



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN ESTOMATOLOGÍA

CON TERMINAL EN REHABILITACIÓN ORAL

“COMPARACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR DE FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS SOBRE DIFERENTES TIPOS DE TRASLUCIDEZ DE ZIRCONIA: ESTUDIO *IN VITRO*”.

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN ESTOMATOLOGÍA CON TERMINAL EN REHABILITACIÓN ORAL

Presenta:

**C.D. Jesús Martín Mendoza Zepeda
ID: 221450017**

DIRECTOR DE TESIS:

C.D.E.P.B. Enrique Pérez Martínez ID: 100188222

DIRECTOR DISCIPLINARIO:

MTRO. Gerardo Quiroz Petersen ID: 100330044

DIRECTORA METODOLÓGICA:

D.C. Carolina Sámano Valencia ID: 100526470

DIRECTORA EXTERNA:

D.C. Maura Cárdenas García ID: 100337388

LECTORA:

M.E.I. Ana Karina Ley García ID: 100215766

Puebla, Puebla 26 de junio de 2023

I. Dictamen de aprobación de tesis



Oficio No. FESNEP/CIFE/071/2023

C. Jesús Martín Mendoza Zepeda
Alumno de la Maestría en Estomatología
con opción en Terminal en Rehabilitación Oral
Matrícula No.: 221450017
Facultad de Estomatología
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
PRESENTE

Sirva este medio para enviarle un cordial saludo, asimismo, el que suscribe MQ. Farid Alfonso Dipp Velázquez Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; por este medio me permita informar a Usted, que, está Secretaría de Posgrado aprueba la impresión de la Tesis titulada:

"Comparación de la viabilidad celular de fibroblastos gingivales humanos sobre diferentes tipos de translucidez de zirconio: Estudio in vitro"

mismo que presentará para realizar su examen profesional y obtener el grado de Maestro en Estomatología con opción en Terminal en Rehabilitación Oral; para su conocimiento y atención correspondiente.

Sin otro particular, reitero a Usted mi más atenta y distinguida consideración.

Atentamente
"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., 12 de junio de 2023

MQ. Farid Alfonso Dipp Velázquez
Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología



*Se anexa: Formato de Impresión de Tesis (Original) - p.s.c y o.
*C.c.p. Archivo
*INTRO. FJMA/DR.FJMA/yswch

Facultad de Estomatología | 31 Poniente 1304, Col. Volcanes,
Puebla, Pue. C. P. 72410
01 (222) 229 55 00 Ext. 6400

II. Autorización de impresión

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA
SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS RECEPCIONAL

Para obtener el Grado de: Maestro(a) en Estomatología con opción terminal en Rehabilitación.

Registro CIFE: 2023216

Fecha: lunes 12 de junio de 2023.

Título de la Tesis: "Comparación de la viabilidad celular de fibroblastos gingivales humanos sobre diferentes tipos de traslucidez de zirconia; Estudio in vitro".

Nombre del alumno: Jesús Martín Mendoza Zepeda

Matrícula: 221450017

Domicilio: 13 sur 2510 31A. Colonia Los volcanes. Puebla, Puebla.

Tel: 66*41 21 65 31

Fecha de ingreso a la Facultad: lunes 04 de enero de 2021

Firma: _____

Director de Tesis: MC. Enrique Pérez Martínez

Grado académico: Especialista en prótesis bucal

Adscripción: Facultad de estomatología

ID: 100188222

Tel: 22*24 26 76 28

Firma: _____

Director Disciplinario: Mtro. Gerardo Quiroz Petersen **Grado académico:** Maestría en oclusión y rehabilitación oral.

Adscripción: Facultad de estomatología

ID: 100330044

Tel: 22*21 82 84 16

Firma: _____

Director Metodológico: DC. Carolina Sámano Valencia **Grado académico:** Doctora en ingeniería y ciencia de materiales

Adscripción: Facultad de Estomatología

ID: 100526470

Tel: 44*48 19 18 22

Firma: _____

Lector: MEI. Ana Karina Ley García

Grado académico: Maestría en Estomatología Integral

Adscripción: Facultad de estomatología

ID: 100215766

Tel: 22*24 55 30 60

Firma: _____

Nombre y firma de aprobación del Responsable de la Maestría en Estomatología con Opción terminal en Rehabilitación Oral.

MEI. Guillermo Franco Romero

Firma: _____

La Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología, autoriza la impresión de la Tesis.

MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez



Fecha: lunes 12 de junio del 2023.

Sello _____

III. Oficio de aceptación de proyecto C.I.F.E.



Constancia No. FESIEP/CIFE/085/2023

BUAP

MC. Enrique Pérez Martínez
 Responsable del Proyecto
 Facultad de Estomatología
 Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
PRESENTE

Sirva este medio para enviarle un cordial saludo, asimismo, la Secretaria de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; informa, que, el Proyecto de Investigación (Colectivo):

"Comparación de la viabilidad celular de fibroblastos sobre diferentes tipos de gingivales humanos traslucidez de zirconia: Estudio In Vitro"

Presentado por:

No.	Cargos	Nombres	ID - Matrículas
1	Responsable del Proyecto:	MC. Enrique Pérez Martínez	100188222
2	Director Metodológica:	DC. Carolina Sámano Valencia	100526470
3	Director Disciplinaria:	Mtra. Gerardo Quiroz Petersen	100330044
4	Asesor Externa:	DC. Maura Cárdenas García Facultad de Medicina BUAP	100337388
5	Alumna de Maestría: Terminal en Rehabilitación Oral	C. Jesús Martín Mendoza Zepeda	221450017

queda registrado ante el Comité de Investigación de la Facultad de Estomatología (C.I.F.E.), en el libro de registros 08 en la hoja 01 con No. de registro 2023216, y con fecha asentada el día viernes 25 de noviembre del año 2022.

Por lo anterior, se hace constar, que, el día lunes 12 de junio del presente año, se recibió ante C.I.F.E. la notificación de cambio de título de Proyecto, por parte del responsable del Protocolo, y para dar continuidad a lo mencionado con el siguiente rubro:

<u>Título anterior registrado ante C.I.F.E.:</u>	Comparación de la viabilidad celular de fibroblastos sobre diferentes tipos de gingivales humanos traslucidez de zirconia: Estudio In Vitro.
<u>Título actualizado registrado ante C.I.F.E.:</u>	Comparación de la viabilidad celular de fibroblastos gingivales humanos sobre diferentes tipos de traslucidez de zirconia: Estudio in vitro.

Para los fines legales que los interesados convaliden, y sin otro particular, reitero a Usted mi más atenta y distinguida consideración.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor."
 H. Puebla de Z., 12 de junio de 2023

MG. Forid Alfonso Dipp Velázquez
 Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado
 Facultad de Estomatología

C.c.p. Archivo
 *MTRD. FJMA/DR.FADV/20230612

Facultad de Estomatología | 31 Poniente 1304, Col. Volcanes, Puebla, Pue. C. P. 72410
 01 (222) 229 55 00 Ext. 6400

IV. Reporte de similitud anti-plagio

Tesis final junio

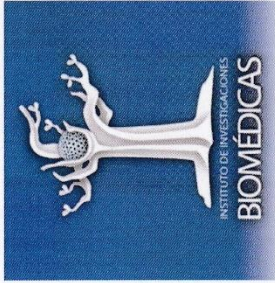
INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA BIBLIOTECA Trabajo del estudiante	8%
2	repositorioinstitucional.buap.mx Fuente de Internet	2%
3	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
4	patents.google.com Fuente de Internet	1%
5	www.researchgate.net Fuente de Internet	1%
6	repositorio.uax.es Fuente de Internet	<1%
7	www.coursehero.com Fuente de Internet	<1%
8	1library.co Fuente de Internet	<1%

V. Evidencia de productos académicos derivados del proyecto.



INCMNSZ

La Unidad de Bioquímica «Dr. Guillermo Soberón Acevedo» del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición «Salvador Zubirán»

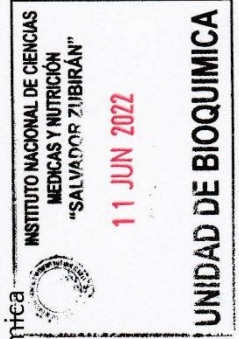
Extiende la presente constancia a:

Jesús Martín Mendoza Zepeda

Por su asistencia al curso teórico-práctico «*Técnicas básicas de cultivos de líneas celulares de mamífero*» (10 horas curriculares).

M. En C. José Luis Ventura Gallegos
Técnico Académico Titular «B»
Instituto de Investigaciones Biomédicas
(IIBO), UNAM

Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Jefe de la Unidad de Bioquímica
IIBO-UNAM, INCMNSZ.



Ciudad de México a 11 de junio del 2022

VI. Agradecimientos

Este trabajo no pudo ser posible sin la ayuda de mis responsables de proyecto, a los cuales les agradezco su orientación, paciencia y conocimientos. Inició como un largo camino de tropiezos y decepciones, pero me ayudaron a llegar a mi destino con muchas lecciones y aprendizajes.

Agradezco a mi asesor y maestro, el Doctor Enrique Pérez, quien, con sus palmadas de apoyo, sus llamadas de atención y sus conocimientos me fue guiando durante toda mi formación dentro y fuera de la escuela.

A la Doctora Maura Cárdenas, por recibirme en su laboratorio y, que, a pesar de todos mis tropiezos y malos momentos, siempre estuvo presente con paciencia y apoyo demostrándome que no hay que rendirse y seguir intentando.

A la Doctora Carolina Sámano, por su dedicación, paciencia y por compartir sus conocimientos, sin los cuales hubiese sido imposible terminar el proyecto.

Al Doctor Gerardo Quiroz, por hacerme ver que en esta profesión los libros y los artículos no son solamente para la escuela y que siempre debemos seguirnos cuestionando y leer para poder resolver nuestras dudas.

Al Doctor Alejandro Guzmán, a quien agradezco su paciencia y dedicación. Que, a pesar de que su nombre no está en esta portada, fue igual de importante para este proyecto por siempre auxiliarme, orientarme y siempre estar atento.

A mi coordinador, el Doctor Guillermo Franco por su paciencia, por sus conocimientos y por permitirme vivir una de las mejores etapas de mi vida.

A todos los docentes que sembraron su semilla con conocimientos durante toda mi residencia. A mis compañeros de posgrado, por siempre estar presentes en buenos y malos momentos. En especial, a las hermanas que el posgrado me dio: Adriana, Gaby y Jessi, a quienes admiro y agradezco demasiado por siempre estar presentes y que, gracias a sus palabras, conocimientos y cariño incondicional, hicieron mi camino más ameno y divertido.

Agradezco finalmente, a las personas más importantes en mi vida: mis padres. Por su apoyo y amor incondicional, quienes a pesar de la distancia siempre estuvieron presentes. Les agradezco por siempre apoyar mis decisiones, y por corregirme cuando no era lo correcto. Por darme la oportunidad de cumplir mis sueños y metas. Por brindarme lecciones a lo largo de toda mi vida. Deseo que la vida me permita compensarles y demostrarles lo infinitamente agradecido que estoy con ustedes.

VII. Índice general

1. RESUMEN	12
Palabras clave:.....	12
2. INTRODUCCIÓN	13
3. ANTECEDENTES	15
3.1 Antecedentes generales.....	15
3.1.1 Aplicaciones dentales de la zirconia.....	16
3.1.2 Traslucidez de la zirconia.....	16
3.1.3 Implantes y aditamentos protésicos de zirconia	17
3.1.4 Sellado biológico	18
3.1.5 Integración con los tejidos blandos	18
3.1.6 Adherencia de los fibroblastos a la superficie de zirconia.....	20
3.1.6 Cultivos celulares.....	21
3.1.7 Evaluación de la citotoxicidad <i>In vitro</i> según la ISO 10993-5	22
3.2 Antecedentes específicos	24
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
4.1 Pregunta de Investigación.....	27
5. JUSTIFICACIÓN	28
6. HIPÓTESIS	29
Hipótesis Científica	29
Hipótesis nula.....	29
7. OBJETIVOS	30
7.1 Objetivo general.	30
7.2 Objetivos específicos	30
8. MATERIALES Y MÉTODOS	31
8.1 Diseño del estudio.....	31
8.2 Población y muestra.....	31
8.3 Criterios de selección	31
8.3.1. Criterios de inclusión.....	31
8.3.2 Criterios de exclusión.....	32
8.3.3 Criterios de eliminación.....	32
8.4 Tabla de definición y medición de variables.....	33
8.5 Concordancia y fiabilidad	34

8.6 Ubicación espacio temporal	34
8.7 Aspectos éticos	34
8.8 Procedimientos, técnicas y fuentes de recolección	35
8.8.1 Obtención de los fibroblastos gingivales humanos	35
8.8.2 Determinación del número de células óptimo	38
8.8.3 Discos de zirconio	41
8.8.4 Pruebas piloto para estandarización	45
8.8.5 Proliferación celular	46
8.9 Análisis estadístico	50
9. RESULTADOS	51
9.1 Rugosidad	51
9.2 Longitud de las células	51
9.3 Proliferación celular	55
10. DISCUSIÓN	59
11. CONCLUSIÓN	62
12. BIBLIOGRAFÍA	63
13. ANEXOS	68

VIII. Índice de tablas y figuras

Tabla 1.....	24
Tabla 2.....	33
Figura 1.....	35
Figura 2.....	36
Figura 3.....	38
Figura 4.....	39
Figura 5.....	40
Figura 6.....	41
Figura 7	42
Figura 8.....	42
Figura 9.....	43
Figura 10.....	44
Figura 11.....	45
Figura 12.....	45
Figura 13.....	47
Figura 14.....	48
Figura 15.....	49
Tabla 3.....	51
Tabla 4.....	51
Tabla 5.....	52
Tabla 6.....	52
Tabla 7.....	52
Figura 16.....	52
Tabla 8.....	53
Tabla 9.....	53
Figura 17.....	53
Tabla 10.....	54

Tabla 11..... 54

Figura 18..... 54

Tabla 12..... 55

Tabla 13..... 56

Tabla 14..... 56

Figura 19..... 56

Tabla 15..... 57

Tabla 16..... 57

Figura 20..... 57

Tabla 17..... 58

Tabla 18..... 58

Figura 21..... 58

IX. Abreviaturas

CAD. Diseño asistido por computadora (por sus siglas en inglés).

CAM. Manufactura asistida por computadora (por sus siglas en inglés).

Cols. Colaboradores.

DAPI. 4',6-diamidino-2-fenilindol.

DMEM. Medio de cultivo Eagle modificado de Dubelcco (por sus siglas en inglés).

FGH. Fibroblastos gingivales humanos.

HT. Alta traslucidez (por sus siglas en inglés).

ISO. Organización internacional de estandarización (por sus siglas en inglés).

PBS. Solución amortiguadora de pH.

pH. Medida del grado de acidez o alcalinidad de una sustancia.

STL. Estereolitografía.

STML. Super traslúcida multicapa (por sus siglas en inglés).

TZP. Policristales tetragonales.

