



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD LEÓN**

TÍTULO:

**“Efectos del recubrimiento de NPs de TiO₂ sobre placas de titanio
e irradiación UV para la adhesión de fibroblastos”**

FORMA DE TITULACIÓN:

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN ODONTOLOGÍA

P R E S E N T A:

ORNELAS PONCE ADRIANA



TUTOR: Dr. René García Contreras

ASESOR: Dr. Julio César Amezcua Romero

LEON, GTO. 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

Contenido

1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN	8
3. MARCO TEÓRICO	13
3.1 Titanio	14
3.1.1 Propiedades físicas.....	14
3.1.2 Características mecánicas.....	15
3.1.3 Características químicas	15
3.1.4 Titanio y toxicidad	16
3.1.5 Biocompatibilidad del material	16
3.2 Dióxido de titanio (TiO ₂).....	16
3.3 Uso del Titanio en odontología	17
3.4 Esterilización de superficies de Ti con luz ultravioleta.....	18
3.5 Fotocatálisis del titanio por luz ultravioleta.....	18
3.6 Determinación de citotoxicidad mediante MTT (DIMETILTIAZOL)	21
4. ANTECEDENTES	22
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
6. JUSTIFICACIÓN.....	28
7. OBJETIVOS	30
8. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	32
9. HIPÓTESIS	34
10. METODOLOGÍA	37
10.1 Tipo de estudio.....	38
10.2 Diseño de la investigación.....	38
10.3 Universo de trabajo.....	38
10.4 Tamaño de muestra	38
10.5 Criterios de selección	38
10.6 Operacionalización de variables	39
10.7 Instrumento de investigación	41
10.8 Desarrollo del proyecto: Materiales y Metodología	41
10.9 Observación en AFM	45
10.10 Análisis estadístico.....	45
11. IMPLICACIONES BIOÉTICAS	47
12. RESULTADOS	51
13. DISCUSIÓN.....	56
14. CONCLUSIONES.....	61
15. BIBLIOGRAFÍA.....	64
16. ANEXOS	70

Dedicatorias

A Dios

Por haberme permitido llegar hasta este momento y haberme dado salud, dedicación, sabiduría y paciencia para lograr mis objetivos.

A mis Padres Adelina y Javier

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor incondicional.

A mis Tías Rocío y Vero

Por ser un pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo. Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellas.

A Mis hermanos, Rocío, Javier y Diana

Por estar conmigo y apoyarme siempre, los quiero mucho.

A mi esposo Adan y a mi hija Ambar

Por ser mi motor día tras día, por no dejarme vencer ante los obstáculos, hacerme fuerte, caminar conmigo de la mano, por estar conmigo en todo momento y apoyarme en culminar este trabajo, Los Amo.

Al Dr. René García Contreras, Dra. Concepción Arenas, Dr. Julio Amezcua, Dra. Laura Acosta

Por su gran apoyo y motivación para la culminación de mis estudios universitarios y para la elaboración de esta tesis por su tiempo compartido y por impulsar el desarrollo de mi formación profesional.

Agradecimientos

Financiamiento: Este trabajo fue apoyado por la UNAM-DGAPA-PAPIIT: IA204516

Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria, Área de Nanoestructuras y Biomateriales, Área de Ciencias Agrogenómicas, Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad León, UNAM, León Guanajuato.

Al Dr. Omar Martínez Álvarez de la UPG por su apoyo en la caracterización de microscopía de Fuerza Atómica.

1. RESUMEN

Resumen

Introducción: Mucha investigación y un esfuerzo considerable se ha dedicado a la modificación de la topografía de la composición química de las superficies de los implantes de titanio (Ti) para mejorar su osteoconductividad y osteointegración. El recubrimiento de los implantes de Ti con un material bioactivo que mejore su osteointegración ha sido tema de múltiples investigaciones, sin embargo, no se ha resuelto el tratamiento de elección. **Objetivo:** Determinar los efectos del recubrimiento con nanopartículas de dióxido de titanio (TiO₂ NPs) y de la irradiación UV de placas de titanio (Ti) sobre la adhesión y proliferación de fibroblastos gingivales humanos (HGF). **Materiales y métodos:** Un total de 15 placas de Ti se dividieron en tres grupos (n=5); (i) control: Ti, (ii) experimental: Ti+NPs TiO₂, (iii) experimental: Ti+NPs TiO₂+UV. Las placas fueron analizadas en microscopía de fuerza atómica (AFM) y se determinó la rugosidad (Ra y Rmax). La irradiación con UV se realizó durante 20 minutos. HGF fueron subcultivados en DMEM+10% de suero fetal bovino (FBS) a 37 °C con 5% de CO₂. 2x10⁶ células/ml fueron inoculadas sobre las placas e incubadas durante 1 hora, se lavaron con solución salina de buffer fosfato (PBS). En el caso de la proliferación celular, las células se incubaron por 24 horas más. La viabilidad celular se determinó con el método de MTT, el formazán fue disuelto en dimetil sulfóxido y se analizó a 540 nm. La adhesión celular se confirmó por medio de observación en estereomicroscopio y micrografías de AFM. Los resultados se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes y los datos se analizaron con pruebas de Kruskal-Wallis y múltiples comparaciones de Mann-Whitney. **Resultados:** La rugosidad de la superficie de las muestras correspondió de la siguiente manera: Ti (Ra= 0,492 μm y Rms= 0,640 μm), Ti+NPs TiO₂, (Ra= 0,55 μm y Rms= 0,714 μm), respectivamente. El recubrimiento con NPs TiO₂ e irradiación con UV aumentaron significativamente (p<0.05) la adhesión y proliferación de HGF en comparación con el grupo de Ti control. **Conclusiones:** La modificación de la superficie de las placas de Ti recubiertas con NPs TiO₂ aumentó significativamente la adhesión y proliferación de HGF con la formación de una superficie hidrófila que favorece la humectancia. El recubrimiento con NPs TiO₂ en combinación con luz UV puede

ser un método conveniente para acelerar el proceso de osteointegración de los implantes dentales a base de Ti.

Palabras clave: Humectancia, metaestabilidad, proliferación celular, MTT, células gingivales humanas.

2. INTRODUCCIÓN

Introducción

La osteointegración es el proceso mediante el cual un implante se integra al hueso donde es colocado, formando una sola fase en la que las dos superficies interactúan mutuamente generando nuevo tejido óseo desde el hueso hacia el implante y viceversa. Al verse limitada su función de osteointegración, se ha propuesto la modificación de la superficie de los implantes tomando en cuenta la variación de su rugosidad y la formación de una capa anódica que evite la liberación de iones o la formación de productos que puedan generar por sí mismos un medio citotóxico que conlleve a una posterior muerte celular y del tejido que tenga como resultado el fallo en osteointegración.^{1,2, 3, 4, 5}

La necesidad de obtener una osteointegración total de los implantes dentales ha sido un reto para los odontólogos. Aunque el mejoramiento de las propiedades de las superficies de los implantes de titanio (Ti) por medios químicos ha evolucionado la era de la implantología,^{6,7} el tratamiento ideal de las superficies de Ti no se ha logrado satisfactoriamente.

Mucha investigación y un esfuerzo considerable se ha dedicado a la modificación de la topografía de la superficie y de la composición química de las superficies de los implantes de Ti para mejorar su osteointegración. El recubrimiento de los implantes de Ti con un material bioactivo que mejore su osteointegración ha sido tema de múltiples investigaciones, sin embargo no se ha encontrado el tratamiento ideal que mejore significativamente sus propiedades.¹

Diversas investigaciones han mostrado el mejoramiento de las propiedades de adhesión y humectancia de la superficie de la placa de Ti cuando se recubren con nanopartículas (NPs) de diversos materiales. Las NPs de plata han sido las más utilizadas, puesto que confieren al Ti propiedades antimicrobianas al disminuir la colonización bacteriana.^{8, 9, 10} Por otra parte, se ha mostrado que las NPs de dióxido de titanio (TiO₂) aumentan la estabilidad de los implantes de Ti cuando estos están en contacto con los tejidos bucodentales, y también disminuyen la

liberación de los iones metálicos que provocan la necrosis del tejido periimplantar que tiene como consecuencia el fallo en la osteointegración.^{11,12}

Actualmente, el Ti es uno de los materiales más utilizados en odontología e implantología. La biocompatibilidad, la resistencia a la corrosión, ductilidad en el manejo, resistencia a la fractura y la pasivación (capacidad de combinarse con el oxígeno para producir una capa de oxidación autoprotectora muy eficaz) del Ti, así como su buena integración al organismo humano y su costo moderado comparado con el de otros metales son factores determinantes que explican la extensión del uso de este material en la implantología dental.²

Diversas investigaciones han demostrado que, a pesar de las propiedades que hacen del Ti el material más utilizado para realizar implantes dentales, la osteointegración de los implantes de Ti es limitada debido al fenómeno de galvanismo, el cual aumenta el grado de corrosión del metal provocando la liberación de iones metálicos que a su vez impiden la osteointegración del implante en los tejidos bucodentales produciendo también otras patologías como la mucocitis periimplantar y la periimplantitis; patologías que afectan a la osteointegración del 2 al 10% de los implantes colocados.^{13,14}

Por otro lado, la esterilización de los implantes dentales juega un papel muy importante para la osteointegración de los mismos.¹⁵ La descarga de radiofrecuencia luminiscente¹⁶ y la irradiación de luz ultravioleta UV¹⁷ logran una superficie limpia e hidrofílica de los implantes de Ti contribuyendo así a su integración ósea.¹⁸ La fotocatalisis inducida por irradiación UV también ha mostrado un efecto positivo sobre la proliferación celular con base en el número de células viables y el consumo de aminoácidos contenidos en el medio de cultivo, específicamente de arginina y glutamina.¹⁸

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue determinar los efectos de la modificación de la topografía de la superficie y de la composición química de

placas de Ti mediante un recubrimiento de NPs de TiO₂ y el uso de irradiación UV, respectivamente, sobre la adhesión de fibroblastos gingivales humanos (HGF por sus siglas en inglés, Human Gingival Fibroblast), con el fin de obtener un tratamiento que mejore la osteointegración de los implantes dentales a base de Ti.

