cells cultured on rougher Ti surfaces differ faster than on smoother surfaces, however, Xiaohui Rausch-fan *et al.*¹¹ suggested that the smoothest surfaces are the ideal surfaces for better adhesion and cell proliferation. Furthermore, Esfahanizadeh *et al.*¹⁸ showed that the difference

between the adhesion on Zr and Ti surfaces is not significant, which is line with the findings of this study.

The method reported here is an easy and reproducible technique for the study of the interaction between Ti and Zr cells and surfaces. The method of rapid colorimetry by MTT is based on the identification of the metabolic activity of the cells adhered and proliferated on the surface. The results shown in this study are more representative than those previously published by direct counting with scanning electron microscopy¹⁹ or enzymatic detachment with trypsin and ultrasonic vibration²⁰. Such methods may underestimate the number of cells adhered and proliferated to surfaces. However, this study is preliminary and it is necessary to investigate the kinetics of the interaction, the specific morphological and functional relationship of the cells on surfaces, as well as controlling the expression of different genes associated with cell adhesion and proliferation, such as integrin expression on surfaces.

CONCLUSION.

Although initially Ti showed increased cell adhesion on the surface after 24h, Zr samples showed a similar proliferation. Therefore, both surfaces have comparable biological response.

Respuesta de fibroblastos a la adhesión inicial y proliferación en superficies de titanio y zirconio.

Resumen: Introducción: En las últimas décadas, los implantes dentales se han posicionado como una de las mejores opciones de restauración dental integral; su colocación es una tarea multidisciplinaria que requiere una sólida comprensión de los principios biológicos, periodontales, quirúrgicos y protésicos. Objetivo: El objetivo de este estudio fue cuantificar *in vitro* la adhesión y proliferación de la respuesta de fibroblastos gingivales humanos (HGF) en superficies de titanio (Ti) en contraste con superficies de zirconia (Zr). Metodología: Se observaron las muestras de Ti y Zr bajo microscopía de fuerza atómica (AFM). Los HGF fueron inoculados en cada muestra para determinar la adhesión y proliferación celular. El reactivo MTT se mezcló con medio DMEM y se inoculó en cada placa, el formazán se disolvió con dimetilsulfóxido y se analizó a 540nm en un espectrofotóme-

tro de microplaca. El ensayo se realizó con tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados con pruebas de Kolmogorov-Smirnov (Lilliefors), pruebas de Kruskal-Wallis y comparaciones de Mann-Whitney. Resultados: La topografía de las placas de Zr mostraron una mayor rugosidad (Ra=0.39µm) en comparación con las de Ti (Ra=0.049µm). La cuantificación de la adhesión de HGF fue significativamente mayor (p<0.05) en el Ti, mientras que la proliferación no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Conclusión: Es importante mencionar que, a pesar de que el Ti mostró inicialmente una mayor adhesión celular sobre la superficie, después de 24 hrs las muestras de Zr mostraron una proliferación similar; lo que demuestra que ambas superficies poseen una respuesta biológica comparable.

Palabras clave: *Implantes dentales, Titanio, Zirconia, Biomateriales, Fibroblastos gingivales humanos.*

REFERENCES.