Y-PSZ. Zirconia parcialmente estabilizada con óxido de itrio.

UTML. Ultra traslúcida multicapa (por sus siglas en inglés).

UV. Ultravioleta.

COMPARACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR DE FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS SOBRE DIFERENTES TIPOS DE TRASLUCIDEZ DE ZIRCONIA: ESTUDIO *IN VITRO*.

1. RESUMEN

Introducción: El éxito de un implante está principalmente determinado por el proceso de osteointegración que este conlleva, además de ello, la integración del aditamento protésico con los tejidos blandos y el sellado que este nos brinde determina la salud de los tejidos periimplantares evitando la filtración de patógenos al complejo implante aditamento. Los fibroblastos gingivales humanos determinan la adhesión transmucosa de la restauración implanto soportada. Los aditamentos protésicos deben ser biocompatibles con los fibroblastos gingivales permitiendo su diferenciación, proliferación y la unión con estas células. La zirconia ha sido utilizada para restauraciones y elementos transmucosos, mostrando una buena compatibilidad con los tejidos blandos y excelentes resultados estéticos cuando se compara con metales. Actualmente existen grandes variedades de zirconias con distintos contenidos, características físicas y estéticas.

Objetivo: Comparar de manera *in vitro* la viabilidad celular de fibroblastos gingivales humanos sobre los diferentes niveles de traslucidez de zirconio. **Materiales y métodos:**

30 discos (10 por grupo) de zirconio UTML (Ultra translucent Multilayered), STML (Super Translucent Multilayered) y HT (High Translucent) Katana (Kuraray) con unas dimensiones de 8 mm de diámetro y 2 mm de ancho, pulidos mecánicamente sin alcanzar alto brillo y posteriormente lavados con alcohol isopropílico al 70% y esterilizados a 135°C durante 10 minutos. Cultivo primario de fibroblastos gingivales humanos. Se sembraron las muestras en cultivos de FGH durante 72 horas y fueron observados bajo microscopio de fluorescencia cada 24 horas para realizar un conteo y medir su longitud.

Resultados: No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la proliferación celular de fibroblastos gingivales humanos sobre los diferentes niveles de traslucidez de zirconia durante las 72 horas. **Conclusión:** No existe diferencia en la viabilidad celular de fibroblastos gingivales humanos sobre diferentes niveles de traslucidez de zirconia de *in vitro*.

Palabras clave:

Zirconia, aditamentos, viabilidad, tejidos blandos, fibroblastos, traslucidez.

2. INTRODUCCIÓN

Reemplazar uno o múltiples órganos dentarios ausentes y enfrentar las consecuencias que derivan de su ausencia son de los principales retos a los que se enfrenta cotidianamente un odontólogo. Las consecuencias a las que nos enfrentamos debido al edentulismo pueden afectar la armonía oclusal tanto funcional como estéticamente, así como afectar a los tejidos adyacentes y estructuras anatómicas contiguas. El factor estético conlleva mayor exigencia de tratamiento para solucionar la ausencia de órganos dentarios, opciones cada vez más sujetas a las altas expectativas por parte de los pacientes.

El uso de implantes dentales en el campo de la odontología se ha convertido en una modalidad ampliamente aceptada por los pacientes para rehabilitar zonas desdentadas. Con el paso del tiempo esta práctica ha adquirido un auge debido a la incorporación de nuevas tecnologías y materiales y a inmensidad de estudios que buscan el refinamiento de las técnicas actualmente empleadas y a que los pacientes se han concientizado del uso de estas nuevas tecnologías (1–3).

El éxito de la colocación de un implante está principalmente dictado por un proceso de integración del hueso al implante, llamado osteointegración, el cual puede ser definido como la tolerancia que tiene el hueso vivo sobre un objeto extraño inerte al cual le puede proveer un anclaje estable y sustentable. Además de este proceso, existe también una remodelación del tejido gingival en contacto con los aditamentos protésicos transmucosos. Al igual que los dientes naturales, el complejo de tejidos blandos que rodean un implante consiste en un epitelio surcular, epitelio de unión y de un tejido conectivo formando un espesor biológico. En particular, los fibroblastos gingivales son las células más importantes en la adhesión transmucosa de la prótesis implantosoportada. Mientras que, el tejido conectivo es el responsable de lograr un sellado mucoso alrededor del aditamento protésico. Por lo tanto, la viabilidad celular y la adherencia de los fibroblastos hacia la subestructura protésica forman un sellado mucoso adecuado, permitiendo el correcto mantenimiento e integración de la restauración y restringe filtraciones bacterianas o migraciones apicales gingivales (3,4).

El elemento protésico conocido transgingival debe de ser fabricado de un material biocompatible que sea aceptado por los fibroblastos gingivales y también permita la proliferación, la diferenciación y la unión con estas células. Históricamente los aditamentos protésicos han sido elaborados principalmente de metales como el titanio. Al utilizar aditamentos metálicos se observaba una descoloración gingival del tercio cervical del implante en el sector anterior con apariencia de una encía grisácea por lo que decidieron satisfacer las demandas estéticas de los clínicos y pacientes, comenzando a fabricar aditamentos cerámicos, obteniendo buenos resultados estéticos (5).

La zirconia u óxido de zirconio, es un óxido metálico que aparece en la naturaleza y ha recibido mucha atención debido a sus propiedades mecánicas y estabilidad química. Éste ha sido utilizado en la odontología principalmente en la elaboración de restauraciones indirectas, ya sean monolíticas o estratificadas. Destacando por sus características mecánicas (fuerza flexural y resistencia a la fractura), estéticas, estabilidad química, baja conductividad térmica, alta biocompatibilidad, así como una baja adherencia bacteriana en su superficie. Gracias a las tecnologías asistidas por computadora como el CAD/CAM, recientemente se ha utilizado en la manufactura de pilares y aditamentos protésicos transmucosos mostrando excelentes resultados en su precisión y en adaptación con los implantes y los tejidos blandos.(6)

Diferentes presentaciones de zirconia se han introducido en los últimos años, con gran variedad respecto a durezas, translucidez, composición química, multicapas y también en distintas presentaciones. Es de vital importancia clínica establecer la respuesta de los tejidos blandos hacia estas nuevas clases de zirconia para determinar cómo obtener mejores resultados en la implantología. La biocompatibilidad de las zirconias translúcidas debe de investigarse y ser comparada respecto a su translucidez y determinar si existe diferencia significativa biológicamente hablando en la adaptación de los fibroblastos gingivales a las superficies de este material. Este estudio propone realizar pruebas de viabilidad celular y de citotoxicidad de fibroblastos gingivales humanos en contacto con discos elaborados con zirconia de diferente nivel de translucidez (7).

3. ANTECEDENTES

3.1 Antecedentes generales

Un implante dental es un componente quirúrgico de forma cilíndrica que simula la porción radicular de un diente natural, siendo el titanio el material de elección para su fabricación. Después de su colocación en el hueso residual del maxilar, entra en un proceso de osteointegración para posteriormente soportar un aditamento protésico y una restauración. Un aditamento tiene la capacidad de alojar una restauración, funcionando como una interfaz entre el implante y la prótesis.

La corrección de dientes ausentes fue identificada en momias egipcias de civilizaciones antiguas con prótesis pequeñas ligadas a los dientes adyacentes. Uno de los implantes dentales más antiguos fue fabricado con 3 fragmentos de concha nácar, descubierto en playa de los muertos, en Honduras en 1931, localizado en los alveolos de un cráneo humano. Uno de los primeros implantes dentales metálicos, datan del siglo I en el imperio Galo-Romano en Francia.

Fue hasta el año 1960 que se hizo posible la implantología moderna gracias a los estudios del doctor Per-Ingvar Branemark en Suecia. Fue el primero en proponer el concepto de osteointegración de un biomaterial metálico implantado en hueso. En un estudio experimental en 1952 encontró accidentalmente que el hueso estaba firmemente fijado a la superficie de titanio de un dispositivo implantado en defectos óseos. Con este estudio concluyó que había una buena biocompatibilidad del hueso con el titanio, siendo esta la mejor propiedad biológica de este metal. Esto llevó a la creación de dispositivos de titanio atornillados en diferentes zonas del hueso (3,8).

Más tarde, el profesor André Schroeder, de la Universidad de Berna (Suiza), investigó la adaptación tisular con distintos materiales, reportando de manera histológica el contacto de los implantes con el hueso calcificado. Años más adelante, también informó sobre las interacciones de los implantes de titanio con los tejidos blandos orales (9).

3.1.1 Aplicaciones dentales de la zirconia

Recientemente la zirconia ha emergido como un material versátil y prometedor dentro de las cerámicas dentales debido a sus excelentes propiedades mecánicas, aceptable biocompatibilidad por lo que son utilizadas como biomateriales para implantes o restauraciones mostrando mejor apariencia que las restauraciones hechas con otras cerámicas. La zirconia es una cerámica policristalina sin una fase vítrea y se puede encontrar en distintas formas: monocíclica que se encuentra a temperatura ambiente y es estable hasta los 1170 °C; se transforma a una fase tetragonal (TZP) cuando alcanza temperaturas entre los 1170 a los 2370 °C; y la cúbica se forma arriba de los 2370 °C hasta su punto de fusión 2680 °C. Este elemento químico es un metal duro, blanquecino, resistente a la corrosión que pertenece al grupo 4 de la tabla periódica con número atómico 40 y masa atómica 91,22. Tiene una resistencia a la flexión de 900-1600 MPa y una resistencia a la fractura de 9-10 MPa, que es superior a todas las cerámicas restauradoras. La zirconia parcialmente estabilizada con óxido de itrio (Y-PSZ) es una cerámica de zirconio tetragonal hecha 100% de granos finos tetragonales (Y-TZP) después de la adición de aproximadamente 2 al 3 mol% de óxido de itrio (Y_2O_3) como agente estabilizador. Esta última es la forma más estable de zirconia y ha sido utilizada para restauraciones de prótesis fija con combinación de tecnologías CAD/CAM (8–14).

3.1.2 Traslucidez de la zirconia

Debido a la apariencia opaca de la zirconia, se han propuesto técnicas de estratificación para enmascarar esta apariencia y también se han desarrollado nuevas zirconias monolíticas translucidas para mimetizar el color de los dientes naturales. La translucidez se define como la capacidad de un material de permitir la difusión de la luz a través de este (5,14,15). De acuerdo a su color pueden clasificarse como: blancas o multicapa/precolor, teniendo entre ellas una diferencia en el porcentaje de su contenido mineral (16).

La translucidez de la zirconia es determinada por el tamaño de las partículas, el contenido ítreo con el cuál es reforzada para lograr su estabilización y la cantidad de impurezas (17). El tamaño de las partículas de zirconia tiene un efecto directo sobre la dispersión de la luz. Las partículas de zirconia son de alrededor de 400 nm, mientras que la longitud

de onda de la luz es de 400-700 μm , ocasionando que la luz se disperse y no logre atravesar el material, por lo tanto, debe evitarse este rango de tamaño de partículas. Se ha logrado mejorar su traslucidez aumentando el tamaño de las partículas a 15-30 μm logrando un 90% de traslucidez en 1 mm de grosor, y también disminuyendo el tamaño de estas a 70-82 nm. El tamaño de las partículas de zirconia afectan directamente a la resistencia del material, aumentando hasta los 1000 MPa con partículas de 900-1400 nm y disminuyéndolo a 650 MPa cuando encontramos partículas de 1800 nm (14,18).

Normalmente encontramos zirconia con 5.7% de peso de contenido ítreo y una fase tetragonal arriba de 90%. Se ha comprobado que aumentar el contenido ítreo aumenta la cantidad de fase cúbica, disminuye la cantidad de fase tetragonal y esto aumenta directamente la traslucidez del material. Las impurezas de la superficie de zirconio afecta en gran nivel la traslucidez del material debido a la diferencia entre los índices de refracción entre el aire y el zirconio (14,15,19,20).

3.1.3 Implantes y aditamentos protésicos de zirconia

El dióxido de zirconio tetragonal estabilizado con itrio (Y-TZP) se considera una buena alternativa a los implantes de titanio debido a sus propiedades mecánicas, así como una respuesta positiva con los osteoblastos en cuanto a su adherencia y proliferación. Además de estas características, las superficies de zirconia son resistentes a agresiones por agentes químicos, y es por ello que pueden someterse a tratamientos de superficie para aumentar su biocompatibilidad (2,21). Los aditamentos fabricados en zirconia han demostrado ser biocompatibles, tener menor adhesión de bacterias y no sufren de corrosión ni choques galvánicos. Los aditamentos protésicos de zirconia son una excelente solución a los problemas estéticos en sector anterior en pacientes con fenotipo delgado que permiten la visibilidad de un color oscuro a través de los tejidos blandos, correspondiente a los aditamentos de titanio. Frecuentemente los implantes se insertan sumergidos para evitar la visibilidad del margen de la restauración, esto, aumentando el riesgo de inflamación por exceso de cemento en el área submucosa (5,22–24). Actualmente no hay disponibles aditamentos angulados de zirconia que permitan la corrección de la alineación de los implantes. Gracias a la implementación de la tecnologías asistidas por computadora es posible personalizar aditamentos que puedan

ser atornillados al implante en una porción cervical y estar en contacto con la gíngiva, y otra porción oclusal, la cual está destinada para la restauración final (25).

3.1.4 Sellado biológico

Los primeros estudios que describen una unión entre el diente y el epitelio fueron descritos durante la primera mitad del siglo pasado, pero esta unión más tarde es definida por Cohen como “espacio biológico” hasta el año 1962. Siendo dentro de este complejo el epitelio de unión quien da esa inserción entre diente y tejido blando. El epitelio de unión está compuesto por epitelio escamoso, estratificado no queratinizado. Está conformado por queratinocitos (capa basal y estrato espinoso) y otras células (no queratinocitos o células claras) como son melanocitos, células de Merckel, linfocitos T y B, macrófagos y polimorfonucleares. Es más grueso en su zona más coronal (15-20 capas celulares), que, en su zona basal, es donde se producen las mitosis. Desde ahí las células migran hacia el surco gingival (el suelo de la hendidura está constituido por los elementos superiores del epitelio de unión). La adherencia epitelial real al diente es efectuada por las hemidesmosomas ubicados en la lámina basal interna, que se adhieren a la superficie del esmalte por encima de la unión cemento-esmalte. La adhesión con el tejido conectivo gingival se realiza por medio de la lámina basal externa (26).

3.1.5 Integración con los tejidos blandos

La interfaz implante-aditamento es un complejo que juega un papel importante en el mantenimiento de la salud periimplantar. Los implantes dentales no solo requieren de un proceso de osteointegración, sino que, también requieren un sellado estable de los aditamentos protésicos con los tejidos blandos. La calidad de este sellado depende del material y las características de la superficie del aditamento, la calidad de los tejidos blandos y de la profundidad del implante. Por lo cual, es crucial mejorar las interacciones entre los aditamentos de los implantes y los tejidos adyacentes. Los tejidos periimplantares deben sellar adecuadamente con el complejo implante-aditamento para evitar el paso de microorganismos (24,27,28). Estudios anteriores han demostrado un flujo sanguíneo similar en los tejidos gingivales alrededor de un diente natural y de aditamentos de zirconia, comparado con otros materiales (29).