CAPÍTULO 1

3. MARCO TEÓRICO

Marco teórico

3.1 Titanio

El titanio es un elemento químico con número atómico 22 y símbolo Ti, el cual pertenece al grupo de los metales de transición. Se encuentra de manera abundante en la corteza de la tierra y presenta un color grisáceo de aspecto platinado¹⁹. Fue descubierto en 1790 por el químico inglés William Gregor. En 1795, el químico alemán Martin Klaproth, descubridor del uranio, le dio el nombre de titanio, vocablo derivado del griego títanos que significa “tierra blanca” debido a que el óxido de titanio tiene un color blanco de los más puros.¹⁹

Dentro de las propiedades del Ti que lo hacen un buen material para la fabricación de implantes dentales destacan su biocompatibilidad, economía, ligereza, relativa radiopacidad que permite tener un control a distancia del paciente, resistencia a la corrosión, alta dureza frente a las fracturas, rigidez, tenacidad, baja densidad, buen conductor de electricidad y gran resistencia mecánica. Aunado a lo anterior, se considera que el Ti no sufre de fenómenos galvánicos en comparación con otros metales,²

3.1.1 Propiedades físicas

- Es un metal de transición.
- Tiene un punto de fusión de 1675 °C (1941 K).
- Su masa atómica es de 47,867 u.
- Es de color plateado grisáceo.
- Es paramagnético, presenta ligera susceptibilidad a un campo magnético.
- Forma aleaciones con otros elementos para mejorar las características mecánicas.
- Es resistente a la corrosión.
- Refractario.

- Poca conductividad térmica y eléctrica: no es buen conductor del calor ni de la electricidad.
- Su densidad o peso específico es de 4507 kg/m³.²

3.1.2 Características mecánicas

- Mecanizado por arranque de viruta similar al acero inoxidable.
- Permite fresado químico.
- Maleable, permite la producción 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.
- Mantiene una alta memoria de su forma.²

3.1.3 Características químicas

- Se encuentra en forma de óxido, en la escoria de ciertos minerales y en cenizas de animales y plantas.
- Presenta dimorfismo, a temperatura ambiente tiene una estructura hexagonal compacta (hcp) llamada fase alfa. Por encima de 882°C presenta una estructura cúbica centrada en el cuerpo (bcc) que se conoce como fase beta.
- La resistencia a la corrosión que presenta es debida al fenómeno de pasivación que sufre (formación de un óxido que lo recubre).
- Es resistente al ácido sulfúrico (H₂SO₄) diluido y al ácido clorhídrico (HCl) diluido, así como a otros ácidos orgánicos y bases a temperatura ambiente. Es resistente a las bases a temperaturas elevadas. Se puede disolver en

ácidos a alta temperatura. Asimismo, se disuelve bien en ácido fluorhídrico (HF), o en fluoruros en ácidos.

- A temperaturas elevadas puede reaccionar fácilmente con el nitrógeno, el oxígeno, el hidrógeno, el boro y otros no metales.
- No se ioniza en pH básico.^{2,20}

3.1.4 Titanio y toxicidad

Se ha demostrado que tanto el Ti como en el dióxido de titanio tienen un nivel de toxicidad bajo ya que no se han encontrado alteraciones en la salud de los pacientes después de haberseles colocado un implante dental o una prótesis ortopédica a base de titanio.²¹

La sobreexposición al polvo de Ti por inhalación puede ocasionar dolor en el pecho, tos o dificultad para respirar. En contacto con la piel o los ojos puede generar irritación. En cuanto a su capacidad de provocar cáncer, el Ti se clasifica como elemento no carcinógeno para los humanos de acuerdo con la agencia internacional para la investigación del cáncer (IARC).²⁰

3.1.5 Biocompatibilidad del material

La biocompatibilidad del material está conferida por la estabilidad de la capa de óxido, que espontáneamente se forma al hacer contacto el Ti con el oxígeno²². Este material no debe ser citotóxico, mutagénico, ni alergénico. Hoy en día se utilizan con mucha mayor frecuencia los implantes de Ti y en algunas ocasiones aleaciones de Ti por su alta biocompatibilidad,²³ quedando en el pasado los implantes de alúmina.²⁴

3.2 Dióxido de titanio (TiO₂)

El dióxido de titanio es un compuesto cuya fórmula es TiO₂. Se encuentra en una configuración de color negro o castaño conocida como rutilo. Las formas naturales menos abundantes en las cuales se encuentra el TiO₂ son la anatasa y la brookita. Tanto el rutilo como la anatasa puros son de color blanco. El óxido básico negro,

(FeTiO₃), se encuentra en forma natural como el mineral llamado ilmenita. El dióxido de titanio es la principal fuente comercial del Ti. Aproximadamente el 95% del Ti que se consume proviene en forma de dióxido de titanio, debido a las múltiples aplicaciones industriales y en el área de la salud, principalmente en implantología dental y ortopedia.²

El dióxido de titanio se utiliza también como aislante eléctrico a temperatura ambiente debido a su conductividad eléctrica baja. La resistencia eléctrica del TiO₂ es sensible a los entornos gaseosos por lo cual puede utilizarse como sensor de oxígeno. El TiO₂ se utiliza como pigmento para pinturas, plásticos y papeles debido a su alto índice reflejante y a su escasez de absorción de luz visible. Resulta sencillo fabricarlo al tamaño requerido (alrededor de 0,2 micras), es estable y no tóxico. Las investigaciones actuales intentan utilizar el TiO₂ como catalizador para la eliminación de los óxidos de nitrógeno en los escapes de las centrales eléctricas.²

3.3 Uso del Titanio en odontología:

- Fabricación de implantes dentales de titanio y otros materiales empleados en tratamientos de implantología regenerativa como membranas no reabsorbibles.
- El diseño y fabricación por ordenador CAD/CAM (Computer-Aided Design and Computer-Aided Manufacturing) de prótesis dentales y prótesis sobre implantes dentales.
- En ortodoncia para la fabricación de los alambres de Nickel-Titanio.
- En endodoncia para hacer instrumentos rotatorios ¹⁹
- Biomateriales dentales tales como la incorporación de NPs de TiO₂ a cementos de ionómero de vidrio para mejorar sus propiedades físicas y antimicrobianas.²⁵
- El uso de hilos de titanio en la fabricación de alambres dentales disminuye la adherencia de *Candida albicans* a la superficie del alambre o implante dental. Aunque se desconoce su mecanismo de acción, se sabe que el

pulido final de este metal promueve una superficie lisa que impide la adherencia bacteriana.²⁶

3.4 Esterilización de superficies de Ti con luz ultravioleta

El descubrimiento de la radiación ultravioleta (UV) está asociado a la experimentación del oscurecimiento de las sales de plata al ser expuestas a la luz solar. En 1801 el físico alemán Johann Wilhelm Ritter descubrió que los rayos invisibles situados justo detrás del extremo violeta del espectro visible eran especialmente efectivos oscureciendo el papel impregnado con cloruro de plata. Denominó a estos rayos como "rayos desoxidantes" para enfatizar su reactividad química y para distinguirlos de los "rayos calóricos" que se encontraban al otro lado del espectro visible. Poco después se adoptó el término "rayos químicos". Estos dos términos, "rayos calóricos" y "rayos químicos" permanecieron siendo bastante populares a lo largo del siglo XIX. Finalmente estos términos fueron dando paso a los más modernos de radiación infrarroja y ultravioleta respectivamente.²⁷

La luz UV se refiere a la radiación electromagnética cuya longitud de onda está comprendida aproximadamente entre los 100 nm y 400 nm. Su nombre proviene de las longitudes de onda corta que los humanos identificamos como el color violeta.²⁸

La luz UV se utiliza para esterilización que junto con los rayos infrarrojos pueden eliminar toda clase de bacterias y virus sin dejar residuos, a diferencia de los productos químicos.¹⁸

3.5 Fotocatálisis del titanio por luz ultravioleta

La fotocatálisis se refiere a una reacción catalítica que involucra la absorción de luz por parte de un catalizador o sustrato, en la cual ocurren tanto reacciones de oxidación como de reducción.²⁹ Los primeros reportes de la fotocatálisis del TiO₂ inducida por radiación UV realizados por Fijishima y Honda,³⁰ datan desde 1972. Las primeras aplicaciones consideraron los efectos antibacterianos,^{17,31} de desodorización, la creación de baterías solares y hidrofiliidad de superficies.³²

La aplicación de radiación UV sobre placas de Ti reduce las concentraciones de carbono y aumenta los niveles de oxígeno en su superficie.^{33,34} El recubrimiento de una superficie con oxígeno la hace hidrofílica mediante la formación de grupos -OH y -O₂ en su capa más externa.^{34,35} Wang y cols.,³⁴ demostraron el efecto humectante (o de producir superficies hidrofílicas) que tiene la fotocatalisis del TiO₂ mediante el recubrimiento de un vidrio con este metal y su posterior exposición a radiación UV, mostrando que la superficie de dicho metal se convirtió en una zona hidrofílica diseminando el agua por toda el área, y además, encontraron que la aplicación de vapor sobre la superficie cubierta con TiO₂ no presentó empañamiento. La radiación UV producida por los rayos solares es suficiente para inducir fotocatalisis.³⁴

Los cambios inducidos en las placas de Ti expuestas a radiación UV se pueden observar a nivel microscópico con un microscopio de fuerza de fricción,³⁴ por medio del cual se observa la superficie heterogénea de las placas. A su vez, los cambios macroscópicos se pueden detectar determinando la hidrofiliidad de la superficie con base en la medición del ángulo de contacto entre la superficie de Ti con agua y soluciones aceitosas, el cual se ha mostrado que se reduce de $72^{\circ} \pm 1^{\circ}$ a $0^{\circ} \pm 1^{\circ}$.^{34, 35, 36} El ángulo de contacto de TiO₂ aumenta con el paso del tiempo ³⁴, ³⁶ en un ambiente oscuro.³⁴ La hidrofiliidad se relaciona directamente con la rugosidad de la superficie, pero no toda superficie rugosa es hidrofílica,³⁷ las características de los líquidos influyen en la hidrofiliidad y estabilidad de los líquidos,³⁴ las superficies rugosas en conjunto con radiación UV forman gotas metaestables para las superficies de Ti. El efecto hidrófilo de la fotocatalisis también se presenta en otros metales y aleaciones como son el oro,³⁵ cromo-cobalto, hierro y cromo.³²

Diversos estudios *in vitro* han demostrado que 20 minutos de irradiación de luz UV sobre placas de Ti puro incrementa significativamente ($p < 0.05$) el grado de adhesión y proliferación celular utilizando cepas de osteoblastos de ratón de la línea celular MC3T3-E1 acompañado de un mayor consumo de aminoácidos en comparación con placas no tratadas con luz UV.^{18,27} Aunado a lo anterior, estudios

in vitro utilizando cepas de osteoblastos y fibroblastos de ratón han demostrado que la irradiación de luz UV acompañada de la modificación de la topografía de la superficie de placas de Ti con recubrimientos nanoestructurados de nanopartículas de vidrio bioactivo, hidroxiapatita y sílice aumenta significativamente la adhesión y proliferación celular.³⁸ Otros estudios *in vitro* han revelado que la irradiación de placas de Ti con luz UV mejora la hidrofiliidad de su superficie acelerando la adhesión celular y la diferenciación osteogénica, las células utilizadas fueron células mesenquimales derivadas de ratón.¹