1. Vishwakarma A, Sharpe P, Shi S, Ramalingam M. *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*. 1st Ed. London: Elsevier Ltd; 2015.
2. Anderson JM. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Res*. 2001;31:81-110.
3. Gómez-Florit M, Ramis JM, Xing R, Taxt-Lamolle S, Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Monjo M. Differential response of human gingival fibroblasts to titanium- and titanium-zirconium-modified surfaces. *J Periodontol Res*. 2014;49(4):425-36.
4. Chug A, Shukla S, Mahesh L, Jadwani S. Osseointegration—Molecular events at the bone-implant interface. *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol*. 2013;25(1):1-4.
5. Babu RSA, Ogle O. Tissue response: biomaterials, dental implants, and compromised osseous tissue. *Dent Clin North Am*. 2015;59(2):305-15.
6. Lee TJ, Ueno T, Nomura N, Wakabayashi N, Hanawa T. Titanium-Zirconium Binary Alloy as Dental Implant Material: Analysis of the Influence of Compositional Change on Mechanical Properties and In Vitro Biologic Response. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2016;31(3):547-54.
7. Fage SW, Muris J, Jakobsen SS, Thysen JP. Titanium: a review on exposure, release, penetration, allergy, epidemiology, and clinical reactivity. *Contact Dermatitis*. 2016;74(6):323-45.
8. Velasco-Ortega E, Alfonso-Rodríguez CA, Monsalve-Guil L, España-López A, Jiménez-Guerra A, Garzón I, Alaminos M, Gil FJ. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;64:1-10.
9. Möller B, Terheyden H, Açil Y, Purcz NM, Hertrampf K, Tabakov A, Behrens E, Wiltfang J. A comparison of biocompatibility and osseointegration of ceramic and titanium implants: an in vivo and in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012;41(5):638-45.
10. Altuna P, Lucas-Taulé E, Gargallo-Albiol J, Figueras-Álvarez O, Hernández-Alfaro F, Nart J. Clinical evidence on titanium-zirconium dental implants: a systematic review and meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2016;45(7):842-50.
11. An N, Rausch-fan X, Wieland M, Matejka M, Andrukhov O, Schedle A. Initial attachment, subsequent cell proliferation/viability and gene expression of epithelial cells related to attachment and wound healing in response to different titanium surfaces. *Dent Mater*. 2012;28(12):1207-14.
12. Contreras RG, Adachi K, Yokote Y, Sakagami H, Hibino Y, Nakajima H, Shimada J. Quantification of enhanced osteoblastic adhesion to ultraviolet-treated titanium plate. *In Vivo*. 2010;24(4):519-23.
13. Bauer S, Schmuki S, Von Der Mark K, Park J. Engineering biocompatible implant surfaces: Part I: Materials and surfaces. *Prog Mater Sci*. 2013;58(3):261-326.
14. Anil S, Anand PS, Alghamdi H, Jansen JA. Dental implant surface enhancement and osseointegration. *Implant Dentistry: A Rapidly Evolving Practice*. New York: InTech; 2011. pp. 83-108.
15. Kwon D, Choi HJ, Lee H, Lee JW, Weber HP, Pae A. Cellular viability and genetic expression of human gingival fibroblasts to zirconia with enamel matrix derivative (Emdogain®). *J Adv Prosthodont*. 2014;6(5):406-14.
16. Pae A, Lee H, Kim HS, Kwon YD, Woo YH. Attachment and growth behaviour of human gingival fibroblasts on titanium and zirconia ceramic surfaces. *Bio-med Mater*. 2009;4(2):025005.
17. Yamano S, Ma AK, Shanti RM, Kim SW, Wada K, Sukotjo C. The influence of different implant materials on human gingival fibroblast morphology, proliferation, and gene expression. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2011;26(6):1247-55.
18. Esfahanizadeh N, Motalebi S, Daneshparvar N, Akhondi N, Bonakdar S. Morphology, proliferation, and gene expression of gingival fibroblasts on Laser-Lok, titanium, and zirconia surfaces. *Lasers Med Sci*. 2016;31(5):863-73.
19. Ueno T, Yamada M, Suzuki T, Minamikawa H, Sato N, Hori N, Takeuchi K, Hattori M, Ogawa T. Enhancement of bone-titanium integration profile with UV-photofunctionalized titanium in a gap healing model. *Biomaterials*. 2010;31(7):1546-57.
20. Iwasa F, Hori N, Ueno T, Minamikawa H, Yamada M, Ogawa T. Enhancement of osteoblast adhesion to UV-photofunctionalized titanium via an electrostatic mechanism. *Biomaterials*. 2010;31(10):2717-27.

Anexo 2: Participación académica con una presentación oral, en el Precongreso ENES Unidad León, UNAM, en el marco de la Expo Aric Dental 2016.

 **Universidad Nacional Autónoma de México**
Escuela Nacional de Estudios Superiores
Unidad León 

Otorga la presente

Constancia

A: Araceli Meza-Rodríguez

Coautores: Omar Martínez-Álvarez
Laura Acosta-Torres
Javier de la fuente-Hernández.
René García-Contreras

Por su participación académica con la presentación oral titulada:

Respuesta de fibroblastos sobre superficies de titanio vs superficies de zirconio

en el:

PRE-CONGRESO ENES UNAM Unidad León,
en el marco de Expo Aric Dental 2016

12 de octubre de 2016
Guadalajara, Jalisco.

"Por mi raza hablará el espíritu"


Mtro. Javier de la Fuente Hernández
Director


EDUCACIÓN CONTINUA
U N A M


Mtra. Gabriela Vilar Pineda
Jefe de División de Educación Continua e
Intercambio Académico

Prohibido alterar este documento. © División de Educación Continua e Intercambio Académico, ENES UNAM.

Pre- Congreso EXPO Aric 2016 ENES UNAM, Unidad León
ID: ENEconC2Od005
P-104 www.enes.unam.mx

Anexo 3: Participación académica con una presentación de cartel en el XIII encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia.



The certificate features a light green and white background with a watercolor-style splash in the upper right. In the top left corner is the logo for the XIII Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia, which consists of a stylized blue and white circular emblem. In the top right corner is the logo for the Centro de Investigaciones en Óptica, A.C., featuring a stylized blue and white 'CIO' with a sunburst effect. The central text is written in a mix of serif and sans-serif fonts, with 'Reconocimiento' in a large, elegant script. Below the title, the names of the recipients are listed in bold, followed by the title of their work. At the bottom, there are two signatures with their respective names and titles, and a portrait of Helia Brao on the right side.

XIII encuentro
Participación de la
Mujer
en la
Ciencia

**CENTRO DE INVESTIGACIONES
EN ÓPTICA, A.C.**

Otorga el presente
Reconocimiento
por su valiosa participación a:

Meza Rodríguez Araceli, García Contreras René y Martínez Alvarez Omar

Por el trabajo:
**RESPUESTA DE FIBROBLASTOS SOBRE SUPERFICIES DE TITANIO VS SUPERFICIES
DE ZIRCONIO**

Cristina E. Solano Sosa
Cristina E. Solano Sosa
Representante del Comité Organizador

E. Delafosca
Dr. Elder de la Rosa Cruz
Director General del CIO

Helia Brao
Representante



La Academia Nacional de Medicina de México, A.C.

otorga la presente

CONSTANCIA

a: **ARACELI MEZA RODRÍGUEZ**

Por su participación en el XLIV Congreso Nacional

“Temas de Controversia en Salud”

León, Guanajuato, del 05 al 07 de octubre de 2016

Dr. Enrique Graue Wiechers
Presidente
Academia Nacional de Medicina

Dr. Fabio Salamanca Gómez
Secretario General
Academia Nacional de Medicina