La calidad del sellado biológico logrado en un implante es distinta al de un diente natural, esto es debido a que el epitelio que contacta el implante no es queratinizado a nivel de la lámina basal y hemidesmosomas. Además, las fibras de colágeno del tejido conectivo periimplantar tienen una distribución circular u oblicua respecto a su superficie conformando un menor sellado comparado con la disposición perpendicular de las fibras de Sharpey hacia las superficies dentales (30).

Cuando la superficie de zirconia entra en contacto con las células epiteliales, contiene hemidesmosomas, que actúan como una especie de pegamento para el tejido en contacto con las proteínas. Este epitelio conectivo consta de una capa longitudinal de 3 o 4 células que se extiende aproximadamente 2 mm longitudinalmente y aprox. 1,5 mm apicalmente (28). Ciertas proteínas han sido identificadas por su importancia en la adhesión de tejidos, como la laminina, que conecta la lámina basal con la membrana celular, y la fibronectina, que se encuentra muy por fuera de la lámina basal (29). El microespacio entre la mucosa y el implante es de 100 μm , pero existen áreas donde este espacio se reduce a 15 nm, denominada zona de adhesión focal, donde se encuentran presentes grandes cantidades de actina en el citoplasma adyacente (30). Estos filamentos de actina se unen indirectamente a la matriz extracelular a través de proteínas de adhesión transmembrana como las integrinas y proteínas de unión específicas como la vinculina. La presencia de vinculina provoca una fuerte adhesión de la molécula a la matriz (31).

Después de la colocación del implante y la inserción del pilar del implante (zirconia), la encía marginal a menudo se irrita o se lesiona y tiene que regenerarse. Dentro de la primera fase de la regeneración de tejidos blandos, los fibroblastos migran hacia el área de la herida y producen la matriz de colágeno subyacente. En un siguiente paso, los queratinocitos migran sobre esta matriz de colágeno y crean la capa de queratinocitos epitelial de cobertura que influye principalmente en la estética. Esta capa de queratinocitos también tiene una función de barrera entre los tejidos blandos orales y la cavidad bucal. Idealmente, esta barrera se adhiere también a la superficie de los pilares del implante (zirconia), ya que esto crea una barrera periimplantar que protege la conexión implante-pilar y, en consecuencia, el hueso periimplantar contra bacterias exógenas y nocivas. Esto toma mayor importancia cuando utilizamos implantes Bone-

Level cuando se colocan aditamentos de zirconia, los cuales, están en contacto directo con los tejidos blandos. La ausencia de esta barrera periimplantar podría resultar en general en el desarrollo de periimplantitis, pérdida ósea y tal vez también en una falla temprana del implante.

3.1.6 Adherencia de los fibroblastos a la superficie de zirconia

La adhesión del tejido conectivo de la encía a la parte transmucosa de los implantes (aditamentos), juega un papel importante en la formación y mantenimiento de un adecuado sellado entre el medio oral y el hueso periimplantar. Esta interfaz del tejido conectivo, con los fibroblastos en particular funciona como una barrera contra la migración apical del tejido conectivo y previene la invasión bacteriana que puede ocasionar una recesión o una formación de bolsa, inflamación, resorción del hueso marginal y la consecuente pérdida del implante (5,6,28,31).

Evidencia ha demostrado que las características de la superficie de los aditamentos protésicos pueden afectar el comportamiento epitelial, alrededor de la interfaz implante-aditamento, así como el sellado, la proliferación y la adhesión celular. De acuerdo con múltiples estudios en humanos y animales, la rugosidad de la superficie en una cantidad de (rugosidad de superficie) $R_a=0.2 \mu\text{m}$ es necesaria para lograr un óptimo sellado aditamento-tejido blando, donde, las superficies lisas pueden resultar en una adhesión no deseada y una migración epitelial de las células (32,33).

Las superficies de los aditamentos protésicos pueden ser modificados con el uso de grabado ácido, pulido y arenado. El baño con hidroxiapatita, plasma u óxido de aluminio y el grabado ácido se encuentran dentro de las técnicas más utilizadas el tratamiento de superficie para aumentar la biocompatibilidad de los implantes. Además del tratamiento de la superficie, el tipo de aditamento también puede afectar la reacción o el comportamiento de los fibroblastos gingivales humanos (34–36) .

Zhu y cols., afirmaron que cambiar la topografía del sustrato aumenta la distribución y la migración de las células y disminuye los contactos focales entre las células. Esto promueve la tasa de mitosis y proliferación celular, mejorando la adhesión celular al sustrato. Las células planas y elongadas con pseudópodos pueden aumentar la calidad y cantidad del hueso adyacente al cuello del implante (35).

La humectabilidad de la superficie es un factor que también determina la preferencia de la adhesión celular, a través de la regulación de las cantidades de proteínas absorbidas en la superficie (37). De acuerdo con una revisión sistemática del 2021 por Paul S, existe mejor adherencia y proliferación celular a superficies hidrofílicas (28).

3.1.6 Cultivos celulares

El cultivo celular es una técnica en la cual, con una compleja combinación de nutrientes y factores de crecimiento en conjunto con el medio ambiente, pueden favorecer al crecimiento de células nuevas. Los nutrientes difieren entre una línea celular y otra, al igual que el pH, aunque la elección del medio no es crítica siempre y cuando se mantenga constante. Así que, teniendo un control de todas estas variables se puede optimizar las probabilidades de éxito (38). Estos cultivos pueden obtenerse a partir de tejidos, biopsias y otras células ya cultivadas. Las células cultivadas a partir de un tejido se conocen como cultivo primario. El cultivo primario puede ser producido permitiendo que las células migren fuera del tejido después de una disección estéril, ya sea por adherencia un sustrato o disgregando el tejido mecánica o enzimáticamente para producir la suspensión normalmente heterogéneas de células. Estas células son más representativas del tejido, aunque no todas logran sobrevivir reproducirse *in vitro*.

Una vez que las células hayan alcanzado una confluencia, se transfieren y diluyen a un segundo recipiente dissociando las células de la monocapa con tripsina. Este subcultivo se logra lavando con PBS, añadiendo tripsina e incubando 2-3 minutos a 37°C. Posteriormente se centrifugan y se resuspenden en medio de cultivo (39–41).

Las líneas celulares son aquellas células que se pueden mantener y expandir mediante la transferencia a otros cultivos celulares. Estas líneas celulares se pueden dividir en tres tipos: definitivas, continuas y líneas de células madre (39). Las características del crecimiento celular están determinadas por la generación de la curva de crecimiento. Cuando las células son plantadas inicialmente entran en un periodo latente de no crecimiento, conocido como periodo estacionario, el cual, dura de 2-24 horas y permite que se recuperen de la tripsinización, reconstruir su citoesqueleto, liberar moléculas de adhesión y reiniciar el ciclo celular. Después entran una fase de crecimiento exponencial,

donde la población celular se duplica definitivamente. Al alcanzar confluencia, las células entran en una etapa estacionaria y dejan de reproducirse. Las células pueden subcultivarse preferiblemente antes de que alcancen la etapa estacionaria para que puedan tener mayor factor de crecimiento (42).

Los fibroblastos gingivales humanos son las principales células que constituyen los tejidos gingivales y son células similares a las embrionarias con la capacidad de autorenovarse. Poseen también capacidades inmunomoduladoras asociadas a la secreción de citoquinas antiinflamatorias. Al producir citoquinas son capaces de promover procesos de destrucción celular y procesos de reabsorción ósea. Estas características las han llevado a estas células a ser utilizadas para la reparación tisular y regeneraciones (43–45).

Los cultivos de fibroblastos gingivales humanos se llevan a cabo en condiciones que asemejen el medio bucal, el tejido gingival puede ser extraído de pacientes sanos y almacenado inmediatamente en un medio de transporte a 4°C y sellado herméticamente. Se manipulan en un ambiente estéril dentro de una campana de extracción de gases. El medio Eagle modificado de Dubelcco (DMEM) es el más utilizado para cultivos celulares. Las células se cultivan en una incubadora a una temperatura de 37 °C bajo 5% de CO₂. El cultivo se debe suplementar con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico, el cual puede ser: 500 g/ml de gentamicina (Gibco), 100 IU/ml penicilina -100 g/ml estreptomina (Lonza, Verviers, Belgium) and 25g/ml anfotericina B (Gibco) (46).

3.1.7 Evaluación de la citotoxicidad *In vitro* según la ISO 10993-5

La evaluación citotóxica es una vía sencilla, rápida y económica para obtener información acerca de la biocompatibilidad de los biomateriales, y presenta una precisión del 97% con los ensayos de implantación. Estos métodos utilizan tejidos celulares *in vitro* para visualizar el crecimiento celular, reproducción o efectos morfológicos. Recientemente se ha logrado la detección de daño celular por cambios morfológicos, medir el crecimiento celular y propiedades metabólicas.

Según la parte 5 de la regla ISO 10993-5, se pueden emplear tres pruebas: la citotoxicidad por contacto directo, en la cual, se realizan tinciones con colorantes vitales, el método por contacto indirecto, el cual utiliza un medio con contenido en agar

(obteniendo un medio fresco en gel), y la prueba de extracción, que es una técnica que mide el metabolismo celular gracias a la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial (47–49).

El método por contacto directo permite medir la citotoxicidad cualitativa y cuantitativamente. Se requiere colocar una suspensión celular en contacto con la muestra. Se incuba un cultivo a 37°C con o sin dióxido de carbono hasta obtener subconfluencia. Se descarta el medio de cultivo fresco y se coloca una muestra del material a observar en contacto con las células. Se incuba durante 24hrs con las condiciones ya mencionadas, se descarta el medio de cultivo antes de añadir químicos para determinar la citotoxicidad.

La prueba de citotoxicidad por contacto indirecto permite resultados cualitativos. Se colocan suspensiones celulares en distintos recipientes, distribuyéndolas de manera horizontal. Se cultivan a 37°C con CO₂ hasta alcanzar subconfluencia. se descarta el medio de cultivo del recipiente y se realiza una mezcla del medio de cultivo con suero de agar para obtener una masa con una concentración de 0.5-2%. Se llevan a esta mezcla las muestras a analizar y se cultivan bajo las mismas condiciones durante 24-72 horas. Se añade una tinción vital para la detección de citotoxicidad.

La tercer técnica mencionada permite medir la citotoxicidad de forma cualitativa y cuantitativa. Necesitamos un cultivo de monocapa con las condiciones antes mencionadas hasta alcanzar subconfluencia. Se retira el medio de cultivo y se añade una alícuota en un recipiente. Se cultivan bajo las mismas condiciones y se determina la citotoxicidad a las 24 horas (47–49).

Tabla 1. Clasificación del grado de reactividad de las pruebas de citotoxicidad según la Norma ISO 10993-5.

Grado	Reactividad	Descripción de la zona de reactividad
0	Ninguna	Zona no detectada debajo o alrededor del espécimen
1	Leve	Algunas malformaciones o degeneraciones celulares bajo el espécimen
2	Media	Zona limita al área del espécimen
3	Moderada	Zona extendiéndose hasta 1.0 cm del espécimen
4	Severa	Zona extendiéndose más de 1.0 cm del espécimen

Los niveles de reactividad celular a biomateriales en contacto directo deben ser evaluados mediante la tabla 1 (49).

La zirconia utilizada en las pruebas para este estudio serán en sus presentaciones KATANA de Kuraray (STML), KATANA de Kuraray (UTML) y KATANA Kuraray (HT). Estos materiales presentan diferentes características físicas y mecánicas, como distinto nivel de traslucidez (50).

3.2 Antecedentes específicos

Yoichiro Ichicawa y cols. en 1992 realizaron un estudio donde colocaron fragmentos de zirconia subdérmicamente en ratas Wistar de 8 semanas de edad. Observaron que a los 3 meses, los fragmentos de zirconia habían sido encapsulados por fibroblastos, a los 6 meses después del estudio la cápsula seguía ahí y no se encontraron con ninguna reacción inflamatoria (51).

Miao Zheng et al. En 2015, evaluaron la presión atmosférica y el plasma frío colocado en un disco de zirconio y su efecto en los fibroblastos humanos. Las muestras de zirconio utilizados se fresaron a un diámetro de 20 mm por un espesor de 2 mm y se sometieron a tratamiento con plasma y helio durante 30, 60 y 90 segundos. Como resultado, el ángulo de contacto disminuyó de 78.31° a 43.71° después del tratamiento. Encontraron un aumento en la densidad de fibroblastos en todas las áreas tratadas, especialmente en aquellas tratadas durante 60 segundos. En los grupos expuestos a 30 s y 60 s durante

3 h en cultivo y 24 h, los genes expresados aumentaron significativamente durante la adhesión de fibroblastos (52).

Alberto Sicilia y cols., en 2015 realizaron tres revisiones sistemáticas que presentaron en la cuarta reunión de la EAO (European Association of Osseointegration) como recomendaciones clínicas concluyeron que no hay evidencia que confirme que los aditamentos de zirconia reduzcan la acumulación de placa dentobacteriana y no hay diferencia significativa en el sangrado gingival entre aditamentos de Zr y de Ti. Determinaron también, que la zirconia tiene ventajas desde el punto de vista estético, mencionando que sería importante comparar aditamentos de Zr con otros materiales como zirconia modificada en color (53).

F. Nothdurf y cols., En 2015 realizaron un estudio con diferentes superficies en pilares de zirconio y titanio que fueron maquinados, pulidos y arenados. El análisis topográfico y los cálculos del ángulo de contacto se realizaron mediante espectroscopia de rayos X de dispersión de energía. Cultivaron fibroblastos humanos y células epiteliales en las muestras, las evaluaron y contaron después de 24 y 72 horas mediante estudios de imágenes de fluorescencia. La abundancia de la proteína de adhesión focal vinculina se analizó por inmunohistoquímica. Los resultados mostraron que hubo más dispersión en la superficie de zirconio y que los fibroblastos se adhirieron mejor a las superficies pulidas y maquinadas que a las superficies pulidas con chorro de arena (54).

Fischer y cols., en 2017 compararon la adhesión de fibroblastos humanos en diferentes niveles de pulido utilizando una casa comercial. Los resultados mostraron que, a largo plazo, se extendieron más fibroblastos en la superficie más lisa porque la superficie de control se desempeñó mejor al comienzo de la prueba (49).

En 2018 Brito da Cruz y cols., compararon el comportamiento de los osteoblastos y fibroblastos gingivales humanos cuando se exponen a PEEK, zirconia y titanio. Cada grupo consistía en 16 discos con un diámetro de 8 mm y un espesor de 3 mm. Se llevaron al alto brillo puliendo con óxido de aluminio. Posteriormente se lavaron en una tina de ultrasonido en una solución de 5% HNO₃, 10% HF y 85% agua bidestilada. Se arenaron las muestras con óxido de aluminio de 100 µm. Finalmente, las muestras se esterilizaron. Se cultivaron fibroblastos gingivales humanos en placas durante 14 días. La morfología y la adhesión celular se evaluaron mediante microscopía electrónica. Los resultados

mostraron que los osteoblastos y fibroblastos proliferaron más en las superficies de PEEK y zirconia en comparación con las de titanio. Esto se debe a la mayor humectabilidad de estas superficies en comparación con el titanio (50).