La evaluación *in vivo* del contacto implante/hueso durante diferentes tiempos (6,12, y 18 semanas) después del uso de la radiación UV en implantes de Ti y de óxido de zirconio (ZrO₂) se ha realizado tomado como modelo de estudio al cerdo. Para dicho estudio, se emplearon nueve hembras adultas de cerdo doméstico. Un total de 72 implantes, 36 de Titanio y 36 de Zirconio, se insertaron en el hueso frontal de los cerdos. Las superficies de 18 implantes de Ti y 18 implantes de zirconio fueron expuestas a luz UV antes de implantarse. Los resultados mostraron que no hubo diferencia significativa ($p > 0,1$) en el uso de ambos materiales a las (seis semanas de implantación. Sin embargo, después de 18 semanas, los implantes de Ti mostraron una mejor osteointegración en comparación con los implantes de Zr.³⁹

Así mismo, se ha demostrado que los implantes con recubrimientos nanoporosos y cargados con nanopartículas bioactivas de sílice, nBG (vidrio bioactivo) y nHA (hidroxiapatita), e irradiados con luz UV durante 25 minutos tienen una unión más íntima con el tejido óseo circundante, un mayor grado de mineralización del tejido óseo neoformado en la periferia de los implantes y una menor cantidad de defectos en la interfase hueso/implante en comparación con los implantes de Ti sin tratamiento superficial. En este estudio la implantación *in vivo* se llevó a cabo en 11 ratas Sprague Dawley donde se colocaron 4 implantes de Ti con recubrimiento de nanopartículas de hidroxiapatita, 4 implantes con recubrimiento de nanopartículas de vidrio bioactivo y 3 implantes control de Ti sin modificar,

todos expuestos a irradiación UV durante 25 minutos. Finalizado el período de implantación los animales fueron sacrificados para la extracción de muestras de tejido/implante y se observaron las conclusiones mencionadas anteriormente.³⁸

3.6 Determinación de citotoxicidad mediante MTT (DIMETILTIAZOL)

El método de MTT es un bioensayo que permite determinar la actividad mitocondrial (citotoxicidad) de las células tratadas ⁴⁰, el cual se basa en la reducción metabólica del Bromuro de (3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) a formazán realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa la cual produce un color púrpura. Este método ha sido muy utilizado para medir la supervivencia y proliferación celular in vitro, puesto que la cantidad de células viables es proporcional a la cantidad de formazán producido y la absorbancia obtenida del espectrofotómetro de microplaca. ^{41, 42}

Mediante la ruptura de la membrana citoplasmática inducida por m Dimetilsulfóxido (DMSO). El DMSO es un líquido orgánico sin color que contiene sulfuro utilizado como un importante solvente aprótico,^{41, 42} compuesto de un átomo de hidrógeno unido a un oxígeno y tiene la propiedad de atravesar rápidamente la epidermis y las membranas celulares por lo cual también sirve como acarreador de drogas o venenos.⁴¹

Los métodos para desprender las células adheridas sobre las placas de titanio tratadas con luz ultravioleta no han sido totalmente eficientes; el desprendimiento celular de forma enzimática (tripsinación) ha sido ineficaz. En conjunto con el desprendimiento enzimático se han utilizado otro tipo de técnicas como la fuerza de vibración mecánica,⁴³ utilización de 5-bromodeoxiuridina (BrdU) y WST-1 (sales de tetrazolio/formazán).⁴⁴

4. ANTECEDENTES

Antecedentes

Continuamente se han buscado mejoras en la osteointegración de los implantes dentales a base de Ti realizando una gran variedad de tratamientos en la modificación de la superficie de los implantes. Un tratamiento *in vitro* reciente ha sido el uso de radiación UV con una longitud de onda máxima de 250 nm, para el acondicionamiento de la superficie con el fin de aumentar la adhesión celular y disminuir la reacción alérgica de los implantes en relación con los tejidos periimplantares. Con el uso de luz UV se encontró un aumento en el carácter hidrófilo y osteoblastofílico de los implantes que tuvo como resultado una mejoría en las propiedades de la superficie que favorecen la adhesión celular.⁴⁵

Referente a la modificación de los implantes de Ti con NPs para mejorar la superficie de los mismos se han utilizado nanopartículas de plata (Ag NPs) recubriendo la superficie de Ti demuestran efectos sobre la actividad antibacteriana controlada y una excelente compatibilidad con los osteoblastos, inhiben el crecimiento de ambos coli *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* al tiempo que mejora la proliferación de la línea celular de osteoblastos, a su vez demuestran que la toxicidad superficie es baja y se presenta buena citocompatibilidad.⁴⁶

Por otro lado las NPs de TiO₂ permiten que el Ti sea más estable al estar en contacto con los tejidos bucodentales y disminuir la liberación de iones metálicos los cuales provocan una necrosis del tejido periimplantar lo que conlleva a su vez al fracaso en el tratamiento.¹¹

Estudios concluyen que el recubrimiento de superficies de Ti con elementos nanoestructurados por medios físicos y químicos mediante la técnica sol-gel/EISA producen grandes beneficios, entre lo que se encuentran la producción de superficies nanoestructuradas sobre implantes dentales de Ti que mejoran sus propiedades de osteointegración, incrementan su capacidad de absorción de

proteínas y la viabilidad de las células osteoblásticas adheridas, mejoran su bioactividad y aumentan también la actividad enzimática. Las propiedades presentadas por las nano-superficies podrían ser utilizadas para mejorar el éxito clínico de la rehabilitación con implantes. Las superficies nanoporosas o con nanopartículas bioactivas estimulan la mineralización, la adhesión de osteoblastos y la diferenciación osteogénica de células madres; además de acelerar la formación *in vivo* de tejido óseo sobre la superficie del implante.⁴⁷

CAPÍTULO 2

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA



Planteamiento del problema

En la actualidad, los implantes dentales confeccionados a base de Ti son ampliamente utilizados alrededor de todo el mundo. A pesar del éxito de los tratamientos, una de las principales desventajas que existe de los implantes de Ti es la falta de osteointegración en su totalidad debido a la liberación de iones metálicos, lo que produce necrosis del tejido periimplantar seguido del rechazo del implante por el organismo y el posterior fracaso del tratamiento.

A pesar del gran esfuerzo que se ha realizado para modificar la superficie de los implantes por diversos métodos eléctricos, químicos y mecánicos para incrementar la adherencia y proliferación celular así como el rápido incremento óseo, no se ha obtenido el tratamiento de elección de las superficies de Ti no se ha logrado alcanzar de manera satisfactoria.

6. JUSTIFICACIÓN

Justificación

Como respuesta a esta problemática, las superficies de Ti se han tratado mediante el recubrimiento de estas con NPs de TiO₂ las cuales hacen más estable al titanio en relación con tejidos bucodentales disminuyendo la liberación de iones metálicos y evitando la necrosis de los tejidos periimplantares buscando una mejoría en el éxito del tratamiento. La esterilización de las superficies de las placas de Ti por luz UV produce una capa de óxido más delgada y más eficiente que la que se forma durante la esterilización por vapor mediante autoclave.^{16, 31}

La exposición de las placas de titanio a la irradiación UV reduce la concentración de carbono mediante fotocátalisis y aumenta la cantidad de oxígeno de la superficie. Teóricamente, las superficies ricas en oxígeno son mayormente hidrófilas lo que favorece la adhesión celular (tanto anfifílico y oleófilo).³⁴

La irradiación de la placa de titanio con luz UV aumenta la adhesividad celular de los HGF a la superficie. La exposición óptima de las placas de Ti con irradiación UV ha sido de 20 minutos, mientras que el tiempo de exposición superior reduce ligeramente la adhesión celular y la proliferación celular durante 24 horas, se ve acompañada por el mayor consumo de glutamina y arginina extracelular.¹⁸

El tratamiento de las superficies de titanio con radiación ultravioleta aumenta la adhesión (115%) y proliferación (55%) de los HGF. Lo anterior tiene un impacto favorable puesto que estimula algunos efectos altamente deseables durante el tratamiento, principalmente acelera el mecanismo de integración de los implantes dentales.⁴⁸

Por lo tanto, el recubrimiento con NPs de Ti y la posterior irradiación UV podrían aumentar de manera significativa la capacidad de adhesión de los HGFs a las placas de Ti, lo cual mejoraría sustancialmente la osteointegración de los implantes dentales hechos con Ti.

7. OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar los efectos del recubrimiento con NPs de TiO₂ e irradiación UV de placas de titanio sobre la adhesión de fibroblastos gingivales humanos (HGF).

Objetivos específicos

1. Recubrir las placas de Ti con NPs de TiO₂.
2. Observar la superficie de las placas de Ti recubiertas con NPs de TiO₂ mediante microscopia de fuerza atómica (AFM).
3. Estimar la rugosidad superficial de las placas de Ti recubiertas con NPs de TiO₂ en microscopia de fuerza atómica (AFM).
4. Determinar la adhesión de HGF sobre la superficie de placas de titanio recubiertas con NPs de TiO₂ con y sin irradiación UV mediante la cuantificación de las células adheridas.
5. Determinar el número de células (HGF) viables proliferadas después de 24 horas de incubación sobre la superficie de placas de titanio recubiertas con NPs de TiO₂ con y sin irradiación UV por el método de MTT y observación en estero microscopio y AFM.

8. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Pregunta de investigación

¿Cuáles son los efectos del recubrimiento de NPs de TiO₂ sobre placas de titanio e irradiación UV para la adhesión de HGF?

9. HIPÓTESIS

Hipótesis

HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

Los efectos de la aplicación de radiación ultravioleta y del recubrimiento con NPs de TiO₂ sobre placas de titanio incrementan la adhesión y proliferación de HGF en comparación con las superficies de titanio sin tratamiento.

HIPÓTESIS NULA

Los efectos de la aplicación de radiación ultravioleta y del recubrimiento con NPs de TiO₂ sobre las placas de titanio no incrementa o es igual su adhesión y proliferación de HGF en comparación con las superficies de titanio sin tratar.