Un estudio similar realizado en el 2015 por V. Ruktunas evaluaron el efecto del tratamiento con luz UV en discos de zirconia de diferente traslucidez, comparando la citotoxicidad y proliferación de fibroblastos gingivales humanos sobre las superficies de las muestras. Utilizando discos de zirconia HT (High Translucent, Katana, Kuraray) y UTML (Ultra Translucent Muti Layered, Katana, Kuraray), con el mismo protocolo de pulido y diferente tratamiento con luz UV, llegaron a la conclusión de que el tratamiento de superficie con luz UV aumenta la proliferación celular, siendo las muestras de zirconia de alta traslucidez la que mostró mayor proliferación a las 24 horas (16).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Posterior a la colocación de un implante y su rehabilitación protésica, se desea lograr una adecuada adaptación de los tejidos duros y blandos que lo rodean. Se ha comprobado que un adecuado sellado periférico periimplantar otorga un mejor pronóstico al implante, a su restauración y a los tejidos adyacentes. Así mismo, la interacción con los fibroblastos gingivales va a determinar la calidad del sellado, evitando la filtración bacteriana hacia la plataforma del implante. Recientemente se han introducido aditamentos protésicos fresados en zirconia y no se cuenta con evidencia científica suficiente en la cual comparen distintos niveles de traslucidez de zirconia y la viabilidad celular que estas puedan tener con los fibroblastos gingivales humanos.

4.1 Pregunta de Investigación

¿Existe diferencia en la viabilidad celular de fibroblastos gingivales humanos sobre diferentes niveles de traslucidez de zirconia *in vitro*?

5. JUSTIFICACIÓN

Es importante establecer las características óptimas de los materiales para lograr una mayor adaptación de los tejidos blandos en la zona en que el epitelio contacta el aditamento, puesto que un sellado de los tejidos con el complejo implante-aditamento nos ayuda a mejorar el pronóstico del tratamiento.

Actualmente no existe suficiente evidencia científica que comparen la compatibilidad celular de los tejidos blandos sobre estructuras de zirconia con distinta traslucidez.

El uso de cultivos celulares *in vitro* y la aplicación de tecnologías CAD/CAM facilita la obtención de resultados debido al control posible sobre las condiciones en las que se llevará este experimento.

Este estudio pretende determinar con base a los materiales modernos las características de la superficie de zirconia que tengan mejor adaptación y unión a los tejidos blandos para optimizar el sellado gingival al completo implante-aditamento. Esto influirá en la toma de decisiones clínicas respecto al proceso de rehabilitación de implantes utilizando aditamentos de zirconia en pacientes que requieran de mayores resultados estéticos.

6. HIPÓTESIS

Hipótesis Científica

Existe diferencia significativa en la viabilidad celular de fibroblastos gingivales humanos *in vitro* en superficies de zirconio de diferente nivel de translucidez.

Hipótesis nula

No existe diferencia significativa en la viabilidad celular de fibroblastos gingivales humanos *in vitro* en superficies de zirconio de diferente nivel de translucidez.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general.

Comparar de manera *in vitro* la viabilidad celular de fibroblastos gingivales humanos sobre los diferentes niveles de translucidez de zirconio.

7.2 Objetivos específicos

- Determinar en qué tipo de zirconio según su translucidez existe mayor adaptación celular de los fibroblastos humanos.
- Determinar en qué estrato del disco de zirconio existe mayor adaptación celular de los fibroblastos humanos.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Diseño del estudio

- Estudio *In vitro*
- Experimental
- Comparativo
- Prospectivo
- Longitudinal

8.2 Población y muestra

Muestreo por conveniencia: 30 discos fresados de zirconia de 2 mm de grosor x 8 mm de diámetro de la casa comercial Kuraray, de los cuales, 10 serán Katana STML (Super Translucent Multi Layered), 10 Katana UTML (Ultra Translucent Multi Layered) y 10 Katana HT (Hight Translucent) pulidos mecánicamente sin alcanzar alto brillo.

Cultivos celulares con 80% de confluencia.

8.3 Criterios de selección

8.3.1. Criterios de inclusión

Discos de zirconia:

- Que cumplan las dimensiones establecidas para el estudio.
- Que los discos sean pulidos de acuerdo con el protocolo establecido para este material.

Cultivos:

- Que el cultivo celular no haya sido contaminado durante el proceso.
- Que cumpla con las condiciones de incubación establecidas.

Pacientes donadores:

- Pacientes pertenecientes al mismo grupo de edad, sanos, sin enfermedad periodontal o algún proceso infeccioso.
- Pacientes que hayan aceptado la escisión quirúrgica de tejido gingival y que hayan firmado el consentimiento informado.

8.3.2 Criterios de exclusión

Discos de zirconia fracturados o dañados durante el estudio.

Cultivos que no cumplan con las condiciones de incubación o que hayan sido contaminados.

Pacientes que presenten algún padecimiento sistémico, local o que no firmen el consentimiento informado.

8.3.3 Criterios de eliminación

Discos de zirconio y cultivos que sufran daños durante el procedimiento

8.4 Tabla de definición y medición de variables

Tabla 2. Tabla de definición y medición de variables.

VARIBLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA	CATEGORIA	Análisis Estadístico
Traslucidez de la zirconia	Relación entre difusión de luz a través de un material.	Cualitativa, Nominal dicotómica	<ul style="list-style-type: none"> • Katana STML (Super Translucent Multi Layered) • Katana UTML (Ultra Translucent Multi Layered) • Katana HT (High Translucent) 	No Aplica
Capa del disco	Grosor de los discos de zirconio	Cualitativa Ordinal	<ul style="list-style-type: none"> • Esmalte • Capa de transición 1 • Capa de transición 2 • Cuerpo (Dentina). 	No Aplica

VARIABLES DEPENDIENTES	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA	CATEGORIA	
Proliferación celular	Cantidad de células encontradas en una determinada área de las muestras	Cuantitativa Razón continua	Número de células por milímetro cuadrado	Estadística descriptiva. ANOVA Post Hoc
Tamaño de las células	Longitud espacial que ocupa una célula	Cuantitativa Razón continua	µm	Estadística descriptiva. ANOVA. Post Hoc.

8.5 Concordancia y fiabilidad

El sábado 11 de junio de 2022 se tomó el curso “Técnicas básicas de cultivos de líneas celulares de mamífero.” En las instalaciones del Instituto nacional de ciencias médicas y nutrición Salvador Zubirán en la Ciudad de México.

Se toma en cuenta el tamaño de los fibroblastos, la forma de las células y la cantidad de células por campo. Estas características serán comparadas con un grupo control no expuesto al contacto con los materiales. Y serán evaluados y cuantificados por dos personas con entrenamiento previo para comparar resultados.

8.6 Ubicación espacio temporal

Los procedimientos se llevaron a cabo en la clínica de posgrado de rehabilitación oral de la FEBUAP, por el departamento de Fisiología celular de la FMBUAP y los discos fueron manufacturados por el laboratorio dental CERÁMICO S.A. de C.V. entre el mes de septiembre de 2022 y abril de 2023. El protocolo de cultivo primario fue determinado analizando la literatura publicada relevante que hayan realizado experimentos *in vitro* similares. Se probaron distintos métodos reportados en estudios *in vitro* hasta obtener una confluencia superior a 80% y una curva de crecimiento adecuada para desarrollar este estudio.

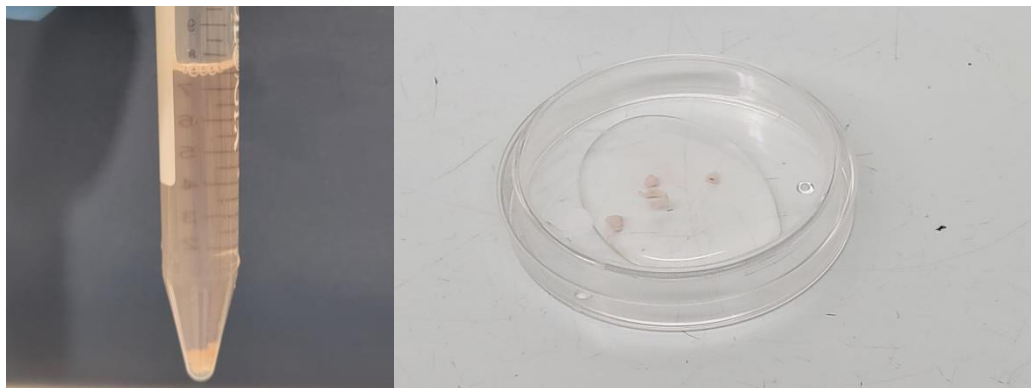
8.7 Aspectos éticos

Tanto como la recolección del tejido, como los experimentos, así como los desechos de los cultivos serán afectados bajo las indicaciones que la NOM-087-ECOL-SSA1- 2002 bajo los criterios del comité de bioética de la FEBUAP y de la FMBUAP. La obtención del tejido gingival se realizará con el consentimiento voluntario del paciente de acuerdo con el código de Nuremberg y a la declaración de Helsinki, y este será tomado por profesionales de la salud informando al paciente del procedimiento a realizar sin involucrar la salud de este. De la misma manera, cumpliendo con la Norma oficial mexicana NOM-012-SSA3-2012, que establece los criterios para la ejecución de investigaciones de la salud con humanos, otorgando al paciente una carta de consentimiento informado e informándole que la obtención del tejido gingival se realiza con el propósito de aportar conocimientos científicos en el área de la salud.

8.8 Procedimientos, técnicas y fuentes de recolección

8.8.1 Obtención de los fibroblastos gingivales humanos

1. La obtención del tejido gingival fue realizada en pacientes sanos, de una edad de entre 18-30 años, que hayan recibido una extracción dental y que hayan firmado el consentimiento informado.
2. Una vez extraído el tejido, es colocado inmediatamente en un medio de cultivo DMEM a temperatura ambiente y sellado herméticamente (Figura 1A).
3. Las muestras fueron transportadas al laboratorio dentro de las primeras 4 horas después de la obtención del tejido.
4. Dentro de una caja de Petri de 60 mm, las muestras fueron fragmentadas con una hoja de bisturí (Figura 1B).
5. Los explantes fueron lavados en cajas de Petri de 60 mm con solución salina amortiguada estéril (PBS) múltiples veces hasta observar que el tejido se encontrara libre de sangre y, que, al ser observado al microscopio, se detectara la menor cantidad de eritrocitos posible.



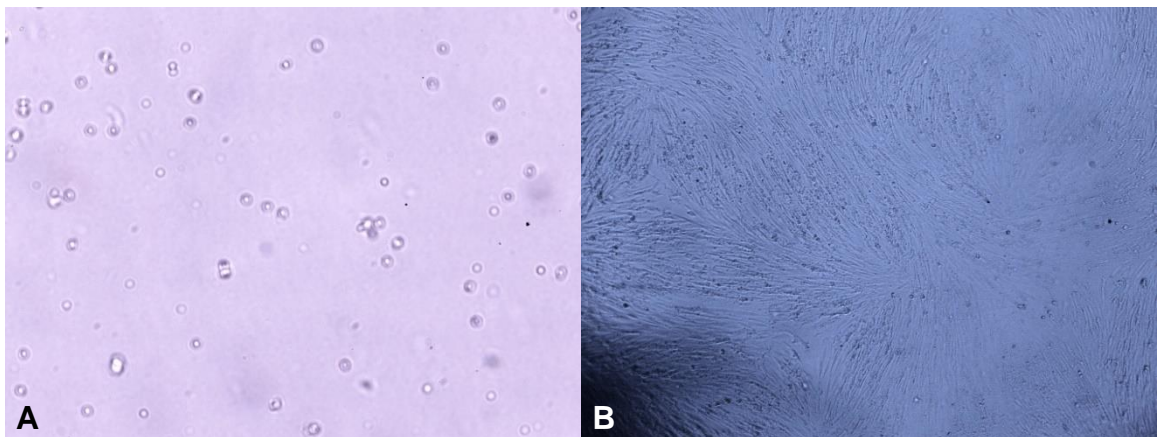
Imágenes propias

Figura 1. Obtención de tejido gingival y segmentación del tejido lavado en solución PBS.

(A) El tejido gingival obtenido del paciente fue transportado en un tubo de falcon de 15 ml sellado herméticamente y dentro de una caja con bolsas de gel congeladas para conservación del tejido.

(B) Se colocó el explante dentro de una caja de Petri de 60 mm y se lavó múltiples veces con solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) hasta que el tejido se observara libre de sangre. Posteriormente, fue fragmentado con una hoja de bisturí para sembrar lo restos de tejido en cajas de 6 pozos.

6. Los fragmentos de tejido y fibroblastos fueron suspendidos en medio de cultivo (DMEM) suplementado con solución de suero fetal bovino al 10% y 2% de antibiótico (500 g/ml de gentamicina, 200 IU/ml penicilina -200 g/ml estreptomina y 25 g/ml anfotericina B), obteniendo el cultivo primario.
7. Los fibroblastos suspendidos se transportaron a una placa de 6 pozos con medio DMEM suplementado, colocando 3 ml en cada uno de los pozos.
8. Se mantuvieron en un área estéril y se incubaron en una incubadora con cámara húmeda, a una temperatura de 37 °C y una atmósfera con 5% de CO₂.
9. Se mantuvo en observación el cultivo primario cada 24 horas bajo microscopio óptico, analizando que no estuviera contaminado el medio de cultivo y que haya presencia de células adheridas en el fondo de los pozos (Figura 2A).
10. Se cambió el medio de cultivo cada 72 horas, aspirando el medio de cultivo y desechándolo, para poder colocar medio de cultivo nuevo.
11. Al observar un cultivo con la confluencia deseada (Figura 2B), se retiró el medio de cultivo y se realizó un enjuague de los pozos con solución PBS estéril realizando movimientos circulares para limpiar por completo cada uno de los pozos.