CAPÍTULO 3

10. METODOLOGÍA



Metodología

10.1 Tipo de estudio

Experimental puro

10.2 Diseño de la investigación

Comparativo, descriptivo, prospectivo, transversal

10.3 Universo de trabajo

Línea celular de fibroblastos gingivales humanos (ATCC CRL-2014 HGF-1 GINGIVAL FIBROBLAST HUMAN)

- Clínica integral básica de la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León.
- Clínica integral avanzada de la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León.
- Clínica de área de profundización cirugía bucal de la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León.

10.4 Tamaño de muestra

El muestreo que se realizó fue de tipo no probabilístico por cuotas que correspondieron a un total de 24 placas de titanio con dimensiones de 20x20x0.5 mm fueron divididas en tres grupos (n=8): un control, Ti, y dos experimentales: Ti+NPs de TiO₂ y Ti+NPs de TiO₂+UV. Las células que se utilizaron fueron HGF previamente determinadas por hematocitómetro (2×10^6 células/ml) e inoculadas sobre las placas de titanio. En cada experimento, una de las placas de los subgrupos se utilizó como antecedente y dos pocillos de los platos de cultivo de uso cotidiano se utilizaron como controles positivos. Los experimentos fueron realizados en el laboratorio de biomateriales dentales de la Escuela Nacional de Estudios Superiores unidad León de la Universidad Nacional Autónoma de México durante los meses de octubre de 2015 a octubre de 2016.

10.5 Criterios de selección

Criterios inclusión

- Platos de cultivo con adecuada densidad celular de HGF.

Criterios exclusión

- Todas las muestras que no cumplan con los criterios de inclusión.

Criterios eliminación

- Cultivos celulares con presencia de bacterias o contaminados
- Inoculación de las células sobre la placa de titanio que se extendieron más allá de la superficie de la placa.

10.6 Operacionalización de variables

Variables independientes

Variable	Definición	Definición Operacional	Tipo	Escala y unidad de medición
Rugosidad superficial	Es el conjunto de irregularidades de la superficie real, definidas convencionalmente en una sección donde los errores de forma y las ondulaciones han sido eliminados. ⁴	Se calculó con un medidor de superficie (AFM) en micrómetros (μm), con base en R_a , la media aritmética del punto de partida de la rugosidad de la superficie, una línea media y R_{max} , la distancia vertical entre el punto más alto y el punto más bajo dentro de la longitud a medir.	Cuantitativa. Continua	De razones 0 – 2 μm
Proliferación celular	Incremento del número de células por división celular. ⁴⁹	Se utilizó el método colorimétrico del MTT para la cuantificación de la proliferación celular, por medio de la actividad mitocondrial cuantificada	Cuantitativa Continua	De razones 0 a n células viables

		en lector de microplaca por absorbancia a 540 nm (nanómetros).		
--	--	--	--	--

Variable Dependiente

<p>Adhesión celular</p>	<p>La adherencia o adhesión celular es la unión de una célula a una superficie, matriz extracelular u otra célula, usando moléculas de adhesión celular como selectinas, integrinas y cadherinas. La adhesión celular está directamente relacionado con la absorción de proteínas.⁵⁰</p>	<p>Se utilizó el método colorimétrico del MTT, para la cuantificación de la adhesión celular, por medio de la actividad mitocondrial cuantificada en lector de microplaca por absorbancia a 540 nm (nanómetros). La cuantificación de la adhesión celular se realizó con un estereomicroscopio mediante la técnica de visualización directa utilizando filtro de campo claro y filtro ámbar a 5x, 6.3 x y 8x. Posteriormente, se tomaron microfotografías de la superficie de las placas de Ti en campo claro y filtro ámbar y nuevamente se realizó el conteo celular por visualización indirecta. La observación en AFM se</p>	<p>Cualitativa continua en AFM Cuantitativa continua en estereomicroscopio</p>	<p>De razones 0 a <i>n</i> células viables Estereomicroscopio 5x, 6.3 x y 8x. μm AFM: 80 μm</p>
--------------------------------	---	--	--	---

		realizó en vista 2D y 3D tomando microfotografías de diferentes zonas de la superficie de la placa de Ti a una escala de 80 µm.		
--	--	---	--	--

10.7 Instrumento de investigación

Se contó con una bitácora de los experimentos que se realizaron, se obtuvo evidencia con imágenes y videos, y se realizó un formato de hoja de registro como instrumento de medición (Anexo 1 y 2) para capturar los resultados obtenidos para cada uno de los experimentos realizados.

10.8 Desarrollo del proyecto: Materiales y Metodología

- Preparación de las placas de Ti
Placas de Ti tipo 1 comercialmente puro (99.5%) (Tokuriki, Melters, Tokio, Japón) de 20x20x0.05 mm fueron cortadas y obtenidas. Las placas fueron embebidas en resina epóxica (160-200 rpm; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) y pulidas automáticamente a una velocidad de entre 160-200 rpm con lija de agua de diferentes tamaños de grano, #400, 800, 1000, 1500 y 200 (Fuji Star, Sankyo, Rikagaku, Okegawa, Japón) y por ultimo con suspensión de diamante de 0.05-1 µm con fieltro (Chemomet, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA). Las placas fueron removidas de la resina y limpiadas ultrasónicamente con una mezcla de agua bidestilada, etanol al 99.5% y acetona al 99.5% durante 10 minutos y secadas a temperatura ambiente. Las placas de Ti fueron divididas en dos grupos experimentales, Ti+NPs de TiO₂ y Ti+NPs de TiO₂+UV, y uno control, Ti, (n=5/grupo). Todas las placas fueron reutilizadas a lo largo de los experimentos después de realizar un nuevo pulido y esterilizado.
- Esterilización e irradiación ultravioleta

Todas las muestras se empaquetaron en bolsas para esterilizar y fueron esterilizadas por medio de autoclave. La aplicación de la irradiación UV sobre las placas de titanio se realizó con una lámpara de UV (Germicidal T8, General Electric, Lynn, Massachusetts, EUA.) con una longitud de onda de 254 nm y una potencia de 55 mW durante 20 minutos.

- Cultivo celular

Los HGF fueron obtenidos de la Línea celular de Fibroblastos gingivales humanos ATCC CRL-2014 HGF-1 GINGIVAL FIBROBLAST HUMAN. Las células fueron establecidas y cultivadas en medio DMEM (DMEM, Life Technologies, Gibco, Carlsbad, CA, EUA) adicionado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Life Technologies, Gibco, Carlsbad, CA, EUA) inactivado por calor, 100 UI/ml de penicilina G y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina (Life Technologies, Gibco, Carlsbad, CA, EUA) en cajas de cultivo celular de polietileno (10 cm) dentro de la campana de flujo laminar horizontal (Lumistell LH-120, Biotécnica de Bajío, Celaya, México). Los subcultivos celulares se realizaron con medio del águila modificado de Dulbecco (DMEM, Life Technologies, Gibco, Carlsbad, CA, EUA) adicionado con suero fetal bovino al 10%. Las células fueron incubadas a 37°C en una atmósfera de medio húmedo con 5% de CO₂, las células se lavaron con solución salina de fosfatos (PBS) sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ (pH 7.4) y resuspendidas enzimáticamente del plato de polietileno con tripsina 0.25% con EDTA-2Na (Life Technologies, Gibco, Carlsbad, CA, EUA) en PBS para cada experimento.

- Recubrimiento de placas de Ti con NPs de TiO₂

Las placas de Ti se recubrieron con una capa de NPs de TiO₂ (Titanium IV oxide, anatase, SIGMA ALDRICH, San Luis, Missouri, EUA) a una concentración de 32 mM en 2 ml de agua destilada, las cuales se colocaron en un tubo falcón y posteriormente fueron llevadas 1 minuto a vortex (DAIGGER vortex-Genie 2 laboratorio MIXERS, Vernon Hills, Illinois EUA) y

1 minuto al ultrasonido (ultrasonic BRANSON 2510 Danbury, Fairfield, EUA). Con la micropipeta se colocaron 0.5 ml de la solución de NPs sobre la placa de Ti utilizando Spin Coater (HOLMARC,HO-TH-05, Kochi, India) en 5 ciclos: 15 seg-500 rpm,15 seg-500rpm,15 seg-1000rpm,15 seg-1500rpm,15 seg-2000rpm. Se colocaron las placas recubiertas en cajas Petri y se almacenaron en refrigeración cubiertas con aluminio.

- Cuantificación de la adhesión celular

Las células se retiraron de la incubadora. El medio de cultivo se eliminó con bomba de vacío. Las células se lavaron con solución amortiguadora PBS (4 ml) dos veces. El desprendimiento celular se llevó a cabo con 1 ml de tripsina, y las células fueron incubadas durante 5 minutos a 37° con una atmosfera de CO₂ al 5%. Posteriormente, se colocaron 4 ml de medio DMEM para resuspender las células, las culas se colocaron sobre una base de hielo. Se inocularon 0.5 ml de células sobre las placas de titanio con una densidad de 2×10^6 células/ml sobre cada placa de Ti, y se dejaron durante 1 hora a temperatura ambiente (24°C). Posteriormente, el medio de cultivo se eliminó de cada una de las placas de Ti con una bomba de vacío, se lavaron las placas dos veces con 500 µl de PBS. El reactivo de MTT (SIGMA ALDRICH, San Luis, Missouri, EUA) fue mezclado en medio DMEM a 0.2 mg/ml y 400 µl del reactivo fueron inoculados en cada placa de Ti. Tres horas después, el formazán fue disuelto con dimetil sulfóxido (400 µl, SIGMA ALDRICH, San Luis, Missouri, EUA) y se inocularon 100 µl en platos de cultivo de 96 pocillos. El plato fue analizado a 540 nm en un espectrofotómetro de microplaca (Thermo scientific San Luis, Missouri, EUA). Se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados de los experimentos fueron colocados en –un instrumento de medición–para adhesión y proliferación celular (Ver anexo 1 y 2).

- Cuantificación de la adhesión celular por microscopia de fuerza atómica y estereoscopio.

Para la cuantificación de la adhesión celular se realizó el procedimiento descrito anteriormente. Las células fueron fijadas sobre las superficies con 300 µl de glutaraldehído al 2% (Glutaraldehyde solution Grade I, 25% in H₂O, Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente (29°C) durante una hora y media. Posteriormente se eliminó el glutaraldehído con bomba de vacío y se dejaron secar las placas con aire en la campana de flujo laminar horizontal. Para evitar la humedad de las muestras las placas fueron almacenadas con silica gel (Silica Gel, KARAL, León Gto, México) y almacenadas a 4°C.

10.9 Observación en estereoscopio

Se realizó la tinción de las placas de Ti de los tres grupos experimentales con la tinción de rutina Hematoxilina-Eosina siguiendo el siguiente procedimiento:

- 1.- Se sumergió la muestra en una serie de alcoholes en orden descendiente Alcohol 100% y 96% por 15 baños.
- 2.- Se colocó la muestra en agua corriente durante 5 minutos para eliminar el exceso de alcohol.
- 3.- Se colocaron 400 µl de Hematoxilina sobre cada una de las placas durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 4.- Se colocó la muestra en agua corriente durante 5 minutos.
- 5.- Se sumergió la placa de Ti en agua carbonatada.
- 6.- Se colocó la muestra en agua corriente durante 5 minutos.
- 7.- Se sumergió la placa de Ti en Eosina 80 baños.
- 8.- Se sumergió la muestra en una serie de alcoholes en orden ascendente Alcohol 96% y 100% cada una durante 15 baños.
- 9.- Se dejó escurrir la placa de Ti para eliminar el exceso de alcohol
- 10.- Se colocó una gota de resina acrílica sobre la placa de Ti y se colocó el Cubre objetos.

Posteriormente se observaron las muestras en el estereoscopio con la finalidad de determinar la adhesión celular sobre las placas de Ti en cada una de las placas de Ti de los diferentes grupos experimentales.

El conteo celular se realizó por visualización directa utilizando filtro de campo claro y filtro ámbar a 5x, 6.3 x y 8x; posteriormente se tomaron microfotografías de la superficie de las placas de Ti en campo claro y filtro ámbar y nuevamente se realizó el conteo celular.

10.10 Observación en AFM

Se tomaron en cuenta diferentes zonas de la superficie de las placas de Ti de cada grupo experimental. Se tomaron microfotografías en proyección 2D Y 3D a una escala de 80 μm . Se calculó la rugosidad de la superficie de las placas de Ti con un medidor de superficie en micrómetros (μm), con base en Ra, la media aritmética del punto de partida de la rugosidad de la superficie en base a una línea media y Rmax que es la distancia vertical entre el punto más alto y el punto más bajo dentro de la longitud a medir. La observación de la altura de las células de representa en las imágenes con la letra Z, la cual representa la altura de las células adheridas sobre la superficie de la placa.

10.11 Análisis estadístico

Se determinó la estadística descriptiva y se calculó el promedio, la desviación estándar y el porcentaje. Todos los datos fueron analizados con pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov (Lilliefors), pruebas de Kruskal-Wallis y el método de comparaciones múltiples de Mann-Whitney. La significancia estadística fue fijada a $p < 0.05$ con un intervalo de confianza del 95%. Los datos se representaron en tablas de frecuencia y gráficos de barras.

Diagrama Experimental de la metodología

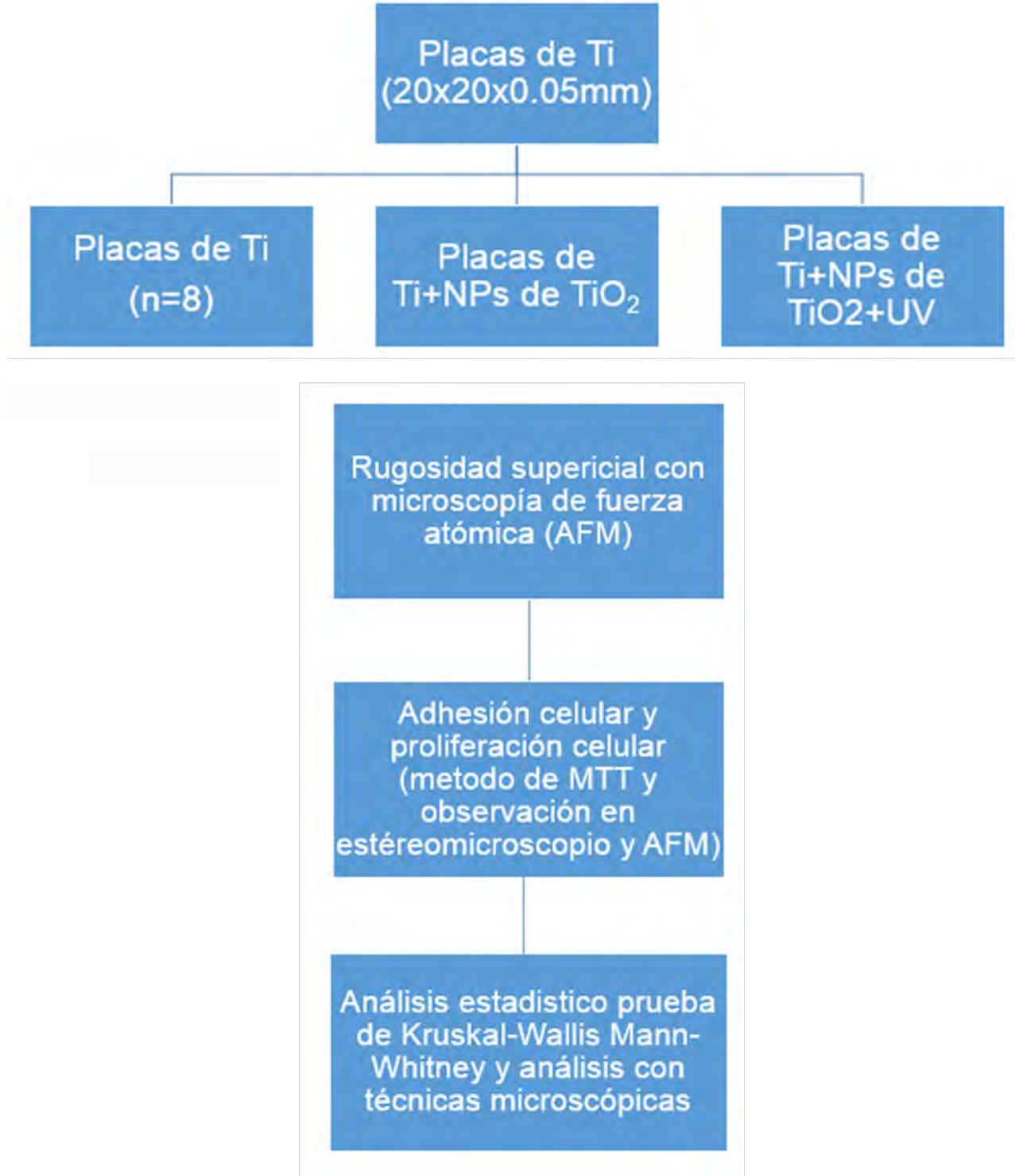


Fig 1. Diagrama experimental de la metodología utilizada.

11. IMPLICACIONES BIOÉTICAS

Implicaciones bioéticas

De acuerdo con los principios de la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial contenidos en el reglamento de la ley general de salud de México en materia de investigación en seres humanos, se contó con el consentimiento informado de los pacientes que donaron sus dientes y tejidos orales.

Durante este trabajo de investigación se siguieron todos los criterios del reglamento de la ley general de salud, Título Segundo, sobre los aspectos éticos de la Investigación en Seres Humano. Se tomaron en consideración los siguientes artículos:

Artículo 13: el cual establece que en toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberá prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar; para aquellos pacientes que aceptaron donar sus dientes y tejidos orales.

Artículo 16: En las investigaciones en seres humanos se protegerá la privacidad del individuo sujeto de investigación, identificándolo sólo cuando los resultados lo requieran y éste lo autorice.

Artículo 17: Se considera como riesgo de la investigación a la probabilidad de que el sujeto de investigación sufra algún daño como consecuencia inmediata o tardía del estudio.

Categoría II: II. Investigación con riesgo mínimo: Estudios prospectivos que emplean el riesgo de datos a través de procedimientos comunes en exámenes físicos o psicológicos de diagnósticos o tratamiento rutinarios, entre los que se consideran: pesar al sujeto, pruebas de agudeza auditiva; electrocardiograma, termografía, colección de excretas y secreciones externas, obtención de placenta durante el parto, colección de líquido amniótico al romperse las membranas, obtención de saliva, dientes deciduales y dientes permanentes extraídos por indicación terapéutica, placa dental y cálculos removidos por procedimiento profilácticos no invasores, corte de pelo y uñas sin causar desfiguración, extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud, con

frecuencia máxima de dos veces a la semana y volumen máximo de 450 ml en dos meses, excepto durante el embarazo, ejercicio moderado en voluntarios sanos, pruebas psicológicas a individuos o grupos en los que no se manipulará la conducta del sujeto, investigación con medicamentos de uso común, amplio margen terapéutico, autorizados para su venta, empleando las indicaciones, dosis y vías de administración establecidas y que no sean los medicamentos de investigación que se definen en el artículo 65 de este Reglamento, entre otros.

Esta investigación se basó en los aspectos bioéticos mencionados en el reglamento, el cual clasifica el trabajo realizado en este proyecto como de riesgo mínimo para el paciente.

CAPÍTULO 4

12. RESULTADOS

Resultados

Rugosidad de las muestras

La topografía de la superficie de las muestras corresponden a placas de Ti con $R_a = 0,492 \mu\text{m}$ y $RMS = 0,640 \mu\text{m}$ (Figura 2 A y B), y Ti + NPs TiO₂, $R_a = 0,55 \mu\text{m}$ y $RMS = 0,714 \mu\text{m}$ (Figura 2 C y D), respectivamente. (Figura 2)

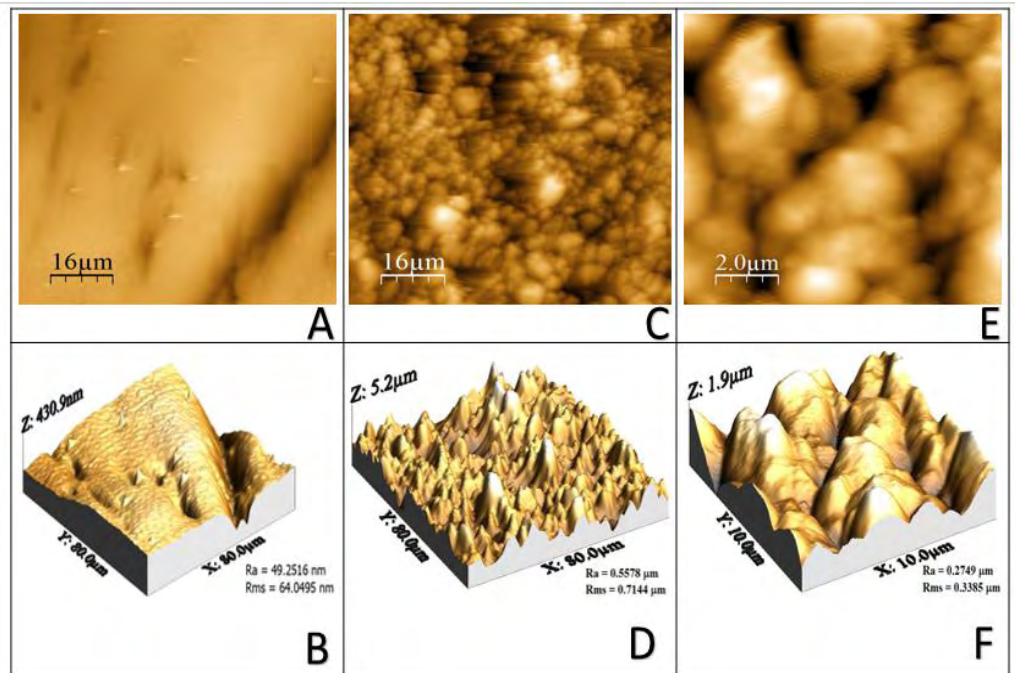


Figura 2. Topografía de placas de titanio TiO₂ con y sin NPs. A) Ti 2D, B) Ti 3D, C) Ti + NPs TiO₂ 2D D) Ti + NPs TiO₂ 3D, E) Ti + NPs TiO₂ 2D, F) Ti + NPs TiO₂ 3D, a mayor aumento.