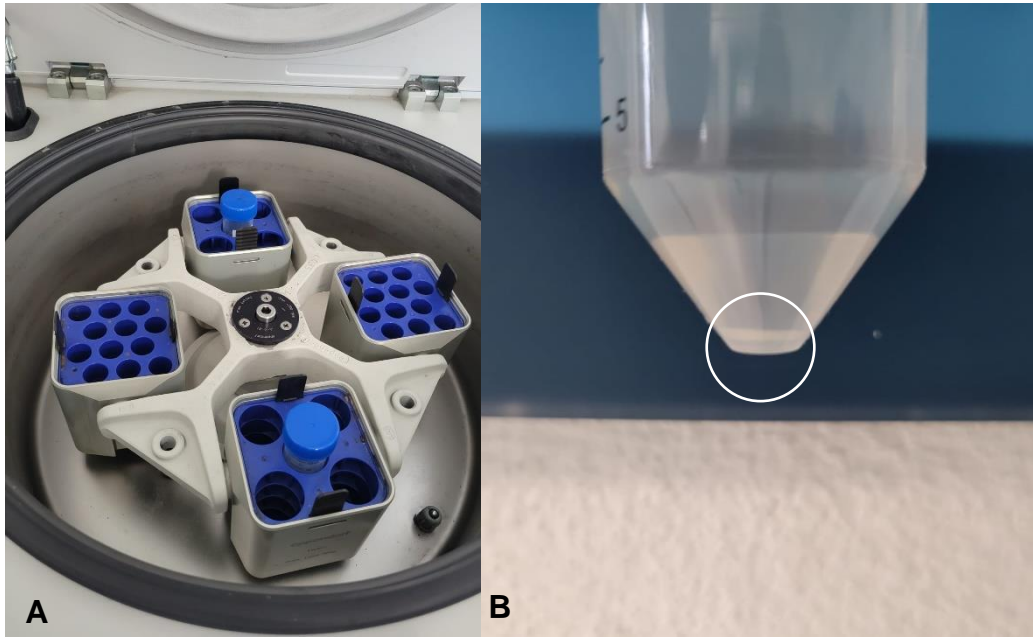


Imágenes propias

Figura 2. Fibroblastos gingivales humanos suspendidos en el medio de cultivo y fibroblastos gingivales humanos adheridos a la superficie del pozo. (A) Imagen de microscopio óptico donde se observan los fibroblastos gingivales humanos suspendidos en el medio de cultivo, caracterizándose por su forma circular con su centro iluminado. Al tratarse de un cultivo células bidimensional, si las células se mantienen en las condiciones *in vitro* adecuadas,

estas se adhieren al fondo del recipiente donde se encuentren almacenados, adquiriendo una forma fusiforme. (B) Después de alcanzar una confluencia del 100% se debe tripsinizar el recipiente para desprender las células, llevarlas a otro recipiente y así evitar la muerte celular.

12. Una vez lavados los pozos, se colocó tripsina para poder separar las células que habían sido adheridas al fondo del recipiente. Se realizaron movimientos circulares durante 3-5 minutos para desprender la mayor cantidad de células posibles.
13. Se revisaron en el microscopio todos los pozos para observar que las células se encuentren flotando en la tripsina.
14. Se sugiere que, en caso de haber células adheridas al fondo de los pozos, dar unos ligeros golpes en el fondo de cada uno de los pozos para así lograr que estas células puedan separarse.
15. Se colocó el doble de medio de cultivo DMEM suplementado para anular el efecto de la tripsina.
16. Se aspiró la solución de DMEM, tripsina y fibroblastos gingivales humanos y fue llevada a un tubo de falcon de 15 ml.
17. Se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm a 25°C (Figura 3A).
18. Retiramos el sobrenadante manteniendo la integridad de la pastilla formada (Figura 3B) por los fibroblastos en el fondo del tubo y se colocó medio de cultivo nuevo.



Imágenes propias

Figura 3. Centrifugado y pastilla de células. (A) Tubo de falcon de 50 ml con medio de cultivo y fibroblastos obtenidos de los cultivos celulares tripsinizados, colocado en centrifugadora con contrapeso para obtener una (B) pastilla de células posterior al proceso de centrifugado (indicado dentro del círculo blanco).

19. Se resuspendió el medio de cultivo para integrar las células con el medio de cultivo nuevo.
20. Se tomaron 45 μ l del tubo para mezclarlo en un vial con tripán azul y solución PBS estéril.
21. Se llevó 100 μ l del vial teñido a una cámara de Neubauer para realizar conteo de fibroblastos en 5 cuadrantes (4 esquinas y cuadrante central) bajo microscopio óptico y se calculó el número de células con la siguiente fórmula:

$$\text{Numero de células}/\mu\text{l} = (\text{Número de células} \times 0.5) \times 10$$
22. Una vez obtenido el número de células, se calculó el número de células por μ l.

8.8.2 Determinación del número de células óptimo

1. Se sembraron en una caja de 6 pozos, 5×10^3 , 7×10^3 y 9×10^3 células por duplicado con 3 ml de medio DMEM suplementado (Figura 4A).
2. Se observó cada uno de los pozos para confirmar que se encuentre mayor cantidad de células en los últimos dos pozos.

3. Se incubaron durante 72 horas.
4. Los pozos fueron observados en el microscopio óptico cada 24 horas hasta alcanzar una confluencia aproximada del 80%.
5. Se realizó cambio de medio de cultivo cada 72 horas.

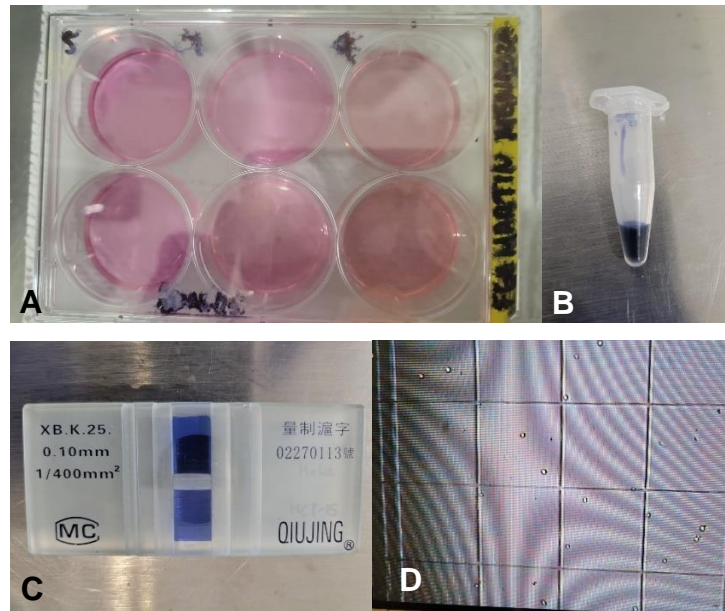


Figura 4. Cultivos de fibroblastos por duplicados y proceso para conteo celular. (A) Caja de 6 pozos con 3ml de medio DMEM suplementado y duplicados de 5×10^3 , 7×10^3 y 9×10^3 fibroblastos gingivales humanos. Tinción de tripán azul, solución PBS y medio de cultivo con fibroblastos para cultivo celular (B) para posteriormente realizar un conteo celular en microscopio óptico en una cámara de Neubauer (C y D).

6. Una vez alcanzada la confluencia deseada, se aspiró el medio de cultivo en cada uno de los pozos y se llevó la solución de cada duplicado a un tubo de falcon de 15ml.
7. Los tubos fueron centrifugados a 1500 rpm a 25°C durante 10 minutos.
8. Transcurrido el tiempo de centrifugado, se aspiró el medio de cultivo de cada pozo manteniendo la pastilla de células en el fondo de este y se agregaron 3ml de DMEM a cada uno de los tubos.
9. Se resuspendió el medio para recuperar los fibroblastos.



Figura 5. Cultivos celulares en cajas T25. Las células que no hayan sido utilizadas para los conteos celulares realizados fueron almacenadas en cajas T25 hasta determinar la cantidad a utilizar después de analizar las curvas de crecimiento de las diferentes concentraciones de fibroblastos.

10. En un vial, se realizó una solución con 10µl de medio de cultivo con fibroblastos, 45 µl de tripán azul y 45 µl de solución PBS (Figura 4B).
11. Se realizó conteo celular por cada uno de los tubos (Figura 4 C y D).
12. Las células que no fueron utilizadas se almacenaron en cajas T25 y fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂ (Figura 5).
13. Una vez transcurridas las 72 horas, se realizó el conteo celular por tubo y se calcula que concentración celular tubo mayor tasa de crecimiento (Figura 6).
14. Se determinó sembrar 7×10^3 células en cada pozo, debido a que fue la concentración que mostró mayor curva de crecimiento.

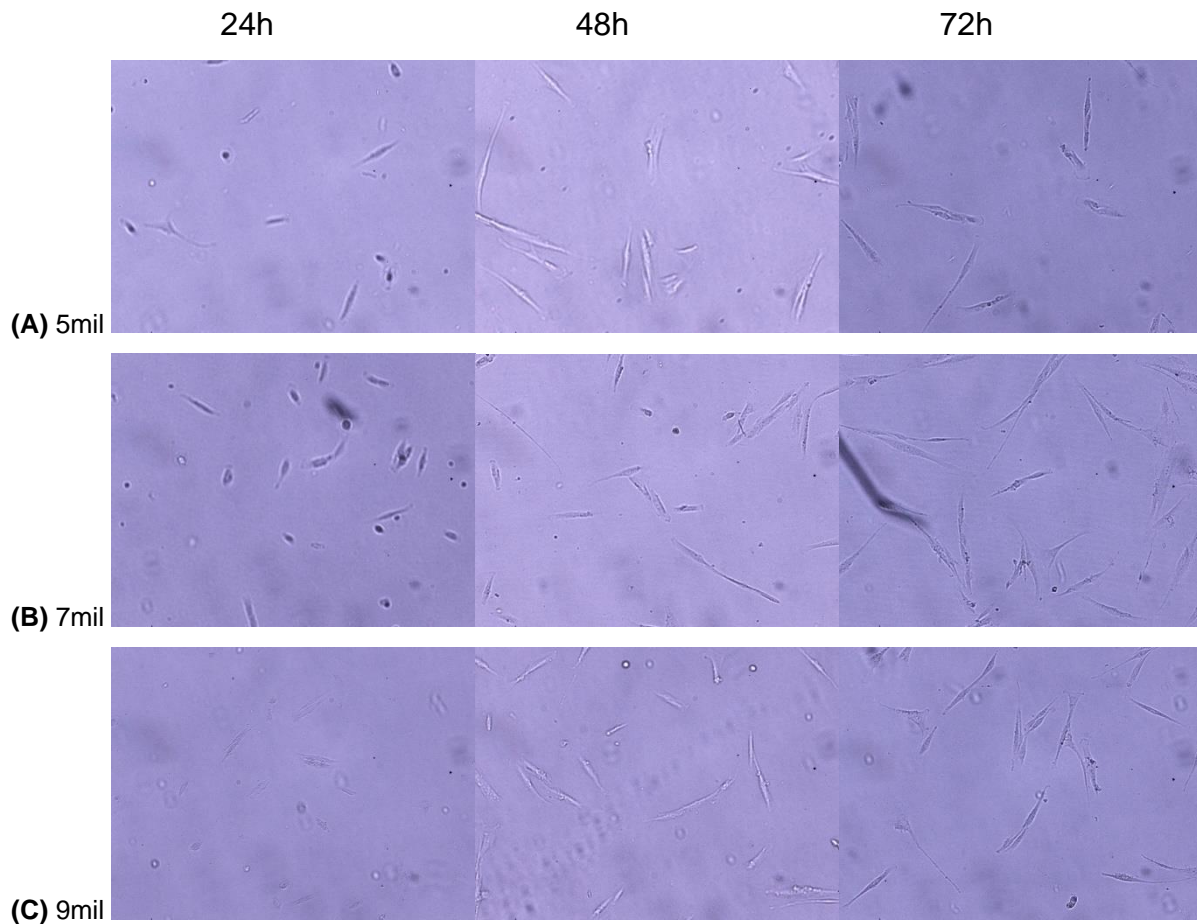


Figura 6. Imágenes de microscopio óptico de los cultivos celulares con 5×10^3 , 7×10^3 y 9×10^3 . Cultivos celulares realizados para determinar que concentración celular tiene la mayor curva de crecimiento. Fueron sembrados 5×10^3 (A), 7×10^3 (B) y 9×10^3 (C) fibroblastos en duplicados en cajas de 6 pozos y se observaron cada 24 horas durante 3 días para obtener las capturas del microscopio óptico. Una vez cumplidas las 72 horas se realizó un conteo celular en una cámara de Neubauer para elegir la concentración más viable para realizar el estudio.

8.8.3 Discos de zirconio

1. Fueron diseñados los discos de zirconio en Meshmixer con un diámetro de 8mm y 2 mm de grosor, posteriormente, se exportó el archivo STL para ser enviado al laboratorio que procesó las muestras (Figura 7).
2. Las muestras de Zirconio fueron fresadas por tecnología CAD/CAM en una fresadora Ceramill motion 2 (Amann Girrbach, Austria) (Figura 8 A y B).

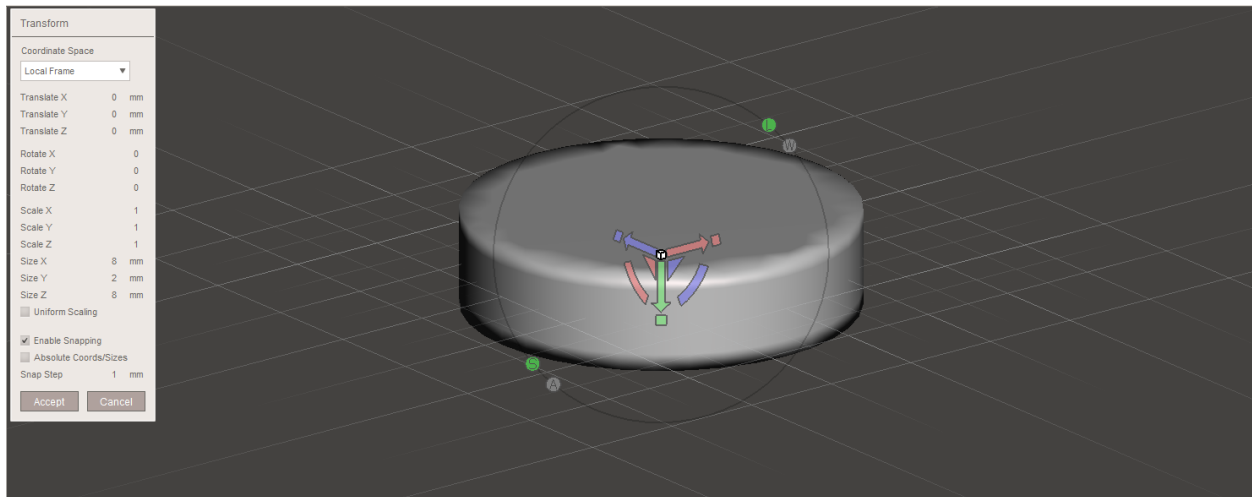
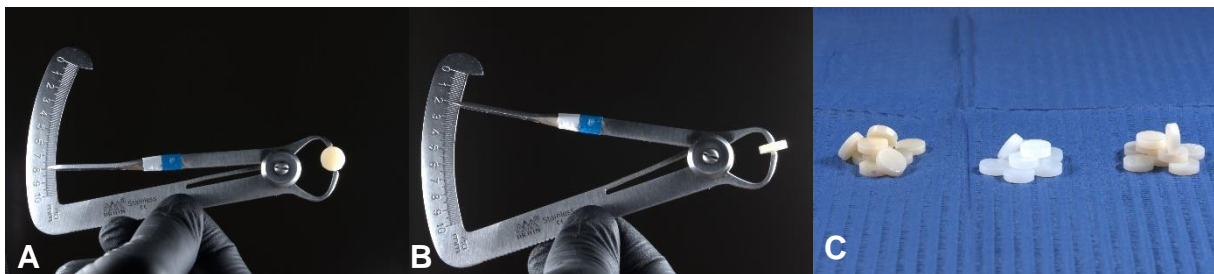