Adhesión y proliferación de HGF

En el grupo de placas recubierto con NPs TiO₂ sin irradiación UV aumentó significativamente ($p < 0.05$) la adhesión y proliferación de los HGF en comparación con el grupo control, Ti. Las placas recubiertas con NPs de TiO₂ e irradiación UV promovieron significativamente la formación de una superficie hidrofílica que favoreció la humectancia y, por lo tanto, la adhesión y la proliferación de los HGF (Figura 3 A y B).

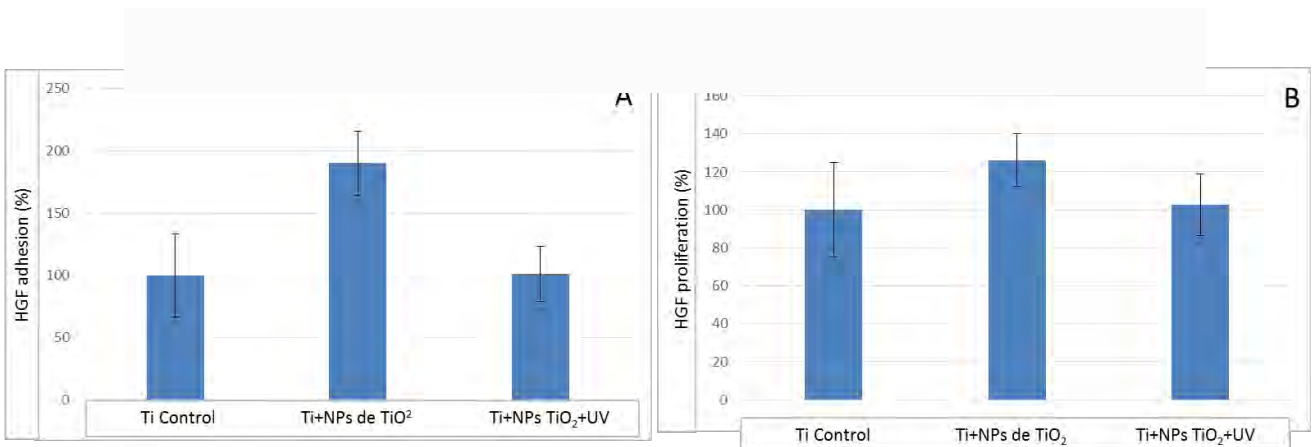


Figura 3. La adhesión y la proliferación de HGF en la superficie de placas de Ti puro y recubiertas con NPs de TiO₂ con y sin exposición a luz UV. A) Adhesión a temperatura ambiente durante una hora. B) Proliferación durante 24 horas de incubación. Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes (n=15 por grupo). * P<0.05 sobre la base de comparaciones múltiples de la prueba de Mann-Whitney.

Cuantificación de la adhesión celular por estereoscopio y Microscopia de Fuerza Atómica

Los resultados obtenidos mostraron que el grupo de placas Ti (control) presentó una menor adherencia de células con un promedio de 349 ± 18.293 células (Figura 4A), seguido por el grupo de Ti+NPSTiO₂+UV, el cual presentó en promedio una adherencia de 562 ± 74.033 células (Figura 4B), y finalmente se encontró un incremento significativo ($p < 0.05$) en la adhesión fibroblástica a las placas en el grupo experimental de Ti+NPsTiO₂ con una adherencia celular de 771 ± 59.399 células sobre la superficie de las placas (Figura 4C).

Por medio de la visualización directa en el estereoscopio se pudo observar que en el grupo Ti (control) existe menos adhesión focal y fijación a la superficie de las

placas Ti por los HGF en comparación con ambos grupos experimentales, en los cuales se observa una mejor adhesión focal y un aumento considerable en el grado de fijación de los mismos a la superficie de Ti, lo cual se debe a la presencia de las NPs de TiO₂ (Figura 4)

Imágenes de estereomicroscopio

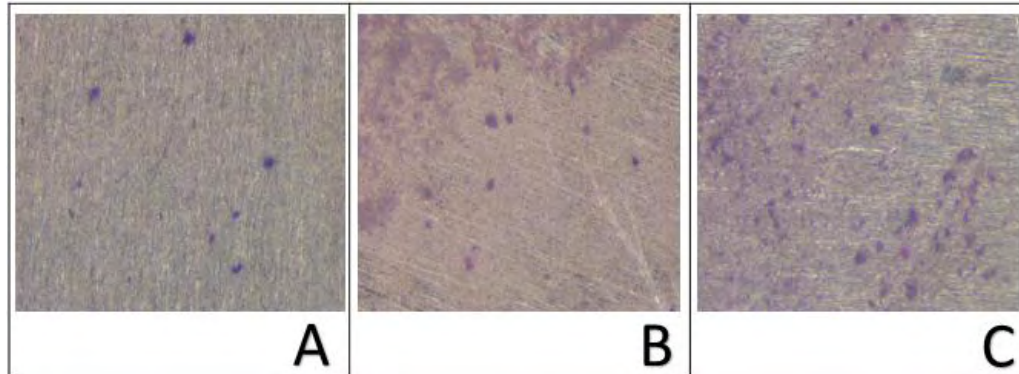


Figura 4. Adhesión de HGF a la superficie de las placas de Ti teñidas previamente con tinción HE y observadas en estereomicroscopio. A) HGF adheridos a la placa de Ti control, B) HGF adheridos a la placa de Ti+NPsTiO₂+UV, C) HGF adheridos a la placa de Ti+NPsTiO₂.

Observación en microscopía de fuerza atómica

La observación de la adhesión de los HGF a la superficie de las placas de Ti se realizó mediante AFM. Las observaciones realizadas mostraron una mejor adhesión focal de los HGF en el grupo experimental Ti+NPs de TiO₂ (figura 4 c) así como una mayor cantidad de células adheridas a la superficie y una mayor área de adhesión de los HGF, así como una morfología celular más definida en comparación con los grupos Ti (control) y Ti+NPs de TiO₂+UV (figura A y B respectivamente)

La topografía de la superficie de las muestras mostrada en la Figura 5 D corresponden a placas de Ti con Ra = 0,1531 μm y RMS = 0,2069 μm, Ti + NPs

TiO₂, Ra = 0,7309 μm y RMS = 0,9364 μm (Figura 5 E), y Ti + NPs TiO₂+UV Ra = 0,621 μm y RMS = 0,7958 μm (Figura 5 F). (Figura 5)

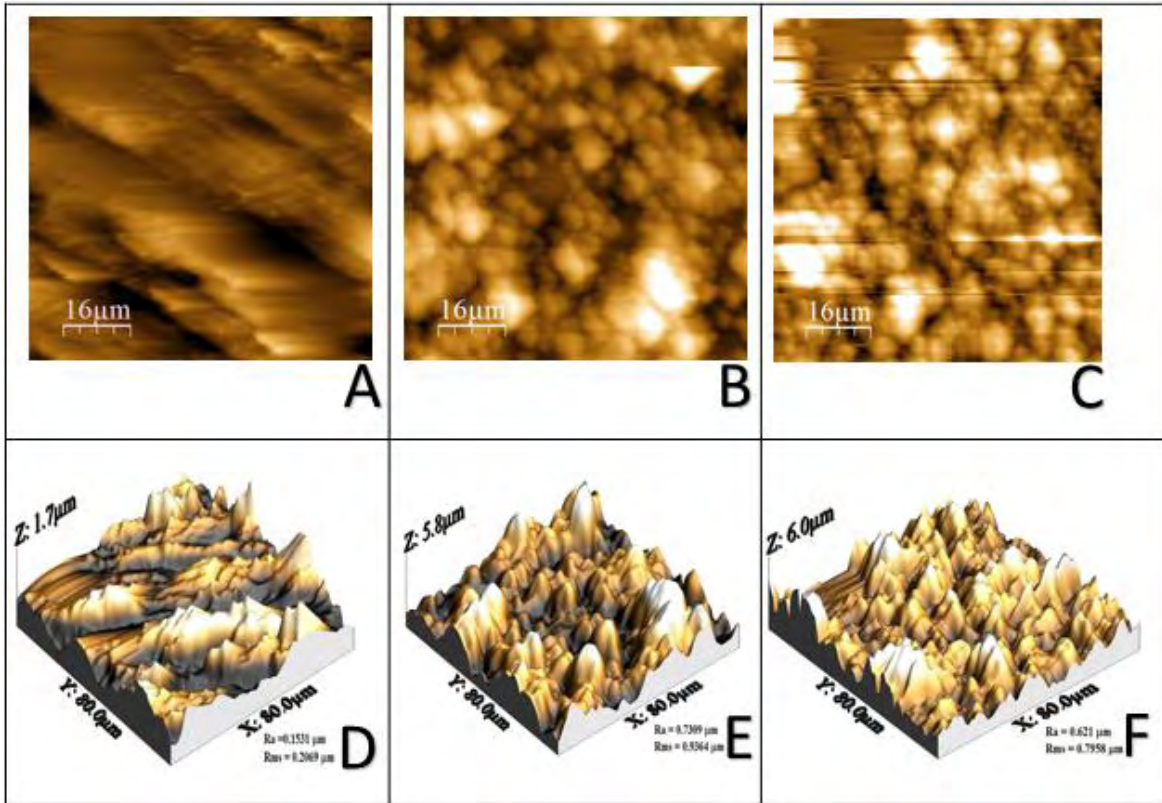


Figura 5. Topografía de diferentes áreas de la superficie de placas de Titanio inoculadas con HGF y observadas mediante AFM. A) Ti, control, 2D; B) Ti+NPs TiO₂ 2D, C) Ti+NPs TiO₂+UV 2D D) Ti control 3D, E) Ti+NPs TiO₂ 3D, F) Ti+NPs TiO₂+UV 3D. Fuente Directa.

13. DISCUSIÓN

Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron un aumento significativo en la adhesión y proliferación de HGF sobre la superficie de las placas de titanio recubiertas con NPs de TiO₂ e irradiadas con luz UV en comparación con el grupo de placas de Ti control, sin tratamiento alguno. El recubrimiento con NPs de TiO₂ e irradiación de luz UV produjo una mayor humectancia de la superficie de las placas de Ti convirtiéndola en una zona altamente hidrofílica, lo cual favoreció la dispersión uniforme de las células en toda la superficie. Posteriormente, después de 24 horas, el número de células viables fue comparable con el de las placas de Ti con o sin irradiación UV, lo que sugiere que las NPs de Ti aumentan la adhesión y proliferación de los HGF y que la irradiación UV aumenta la humectancia de la superficie de las placas, y por consiguiente, puede mejorar sustancialmente la osteointegración de los implantes de titanio.¹⁸

En concordancia con estudios previos, nuestros resultados muestran que las propiedades fotocatalíticas de la irradiación UV aumentan la adhesión celular sobre las placas de Ti en comparación con placas sin tratamiento, sin embargo, el recubrimiento con NPs de TiO₂ fue más exitoso por sí mismo, tanto para la adhesión, como para la proliferación de los HGF. El primer reporte del uso de la fotocatálisis se remonta al año de 1970³⁰, y varios estudios posteriores se han centrado en los efectos antibacterianos y el proceso de esterilización con irradiación UV^{51, 52}. El presente estudio confirma además que la irradiación de luz UV en las placas de titanio durante 20 minutos mejora la adhesión y proliferación de fibroblastos y mejora significativamente la unión de las células cuando las NPs de TiO₂ estuvieron presentes en las placas de Ti. Cabe mencionar que tanto la longitud de onda emitida por los rayos UV, así como la distancia entre las placas de Ti, la fuente de luz UV, la dosis y el tiempo de fotocatálisis son factores importantes para logra un aumento en la adhesión celular. Las condiciones de tratamiento reportadas en este trabajo fueron suficientes para inducir una fotocatálisis de las superficies y causar beneficios en los procesos de adhesión y proliferación de HGF similares a los reportados en estudios previos.^{18, 53}

El método de colorimetría rápida por MTT que se utilizó en este estudio se basa en la actividad celular metabólica, y por tanto, nuestros resultados serían más fiables que aquellos reportados por Sawase⁵⁴, quien realizó el conteo del número de células adherentes mediante microscopía láser y software especializado. Así mismo, se ha reportado el uso de tripsina²³ y ondas ultrasónicas⁴³ para desprender a las células adheridas a las placas de Ti con el fin de contabilizarlas, sin embargo, estos métodos de contabilización son ineficaces para la estimación correcta del número de células viables debido a que subestiman el número de células viables que permanecen adheridas a las superficies. El método MTT es efectivo en la determinación de la adhesión celular, sin embargo, su principal limitación es la falta de tiempo de contacto entre el reactivo MTT y las células que aún permanecen en la superficie, lo cual podría resultar en una subestimación del número real de células viables, por consiguiente, se recomienda aumentar el tiempo de incubación del reactivo con las células en futuras investigaciones. Para resolver este problema se han reportado informes acerca del consumo de aminoácidos²³ así como la evaluación de la unión perimetral,⁵⁵ ambos métodos adecuados para monitorizar la actividad celular.

La observación directa y el conteo celular de los HGF sobre las placas de titanio por medio de estereomicroscopio y microscopía de fuerza atómica mostró un aumento significativo ($P < 0.005$) en la cantidad de HGF adheridos a la superficie de la placa de titanio en los grupos experimentales Ti+NPs de TiO₂ y Ti+NPs de TiO₂+UV respecto al grupo control Ti, observándose el mayor aumento en el primer grupo experimental mencionado. Los datos obtenidos en el grupo control representaron un promedio en adhesión celular del 100% con un total de 349 ± 18.293 células adheridas sobre la superficie de la placa de Ti, mientras que la adhesión celular en el grupo experimental Ti+NPs de TiO₂+UV aumentó un 61% con un total de aproximadamente 562 ± 74.033 células, y en el grupo experimental Ti+NPsTiO₂ aumentó un 120% con 771 ± 59.399 células adheridas. Sin embargo,

en incremento observado solamente fue significativo ($p < 0.05$) en el caso del grupo experimental Ti+NPsTiO₂.

La comparación morfológica entre las células adheridas mostró diferencias entre los grupos control y experimentales. Las células adheridas a las placas control tenían una forma completamente redondeada, denotando una adhesión y fijación a la placa de Ti más deficiente en comparación con las células adheridas a las placas experimentales, las cuales presentaban una forma más extendida o alargada y no tan redondeada. Estas diferencias morfológicas se debieron probablemente al efecto del recubrimiento con NPs de TiO₂ sobre las placas de Ti, el cual proporcionó una superficie más hidrofílica que favoreció la adhesión focal y la fijación de las células a la superficie de las placas. Bajo las condiciones utilizadas en este trabajo se lograron observar cambios en la forma general de las células adheridas, sin embargo, mayores tiempos de incubación y adhesión de las células podrían proporcionar una mejor resolución de las formas observadas llegando a visualizar incluso las prolongaciones citoplasmáticas de los HGF y así poder evaluar de una manera más eficaz la adhesión focal de los mismos. También sería de utilidad evaluar en posteriores investigaciones el tamaño de las células adheridas y el diámetro de la adhesión de cada una de ellas en la placa de titanio.

Utilizando diversas técnicas de observación microscópica con estereomicroscopio y AFM se ha logrado observar las características morfológicas de osteoblastos inoculados sobre placas de Ti irradiadas con luz UV, los cuales fueron teñidos con tinción de rutina de HE y microfotografías. Las microfotografías de la superficie de las placas se utilizaron para cuantificar la adhesión de las células y analizar sus características morfológicas demostrándose un aumento en la cantidad de células adheridas en la superficie irradiada con UV así como una morfología celular más definida donde se pudo observar su forma cuboidea o cilíndrica así como un núcleo único muy desarrollado teñido de color azul-purpura, abundante RER, y un complejo de Golgi igualmente bien desarrollado, y adhesión focal de los

osteoblastos en comparación con el grupo control (Ti).⁵³ Por otro lado también ha sido utilizada esta técnica de estereomicroscopio para evaluar la adherencia de *Candida albicans* a la superficie de diferentes placas metálicas como son titanio, cobalto y cromo, y de esta manera determinar las características que favorecen la adherencia y por lo tanto la virulencia de este microorganismo, para lo cual se utilizó tinción de HE y observación en estereomicroscopio. Los resultados obtenidos de este último estudio demostraron que hubo una menor adherencia sobre la placa de Titanio, existiendo una mayor adherencia del microorganismo en la placa de cobalto-cromo.²⁶ Así mismo, diversos estudios han reportado el uso de AFM para evaluar la rugosidad de la superficie de las placas de Ti y como esta influye en la adhesión celular sobre las placas.¹⁸

La Hipótesis de investigación de este trabajo fue aceptada debido a que se demostró con los experimentos realizados que realmente existe un aumento significativo en la adhesión y proliferación celular de los HGF sobre las placas de Ti modificadas con un recubrimiento de NPs de TiO₂ e irradiación UV en comparación con las placas de Ti que no recibieron tratamiento alguno.

La principal limitación en la realización de los experimentos fue la falta de estabilidad de los medios de cultivo y las diferentes soluciones utilizadas sobre la superficie de las placas de titanio debido a los cambios en su topografía lo cual pudo haber disminuido la expresión del número de células adheridas sobre las placas de Ti. Como perspectiva, se propone la realización de ajustes o modificaciones a la superficie de las placas de titanio para lograr mantener la estabilidad de los medios de cultivo y obtener resultados con una variabilidad mínima.

14. CONCLUSIONES

Conclusiones

Al modificar la superficie de las placas de Ti con un recubrimiento de NPs de TiO₂ se demostró que existe una mejoría en la adhesión y proliferación de fibroblastos gingivales humanos comparada con las placas que no fueron modificadas.

Se observó la topografía de las superficies de las placas de Ti recubiertas con NPs de TiO₂ mediante microscopia de fuerza atómica (AFM) y se estimó la rugosidad superficial de las mismas, las muestras correspondieron a placas de Ti con Ra = 0,492 μm y RMS = 0,640 μm en las placas control y Ra = 0,55 μm y RMS = 0,714 μm en las placas adicionadas con NPs de TiO₂, y finalmente se llegó a la conclusión que existe un aumento en la rugosidad de la superficie de las placas modificadas con NPs de TiO₂ lo cual mejora la adhesión de los fibroblastos gingivales humanos a la superficie de la placa.

Al observar las placas mediante estereoscopio y AFM y realizándose un conteo de adhesión celular se demostró que en el grupo de placas recubierto con NPs TiO₂ sin irradiación UV aumentó significativamente la adhesión y proliferación de los HGF (771 ± 59.399 células) comparado con el grupo control (349 ± 18.293 células). Las placas recubiertas con NPs de TiO₂ e irradiación UV promovieron significativamente la formación de una superficie hidrofílica que favoreció la humectancia y, por lo tanto, la adhesión y la proliferación de los HGF (562 ± 74.033 células).

Por medio de la visualización directa en el estereoscopio se pudo observar que en ambos grupos experimentales existe una mejor adhesión focal y un aumento considerable en el grado de fijación de HGF, lo cual se debe a la presencia de las NPs de TiO₂.

Finalmente podemos decir que la modificación de la superficie de las placas de titanio con un recubrimiento de NPs de TiO₂ y exposición a irradiación UV aumentó significativamente la adhesión y proliferación de los HGF después de 24

horas de incubación. Este tratamiento puede ser una opción conveniente para acelerar el proceso de osteointegración de los implantes dentales hechos con titanio.

15. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. Li Z, Yi J, Huang B, et al. Ultraviolet irradiation enhanced bioactivity and biological response of mesenchymal stem cells on micro-arc oxidized titanium surfaces. *Dent Mater J*. 2015;34(2):135-147.
2. González Leonardo. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DEL TITANIO Y SUS ALEACIONES. 2013:92-108.
3. Rodríguez Rius D, García Saban FJ. Caracterización físico-química de la superficie de 9 implantes dentales con 3 distintos tratamientos de superficie. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005;10(1):58-65.
4. Acosta JCV, Garzón-Alvarado D, Casale M. Interacción entre osteoblastos y superficies de titanio: Aplicación en implantes dentales. *Rev Cuba Investig Biomed*. 2010;29(1):51-68.
5. Aparicio Bádenas CJ, Gil Mur FJ, Planell Estany JA. Aplicación del shot blasting sobre titanio para la mejora de la osteointegración. *1a Jorn Recer en Eng Biomèdica*.:50-56.
6. Buser D, Broggin N, Wieland M, Scheken RK, Denzar AJ, Cochran DL, Hoffman B, Lussini A SSE bone opposition to a chemically modified S titanium surface. *JDR* 2004; 83: 529-533.
7. Chiesa R, Giavaresi G, Fini M, Sandrini E, Giordano C, Bianchi A GRI vitro and in vivo performance of a novel surface treatment to enhance osseointegration of endosseous implants. *OSOMOPORE* 2007; 103: 745-756.
8. Aguirre, A, Exactas FDEC. “ Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables : síntesis , caracterización fisicoquímica y actividad bactericida .” 2014.
9. Zhao L, Wang H, Huo K, et al. Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver nanoparticles. *Biomaterials*. 2011;32(24):5706-5716.
10. García-Contreras R, Argueta-Figueroa L, Mejía-Rubalcava C, et al. Perspectives for the use of silver nanoparticles in dental practice. *Int Dent J*. 2011;61(6):297-301.

11. Paucar C, García C, García C, Hernández S, Introducción I. Propiedades autolimpiantes de nanopartículas de dióxido de titanio sobre sustratos vítreos. :1-3.
12. Park J, Bauer S, Schlegel KA, Neukam FW, Von Mark K Der, Schmuki P. TiO₂ nanotube surfaces: 15 nm - an optimal length scale of surface topography for cell adhesion and differentiation. *Small*. 2009;5(6):666-671.
13. Mc I, Jf C, Peri-implantitis PCD. Peri-implantitis y mucositis peri- implantaria. 2007;17(2):90-98.
14. Vargas-Reus MA, Memarzadeh K, Huang J, Ren GG, Allaker RP. Antimicrobial activity of nanoparticulate metal oxides against peri-implantitis pathogens. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;40(2):135-139.
15. Albresktsson T, Zarb G, Worthington P EAT long-term efficacy of currently used dental implants. A review and proposed criteria of success. *IJOMI* 1986; 1: 11-25.
16. Hartman LC, Meenaghnan MA, Schaaf NG HPE of pretreatment sterilization and cleaning methods on materials properties and osseointegration of threaded implants. *IJOMI* 1989; 4: 11-18.
17. Riley DJ, Bavastrello V, Covani U, Barone A NCA in-vitro study of the sterilization of titanium dental implants using low intensity UDM 2005; 21: 756-760.
18. Garcia-Contreras R. Quantification of enhanced osteoblastic adhesion to ultraviolet-treated titanium plate. *In Vivo (Brooklyn)*. 2010;2(4):51-57.
19. Biomateriales : el Titanio en Odontología. 2013;5:233-258.
20. Nordberg G, Langard S, Sunderman FW, et al. Metales: propiedades químicas y toxicidad. *Encicl salud y Segur en el Trab*. 2001:1-76.
21. Gil F, Planell J. Aplicaciones biomédicas del titanio v sus aleaciones. *Biomecánica*. 1993;(JANUARY 1993):34-42.
<http://upcommons.upc.edu/handle/2099/6814>.
22. Puleo D a., Thomas M V. Implant Surfaces. *Dent Clin North Am*. 2006;50:323-338.
23. Onuki H, Sakagami H, Kobayashi M, Hibino Y, Yokote NH and SJE of

- contact with titanium alloys on the proliferation of mouse osteoblastic cells in culture. *IV* 2010; 24: 29-37.
24. Bert M y Messika P. *Implantes osteointegrados*. Francia: Masson. 2012.
 25. GARCIA-CONTRERAS R, SCOUGALL-VILCHIS RJ, CONTRERAS-BULNES R, SAKAGAMI H, MORALES-LUCKIE RA, NAKAJIMA H. Mechanical, antibacterial and bond strength properties of nano-titanium-enriched glass ionomer cement. *J Appl Oral Sci*. 2015;23(3):321-328.
 26. Lamping R, Maekawa LE, Pavanelli CA. titânio e cobalto-cromo , com diferentes desgastes Adherence of *Candida albicans* in cobalto- chromium and titanium alloys , with different sandpapering. 1806.
 27. Cabrera , M. López-Nevot M a. Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel. *Oncol*. 2006;29(7):25-32.
 28. Cairns H. Luz ultravioleta. *Trojan Technol*. 1998:1-28.
 29. Ango D, Patricia N, Sevilla M, et al. *Issn: 2007-3127*. Vol 6.; 2014.
 30. Fujishima., A and HKE photolysis of water at a semiconductor electrode. *N* 1972; 238:
 31. Shing, M. 139-46. SS and SND sterilization of titanium implants with ultraviolet light. *IJOM* 1989;
 32. Asahi R, Morikawa T, Ohwaki T AK and TYV photocatalysis in nitrogen-doped titanium oxides. *S* 2001; 293: 269-71.
 33. Textor M, Sitting C, Frauchiger V, Tosatti S and Brunette DM.. *Titanium in Medicine*. Berlin: Springer Editors 2001.
 34. Wang R HK and FAL amphiphilic surfaces. *N* 1997; 388: 431-32.
 35. Lahann J, Mitragotri S, Tran TN, Kaido H, Sundaram J, Choi IS et al. A reversibly switching surface. *S* 2003; 299: 371-4.
 36. Bico J TC and QDR wetting. *EL* 2001; 55: 214-20.
 37. International Organization for Standardization: Geometrical Product Specifications (GPS): Surface texture, Profile method: Terms definitions and surface texture parameters. *I 4287*: 1997.
 38. Mendez, U. Evaluación in vivo de la oseointegración de implantes dentales

- modificados con recubrimientos bioactivos nanoestructurados, usando un modelo de rata. 2013.
39. J. Wiltfang, R. Schwestka-Polly, E. Felszeghy O 2012. E histológica de los implantes dentales fabricados con óxido de zirconio (ZrO₂) en comparación, con los fabricados en titanio, aplicando radiación UV-C testados en cerdos domésticos. Informe científico.
 40. Young FM, Phungtamdet W, Sanderson BJS. Modification of MTT assay conditions to examine the cytotoxic effects of amitraz on the human. 2005;19:1051-1059.
 41. Bautista GC AG y TGE del bioensayo de M para, determinar la proliferación in vitro de linfocitos de bovino frescos y congelados. V, 101-6. M 2001; 31.
 42. Morantes SJ, Páez A, Cordero CP RJ y AFA citotóxica y, Acnistus análisis fitoquímico de fracciones aisladas del extracto etanólico total de, 491-6 arborescens. AFB 2006; 25.
 43. Iwasa F, Hori N, Ueno T, Minamikawa H YM and OYE of osteoblast adhesion to U titanium via an electrostatic mechanism. B 2010; 31: 2717-27.
 44. Suzuki T, Hori N, Att W, Kubo K, Iwasa F, Ueno T et al. U treatment overcomes time-related degrading bioactivity of titanium. TEPA 2009; 15: 3679-88.
 45. Sicilia A, Cuesta S, Coma G, et al. Titanium allergy in dental implant patients: a clinical study on 1500 consecutive patients. *Clin Oral Implant.* 2008;19(1600-0501 (Electronic)):823-835.
 46. Cao H, Liu X, Meng F, Chu PK. Biological actions of silver nanoparticles embedded in titanium controlled by micro-galvanic effects. *Biomaterials.* 2011;32(3):693-705.
 47. García C,. “ Nanobiomateriales para aplicaciones odontológicas ” Laboratorio de Nanobiomateriales.
 48. Andrade, A. Placas Ti Tratadas con luz UV. Toluca, estado de México, septiembre de 2011.
 49. Proliferación celular. www.medmol.es, España EITS, En: M molecular de FP disponible, 2016 <http://www.medmol.es/glosario/104/>. F de consulta 9 de

- E. Proliferación Celular. 2015:1-10.
50. Fernandez, Z. Adhesión y comunicación celular. 2002.
 51. Xu MF, Lin S, Chen XM and Peng YZ: Studies on characteristics of nanostructure of N-TiO₂ thin films and photobactericidal action. *J Zhejiang Univ Sci B* 7: 586-590 2006.
 52. Koseki H, Shiraishi K, Asahara T, Tsurumoto T, Shindo H, Baba K, Taoda H and Terasaki N: Photocatalytic bactericidal action of fluorescent light in a titanium dioxide particles mixture: an in vitro study. *Biomed Res* 30: 189-192 2009.
 53. Garcia-Contreras R, Kanagawa S, Beppu Y, et al. Morphological Features of Osteoblasts Cultured on Ultraviolet-irradiated Titanium Plates. *In Vivo (Brooklyn)*. 2011;25(4):649-655.
 54. Sawase T, Jimbo R, Baba K, Shibata Y, Ikeda T and Atsuta M: Photo-induced hydrophilicity enhances initial cell behavior and early bone apposition. *Clin Oral Impl Res* 19: 491-496 2008.
 55. García-Contreras R, Kanagawa S, Beppu Y, et al. Morphological features of osteoblasts cultured on ultraviolet-irradiated titanium plates. *In Vivo (Brooklyn)*. 2011;25(4):649-655.

16. ANEXOS

Anexos

Anexo 1: Instrumento de medición para adhesión celular

Adhesión de HGF			
<u>Exp 1</u>			
TiO ₂ +UV	TiO ₂ -UV	Ti	Observaciones
1			
2			
3			
<u>Exp 2</u>			
TiO ₂ +UV	TiO ₂ -UV	Ti	
1			
2			
3			
<u>Exp 3</u>			
TiO ₂ +UV	TiO ₂ -UV	Ti	
1			
2			
3			

Anexo 2: Instrumento de medición para la proliferación celular a 24 horas.

Proliferación celular				
	TiO ₂ +UV	TiO ₂ -UV	Ti	Observaciones
<u>Exp. 1</u>				
24hrs				
<u>Exp. 2</u>				
24hrs				
<u>Exp. 3</u>				
24hrs				

--	--	--	--	--