Imagen propia

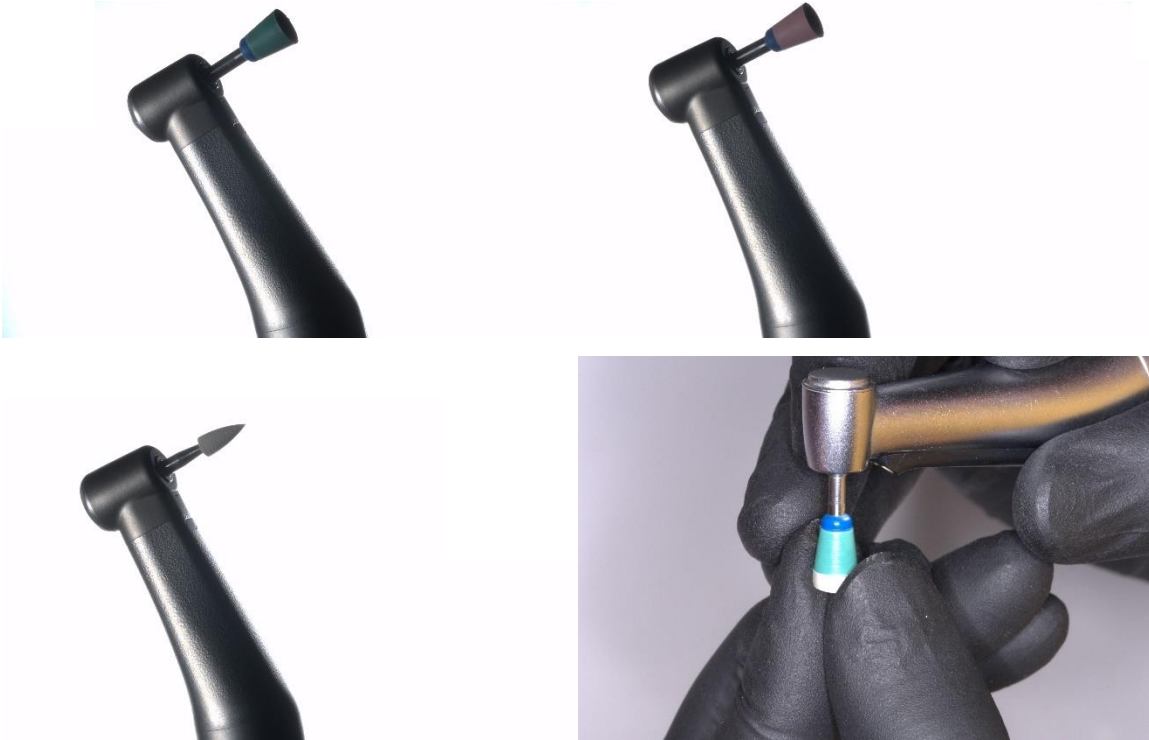
Figura 7. Diseños de los discos. Diseño de la muestra en el software Meshmixer para poder ser enviada al técnico de laboratorio y maquinada, sinterizada y pulida para confirmar que cumpla con las dimensiones una vez que se termine el proceso.

3. Los discos obtenidos se sinterizaron en un horno Zirkonofen 600 (Zirkonzahn, Italia) a 1550°C durante 2 horas con una tasa de programación de 10°C/min, siguiendo las indicaciones del fabricante (Figura 8C).
4. Los discos fueron pulidos con el protocolo de pulido de 3 pasos para zirconia de SS White (Filadelfia, Estados Unidos) (Figura 9).



Imágenes propias

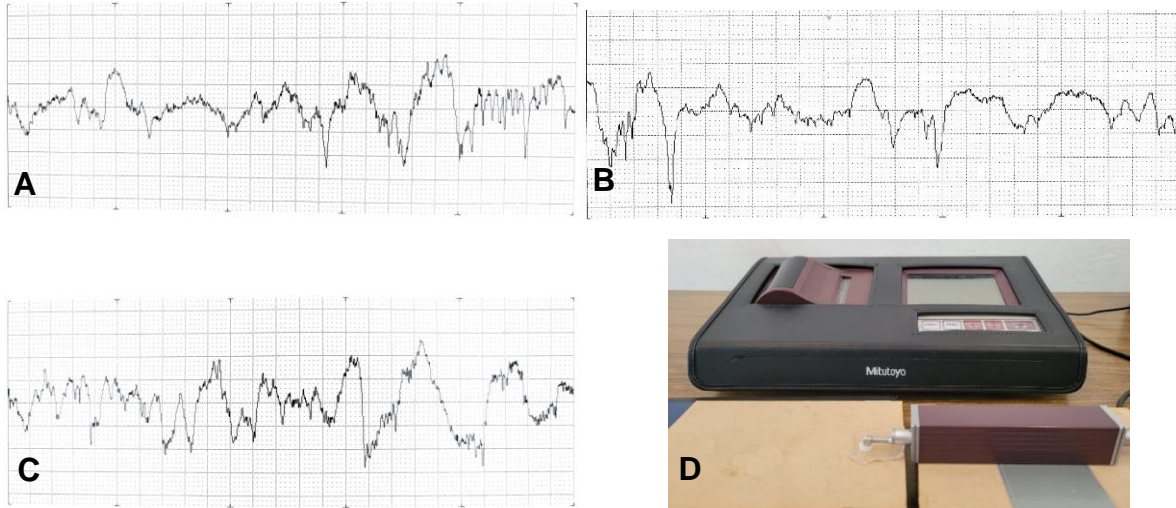
Figura 8. Calibración de las muestras. Se maquinaron 4 muestras para realizar pruebas piloto. Estas muestras fueron calibradas para verificar que cumplan con las dimensiones y características establecidas para realizar este estudio (A y B). Una vez confirmadas las dimensiones de las muestras piloto, se fresaron los discos de los 3 grupos a utilizar en este estudio (C).



Imágenes propias

Figura 9. Protocolo de pulido. Fresas pulidoras de baja velocidad de la casa comercial SS White con protocolo de 3 pasos.

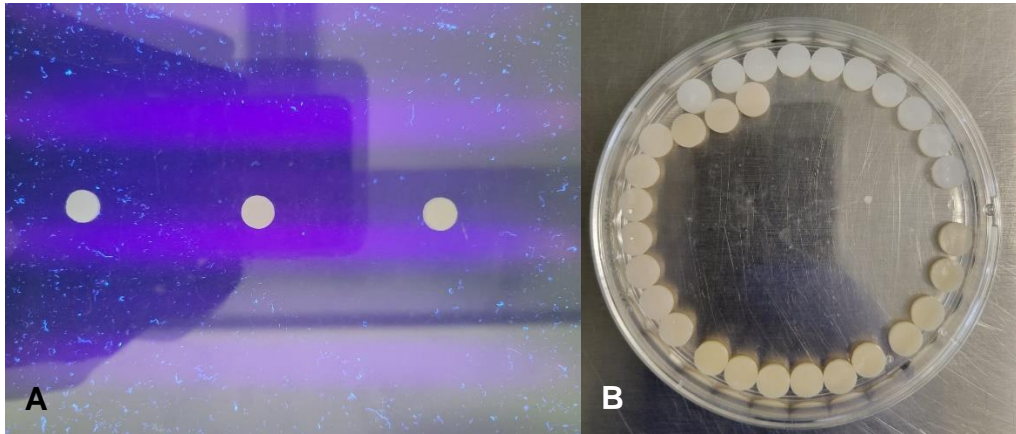
5. Posteriormente, fueron llevados a un perfilómetro (Figura 10) para medir la rugosidad en 3 puntos aleatorios en cada una de las muestras para obtener un promedio de su rugosidad R_a y se capturaron los resultados en una tabla de Microsoft Excel.



Imágenes propias

Figura 10. Resultados de las pruebas del perfilómetro. Impresión del resultado de una muestra del grupo (A) UTML, (B) STML y (C) HT. (D) Disco de zirconia colocado paralelamente bajo la punta del perfilómetro Mitutoyo SJ-301 (Japón). Las muestras de zirconio fueron llevadas al rugosímetro de manera paralela y centradas para permitir el correcto funcionamiento del dispositivo (Imagen 1). Se colocó una longitud de desplazamiento (λ_c) de 0.25 mm, obteniendo en quintuplicado ($\lambda_c \times 5$) una longitud total de 1.25 mm. Se analizaron 3 puntos aleatorizados entre ambas caras de cada disco y los resultados fueron llevados a una tabla de Microsoft Excel, obteniendo una R_a promedio a partir de las 3 medidas. Como se muestra en la tabla 4, el grupo UTML tuvo una R_a promedio de 0.1853 μm , mientras que, los grupos STML y HL tuvieron una R_a promedio de 0.2153 μm y 0.1753 μm respectivamente.

6. Los discos se llevaron a una lámpara de luz UV para ser observados e identificar si contaban con fluorescencia intrínseca, lo cual nos impediría ser analizados bajo el microscopio de fluorescencia (figura 11A).
7. Todos los especímenes se sometieron a una limpieza con alcohol isopropílico al 70% durante 10 minutos y esterilizados en bolsas herméticas en autoclave durante 10 minutos a 135°C (figura 11B).



Imágenes propias

Figura 11. Discos de zirconia en luz UV y lavado en alcohol isopropílico. Discos de zirconia sometidos a la aplicación de luz UV para identificar si tienen fluorescencia intrínseca (A), después fueron llevados a una caja de Petri de 60 mm con alcohol isopropílico al 70% (B).

8.8.4 Pruebas piloto para estandarización

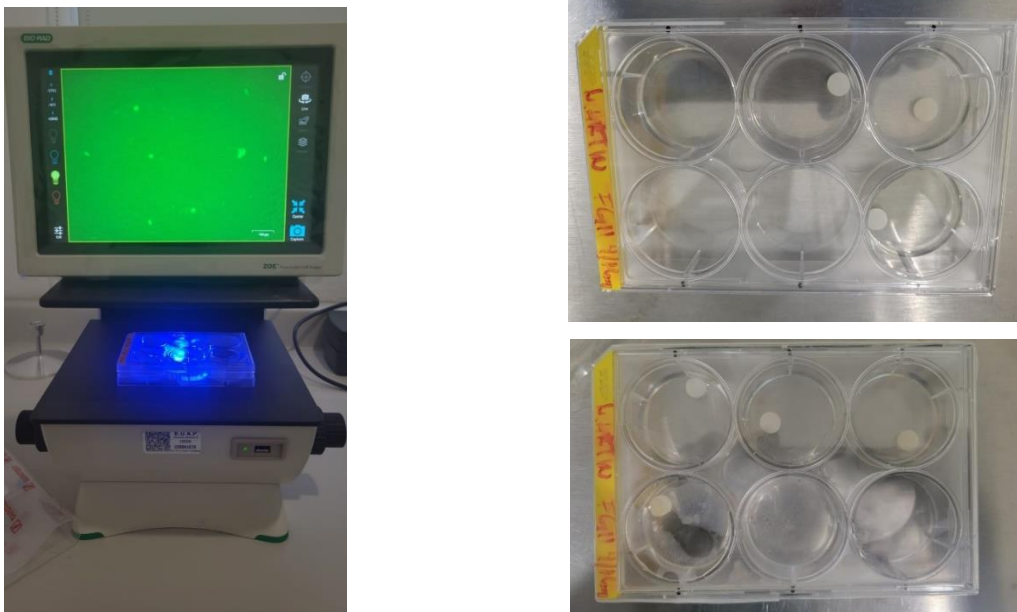
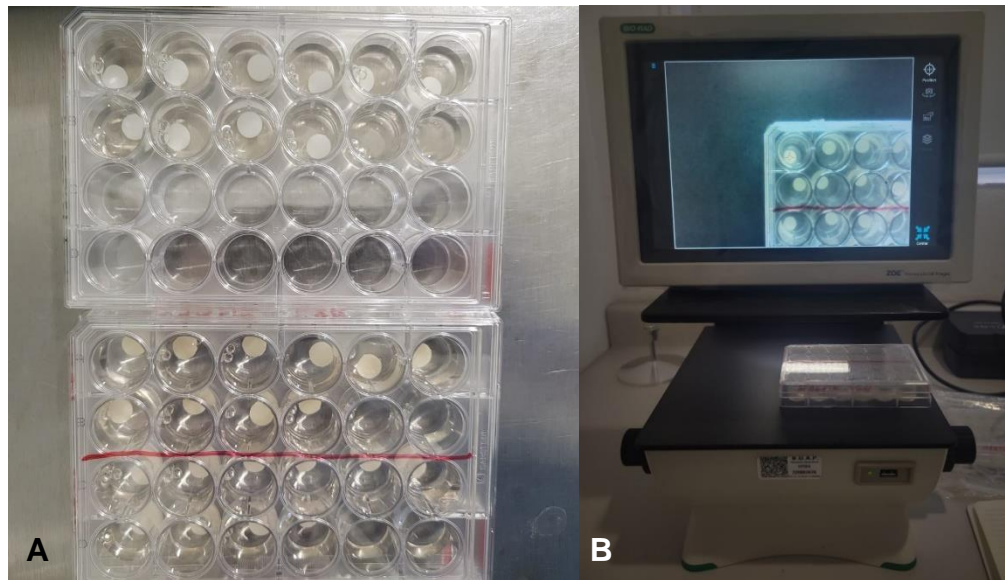


Figura 12. Microscopio de fluorescencia y discos de zirconia en medio de cultivo. Previo a realizar las pruebas de citotoxicidad con la población de discos de zirconia, se llevaron a cabo pruebas piloto con 4 discos de zirconio, los cuales fueron llevados a una caja de 6 pozos. A cada uno de los pozos con discos de zirconia se le agregó una solución de medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico con una concentración de 7×10^3 fibroblastos gingivales humanos. Se observaron los pozos

durante 72 horas bajo microscopio de fluorescencia y se identificaron los fibroblastos sobre las superficies de los discos, recabando información sobre su fluorescencia, forma y tamaño. Durante la prueba piloto se eliminó una de las muestras debido a que el medio de cultivo se contaminó con un hongo. Su pozo correspondiente fue aspirado y lavado con hipoclorito al 10%. Las muestras y los cultivos fueron observados en un microscopio de fluorescencia (ZOE Cell Imager, Bio-rad, Estados Unidos) con una longitud de onda de 360 nm. Se hicieron pruebas con luz blanca, luz UV, luz verde y luz roja. Se lograron observar mejor las células sobre los discos de zirconia con luz verde. Se estandarizaron las células que serían tomadas en cuenta para el conteo, dado que no todas tenían las mismas características en cuanto a su fluorescencia intrínseca y a su forma.

8.8.5 Proliferación celular

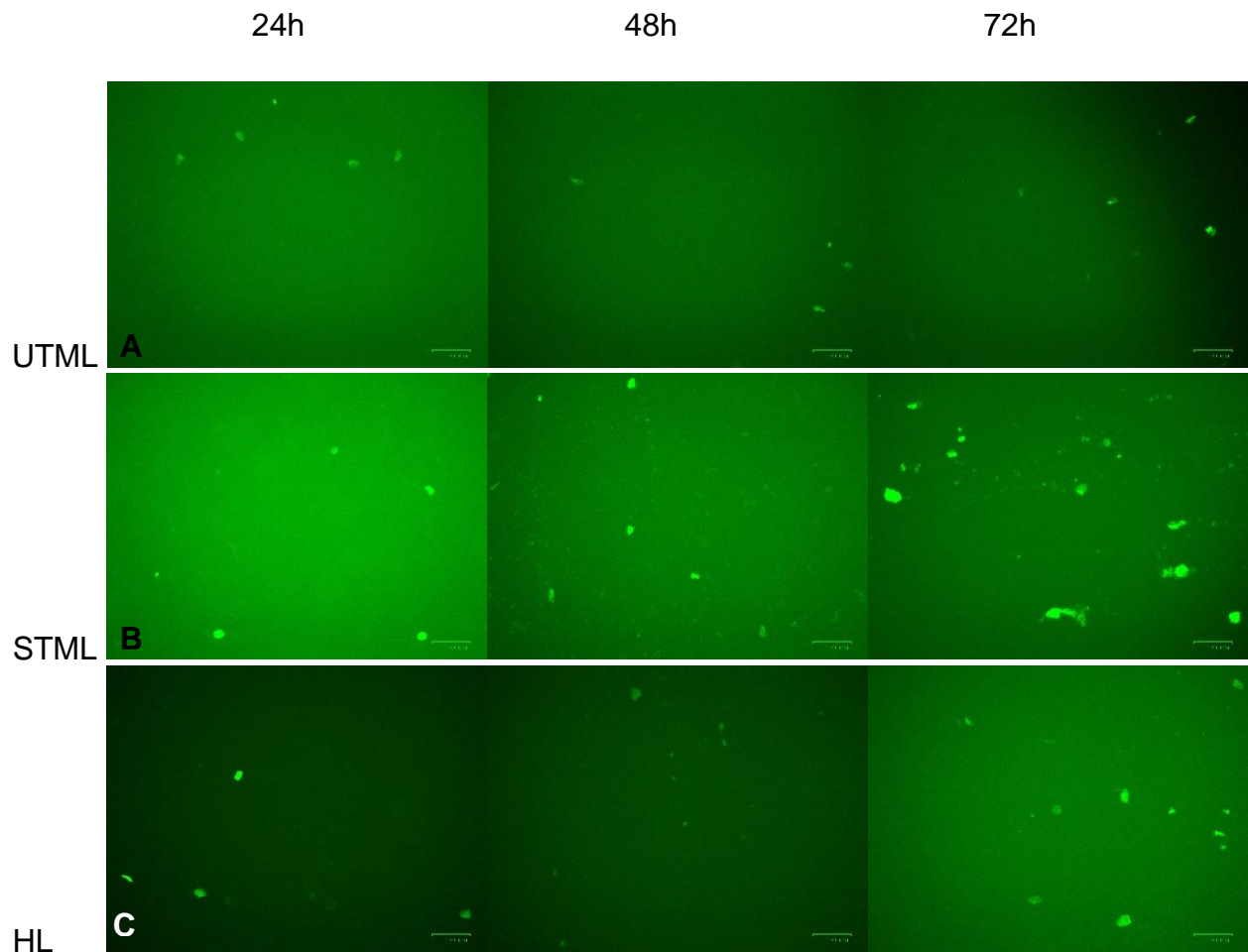
1. Se colocaron los discos de zirconio en cajas de 24 pozos (un disco por pozo). Fueron utilizadas dos cajas para colocar 20 discos en la primera caja y los 10 restantes en otra caja (Figura 13A).
2. Posteriormente, ya cuantificadas las células y diluidas en medio DMEM suplementado, se agregó a cada pozo con disco 1.5 ml de medio de cultivo con 7×10^3 fibroblastos. Además, se agregaron 2 pozos sin disco por grupo con la misma cantidad de fibroblastos y medio DMEM suplementado y se mantuvieron como control.
3. Se incubaron ambas cajas a 37°C y 5% de CO_2 durante 72 horas.



Imágenes propias

Figura 13. Cajas con discos de zirconia y su observación en el microscopio de fluorescencia. (A) Discos de zirconia colocados en cajas de 24 pozos. En la caja superior se colocaron las muestras HL (High Translucent) y en la caja inferior las muestras UTML (Ultra Translucent Multilayered) y STML (Super Translucent Multilayered). Por cada grupo se agregaron dos pozos solamente con medio de cultivo y la misma concentración de fibroblastos. (B) El microscopio de fluorescencia cuenta con una cámara que nos permite ubicarnos espacialmente y de esta forma logramos identificar la muestra y las secciones de las muestras que estamos observando.

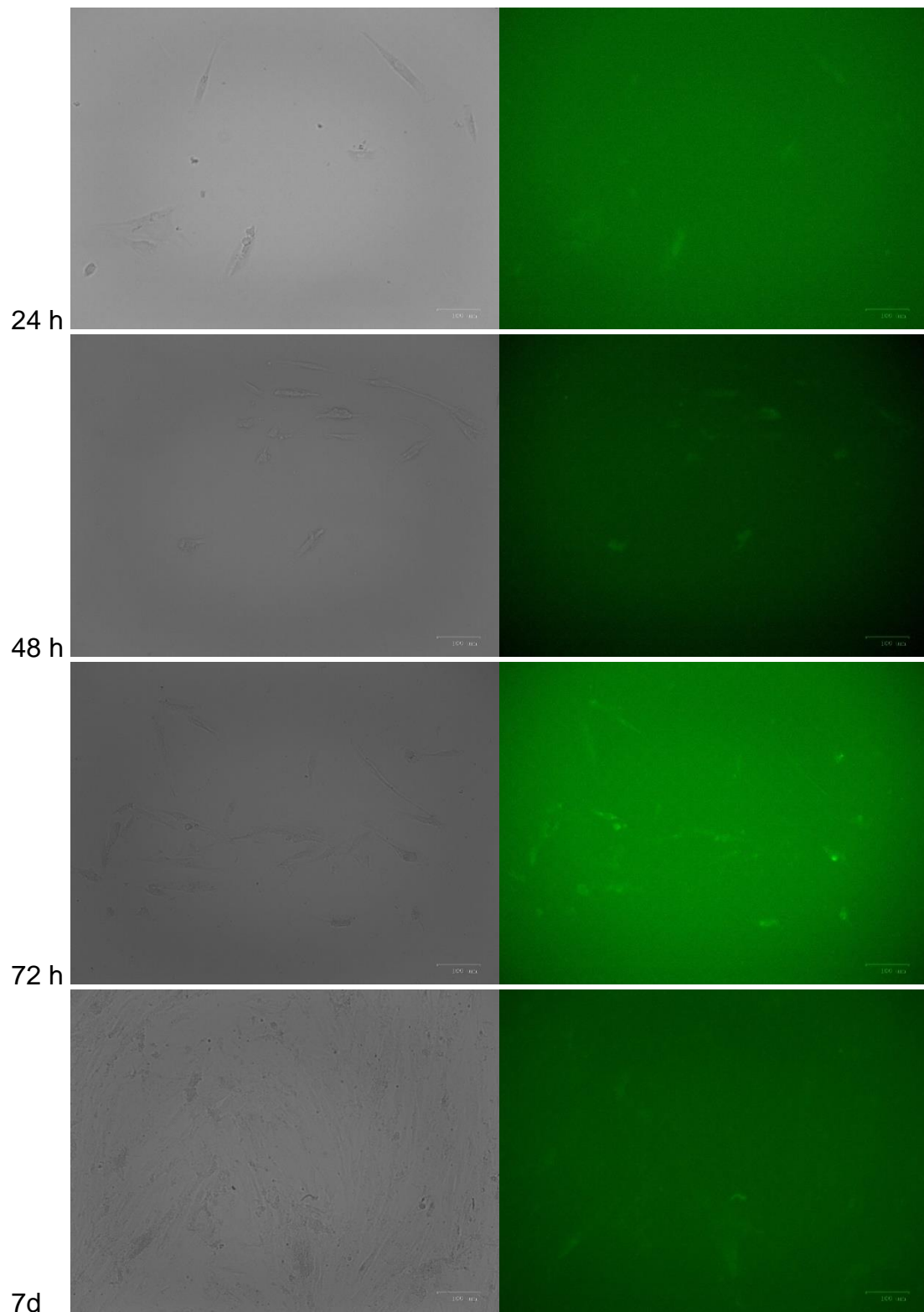
4. Los pozos fueron observados en un microscopio de fluorescencia (ZOE Cell Imager, Bio-rad, Estados Unidos) para analizar la adherencia celular sobre los discos de zirconia a las 24, 48 y 72 horas de haber sido sembrados, sin realizar cambio de medio de cultivo (Figura 13B).
5. Se capturaron imágenes en tres puntos aleatorios de cada muestra (Figura 14).



Imágenes propias

Figura 14. Capturas de pantalla obtenidas del microscopio de fluorescencia (ZOE). Imágenes donde se aprecian los fibroblastos gingivales humanos sobre las superficies de zirconia UTML (A), STML (B) y HT (C) observadas cada 24 horas. Todas las muestras tienen una R_a lisa según la clasificación de Yang. Las células no fueron teñidas, por lo tanto, las formas nítidas e iluminadas corresponden al núcleo y al citoplasma de los fibroblastos.

6. Las imágenes de fluorescencia se analizaron en el programa ImageJ para obtener cuantificación y tamaño de las células.
7. Se obtuvo un promedio de la cantidad y tamaño de las células en cada uno de los discos y se capturaron los datos en una tabla de Microsoft Excel para posteriormente realizar el análisis descriptivo en el software Jamovi.



Imágenes propias

Figura 15. Imágenes de microscopio de fluorescencia. Imágenes obtenidas del microscopio de fluorescencia (ZOE) con luz blanca y con luz fluorescente verde en zonas del medio de cultivo sin disco de zirconia. Cuando se aplica luz blanca se puede observar la forma fusiforme de los fibroblastos formada

por las fibras de colágeno, mientras que, bajo luz verde, se pierde la visibilidad de las extensiones de las fibras de colágeno y no es posible apreciar su forma alargada, dificultando su identificación.

8.9 Análisis estadístico

Se llevó a cabo la estadística descriptiva y distribución de los datos tanto de la longitud como de la proliferación celular comparando los 3 grupos de zirconia y los 3 tiempos, utilizando el software Jamovi. Al haber obtenido una distribución normal de los datos, se realizó la prueba de análisis de la varianza ANOVA y pruebas de Post Hoc tanto para la proliferación celular y tamaño de las células.

9. RESULTADOS

9.1 Rugosidad

Los resultados del perfilómetro por grupo se ven representados en la tabla 3.

Tabla 3. Rugosidad (R_a) de superficie de los discos de zirconia representada en μm .

Tipo de zirconia	R_a
UTML	0.18 ± 0.02
STML	0.21 ± 0.10
HT	0.17 ± 0.02

9.2 Longitud de las células

Se realizó un análisis descriptivo de los datos recabados de las longitudes de los fibroblastos gingivales humanos durante las 72 horas de este estudio. En el grupo UTML se encontró que la longitud promedio de los fibroblastos adheridos a los discos fue de $22.1 \mu\text{m}$ a las 24 horas, $23.6 \mu\text{m}$ a las 48 horas y de 22.8 a las 72 horas. Para el grupo STML se encontraron longitudes promedio de $24.2 \mu\text{m}$, $25.5 \mu\text{m}$ y $29.4 \mu\text{m}$ a las 24, 48 y 72 horas. Mientras que los resultados en el grupo HT fueron de $28 \mu\text{m}$, $22.7 \mu\text{m}$ y $28.2 \mu\text{m}$ respectivamente. Se obtuvo un error estándar de Kurtosis normal en la mayoría de los 3 grupos durante las 24, 48 y 72 horas. El único momento donde se obtuvo un error estándar de Kurtosis > 2 , fue en el grupo STML a las 24 horas (2.02). Al ser el único valor >2 de los 3 grupos durante los 3 tiempos observados, se determinó que tuvimos una distribución normal de los datos, por lo que realizamos análisis de varianzas (ANOVA) y pruebas Post Hoc (tabla 4).

Tabla 4. Análisis estadístico de la longitud de los fibroblastos gingivales humanos comparando los grupos UTML, STML y HT.

Tipo de zirconia	Longitud de las células		
	Media (DE)		
	24 h	48 h	72 h
UTML	22.1	23.6	22.8
STML	24.2	25.5	29.4
HT	28.0	22.7	28.2

Tabla 5. Comparativa de ANOVA para los tres tipos de zirconia para los diferentes tiempos.

Tipos de zirconia	p 24	p 48 h	p 72 h
UTML			
STML	0.131	0.638	0.181
HT			

Tabla 6. ANOVA de la longitud celular a las 24 horas.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p
Tipo de zirconia	177	2	88.6	2.19	0.131
Residuos	1093	27	40.5		

Tabla 7. Prueba Post Hoc de la longitud de las células a las 24 horas.

Comparación							
Tipo de zirconia	Tipo de zirconia	Diferencia de medias	EE	gl	t	p _{tukey}	
UTML	- STML	-2.09	2.85	27.0	-0.735	0.745	
	- HT	-5.87	2.85	27.0	-2.064	0.116	
STML	- HT	-3.78	2.85	27.0	-1.329	0.392	

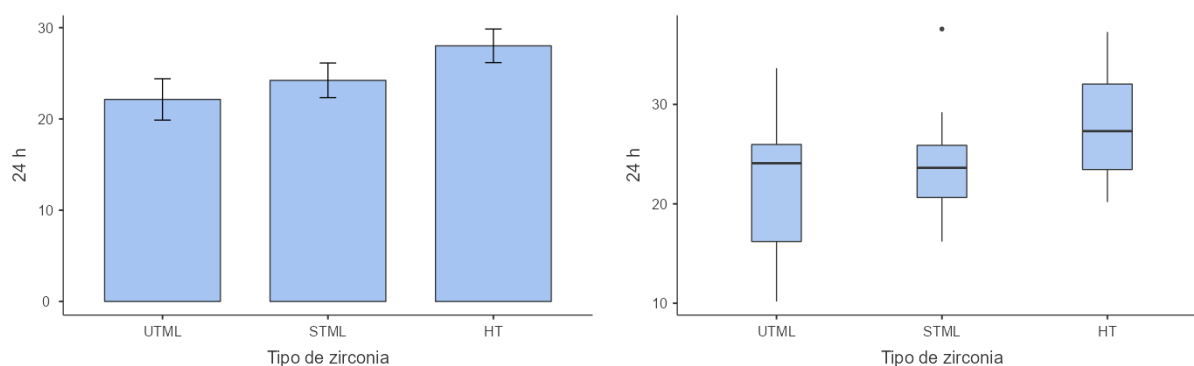


Figura 16. Barras de error y diagrama de error de la longitud de los fibroblastos a las 24 horas.

Los resultados de ANOVA a las 24 horas no demostraron una diferencia significativa en la longitud celular ($p > 0.05$) al igual que las pruebas de Post Hoc (Tabla 6 y 7, figura 16).

Tabla 8. ANOVA de la longitud celular a las 48 horas.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p
Tipo de zirconia	40.5	2	20.3	0.457	0.638
Residuos	1196.8	27	44.3		

Tabla 9. Pruebas Post Hoc de la longitud celular a las 48 horas.

Comparación						
Tipo de zirconia	Tipo de zirconia	Diferencia de medias	EE	gl	t	p _{Tukey}
UTML	- STML	-1.869	2.98	27.0	-0.628	0.806
	- HT	0.926	2.98	27.0	0.311	0.948
STML	- HT	2.795	2.98	27.0	0.939	0.621

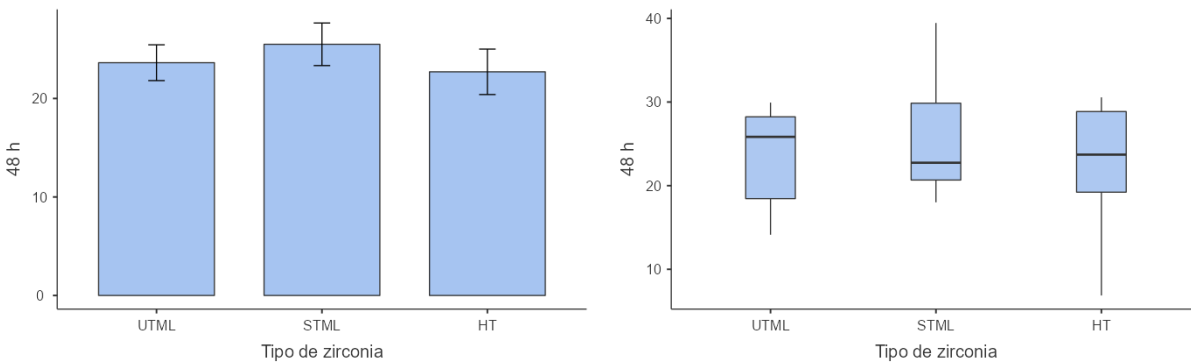


Figura 17. Barras de error y diagrama de error de la longitud de los fibroblastos a las 48 horas.

Los resultados de ANOVA a las 48 horas no demostraron una diferencia significativa en la longitud celular ($p > 0.05$) al igual que las pruebas de Post Hoc (Tabla 8 y 9, figura 17).

Los resultados de ANOVA a las 72 horas no demostraron una diferencia significativa en la longitud celular ($p > 0.05$) al igual que las pruebas de Post Hoc (Tabla 10 y 11, figura 17).

Tabla 10. ANOVA de la longitud celular a las 72 horas.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p
Tipo de zirconia	245	2	122.4	1.82	0.181
Residuos	1812	27	67.1		

Tabla 11. Pruebas Post Hoc de la longitud celular a las 72 horas.

Comparación						
Tipo de zirconia	Tipo de zirconia	Diferencia de medias	EE	gl	t	p _{Tukey}
UTML	- STML	-6.57	3.66	27.0	-1.792	0.191
	- HT	-5.38	3.66	27.0	-1.468	0.322
STML	- HT	1.19	3.66	27.0	0.325	0.944

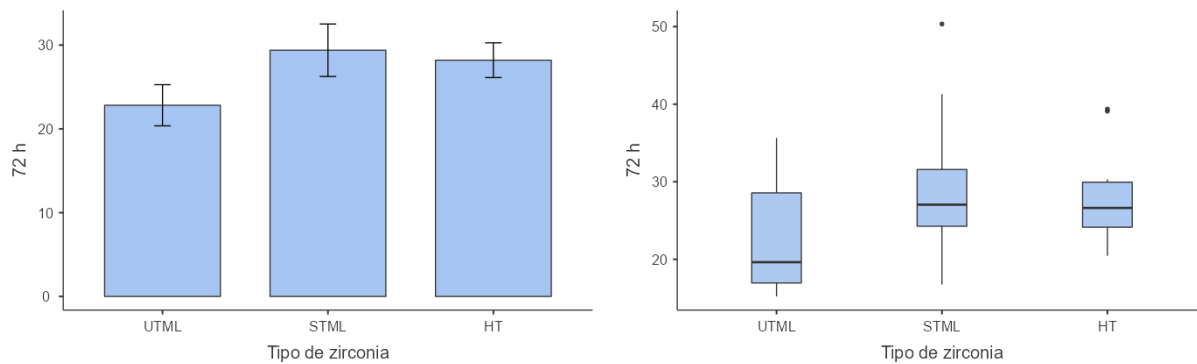


Figura 18. Barras de error y diagrama de error de la longitud de los fibroblastos a las 72 horas.

9.3 Proliferación celular

Para determinar la cantidad de células adheridas a la superficie del disco de zirconia se realizaron 3 capturas de pantalla del microscopio de fluorescencia por cada una de las muestras cada 24 horas. Se realizó el conteo de las células con ayuda del software ImageJ y se calculó el área de las imágenes obtenidas del microscopio, que correspondían a un largo de 1000 μm x 750 μm de ancho. Se calculó el área del círculo conformado por una de las caras del disco, y su área fue dividida entre el área de la imagen del microscopio, resultando en 67.02.

Al terminar el conteo celular de las tres imágenes de cada muestra, se promedió el total de células entre 3 para posteriormente multiplicarlo por 67.02, cantidad de veces que correspondería el área de cada imagen dentro de la superficie del disco. Se repitió el proceso con cada una de las muestras cada 24 horas y los datos fueron capturados en una tabla de Excel, después, elaboramos el análisis estadístico con el software Jamovi.

El promedio de células adheridas a los discos de zirconia para el grupo UTML fue de 214, 386 y 427 cada 24 horas, resultando en un aumento de la proliferación celular para este grupo. El grupo STML tuvo una proliferación celular de 286, 293 y 351 fibroblastos a las 24, 48 y 72 horas respectivamente. Y en el grupo HT se observaron 194, 201 y 469 cada 24 horas. Los 3 grupos demostraron un aumento en la proliferación de fibroblastos gingivales humanos durante el tiempo. A las 24 horas hubo mayor proliferación en las muestras del grupo STML, a las 48 horas hubo mayor proliferación en los discos UTML y finalmente, a las 72 horas, el grupo HT tuvo el mayor número de células adheridas. Se obtuvo una distribución normal de los datos en el análisis descriptivo con un error estándar de Kurtosis de 1.33, por lo que se realizó análisis de ANOVA y pruebas de Post Hoc.

Tabla 12. Análisis estadístico de la longitud de los fibroblastos gingivales humanos comparando los grupos UTML, STML y HT.

Tipo de zirconia	Proliferación celular		
	Media (DE)		
	24 h	48 h	72 h
UTML	73.9	213	249
STML	105	126	121
HT	71.5	116	123

Tabla 13. ANOVA de la proliferación celular a las 24 horas.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p
Tipo de zirconia	46347	2	23174	3.23	0.055
Residuos	193691	27	7174		

Tabla 14. Pruebas Post Hoc de la proliferación celular a las 24 horas.

Comparación						
Tipo de zirconia	Tipo de zirconia	Diferencia de medias	EE	gl	t	p _{Tukey}
UTML	- STML	-71.5	37.9	27.0	-1.887	0.162
	- HT	20.1	37.9	27.0	0.531	0.857
STML	- HT	91.6	37.9	27.0	2.418	0.057

De acuerdo con la prueba de ANOVA no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la cantidad de células adheridas a los discos de zirconia de los 3 grupos a las 24 horas ($p > 0.05$) (tabla 13 y 14, figura 19).

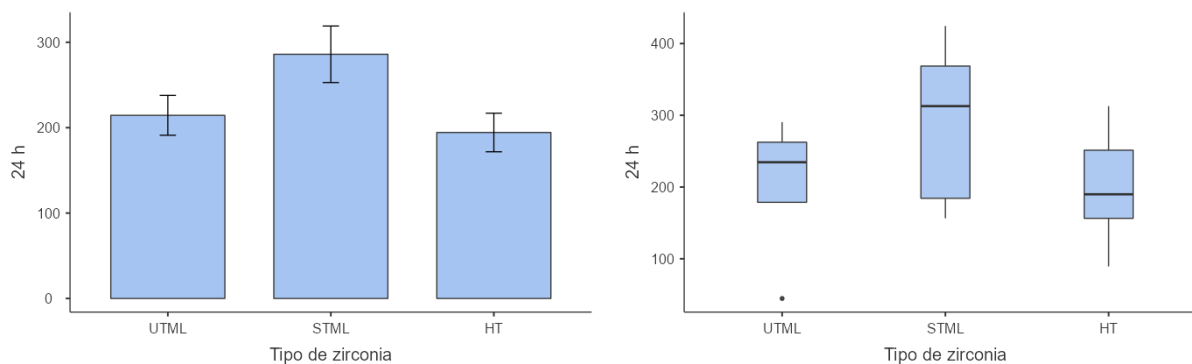


Figura 19. Barras de error y diagrama de error de la proliferación celular a las 24 horas.

Tabla 15. ANOVA de la proliferación celular a las 48 horas.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p
Tipo de zirconia	171915	2	85957	3.45	0.046
Residuos	673253	27	24935		

Tabla 16. Pruebas de Post Hoc de la proliferación celular a las 48 horas.

Comparación							
Tipo de zirconia	Tipo de zirconia	Diferencia de medias	EE	gl	t	p _{tukey}	
UTML	- STML	93.8	70.6	27.0	1.33	0.392	
	- HT	185.4	70.6	27.0	2.63	0.036	
STML	- HT	91.6	70.6	27.0	1.30	0.409	

A las 48 horas si se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la proliferación celular entre el grupo UTML y el grupo HT. Mientras que el grupo UTML y STML ($p > 0.05$) no hubo diferencia significativa, al igual que entre los grupos STML y HT ($p > 0.05$) (tabla 15 y 16, figura 20).

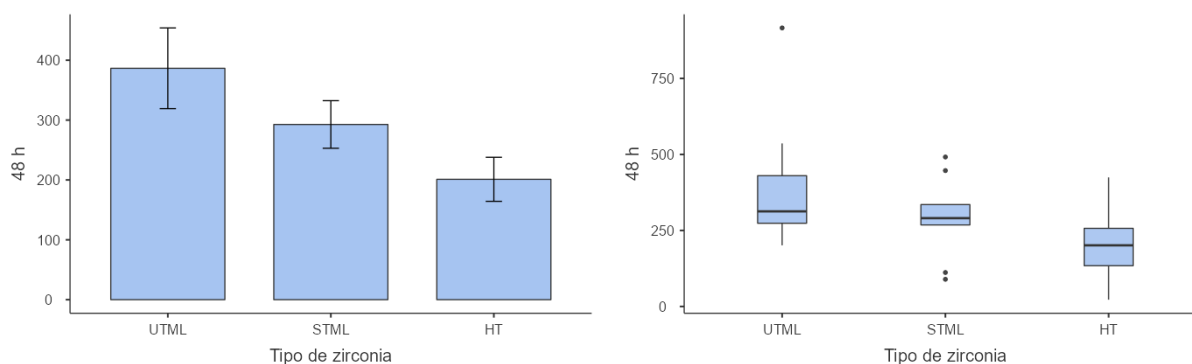


Figura 20. Barras de error y diagrama de error de la proliferación celular a las 48 horas.

Tabla 17. ANOVA de la proliferación celular a las 72 horas.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p
Tipo de zirconia	71967	2	35983	1.17	0.325
Residuos	827966	27	30665		

Tabla 18. Pruebas Post Hoc de la proliferación celular a las 72 horas.

Comparación							
Tipo de zirconia	Tipo de zirconia	Diferencia de medias	EE	gl	t	p _{tukey}	
UTML	- STML	76.0	78.3	27.0	0.970	0.602	
	- HT	-42.4	78.3	27.0	-0.542	0.851	
STML	- HT	-118.4	78.3	27.0	-1.512	0.301	

De acuerdo con la prueba de ANOVA no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la cantidad de células adheridas a los discos de zirconia de los 3 grupos a las 72 horas ($p > 0.05$) (tabla 17 y 18, figura 21).

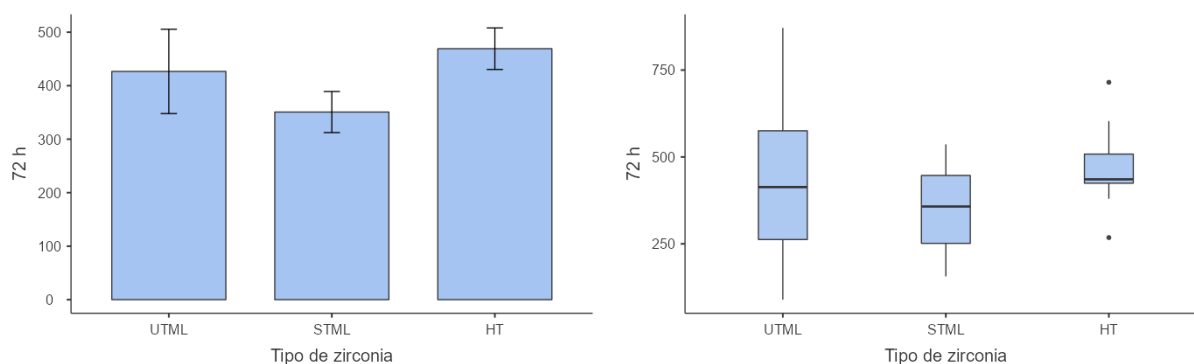


Figura 21. Barras de error y diagrama de error de la proliferación celular a las 72 horas.

10. DISCUSIÓN

La zirconia ha demostrado buenos resultados estéticos y mayor biocompatibilidad comparado con otros materiales restauradores metálicos. Estos materiales están dirigidos a restauraciones definitivas a largo plazo, por lo que estarán en contacto directo con los tejidos bucales a partir del momento en el que se es cementada o atornillada la restauración. Es por este motivo que se requiere de materiales compatibles con los tejidos y, que, al mismo tiempo, no permitan la adherencia o acumulación de placa dentobacteriana.

Este estudio evaluó la viabilidad celular de fibroblastos gingivales humanos sobre discos de zirconia de diferente traslucidez. Se analizó la rugosidad de la superficie después del pulido, longitud y proliferación celular de fibroblastos gingivales humanos. Las células fueron obtenidas por medio de biopsias de pacientes sanos para realizar un cultivo primario siguiendo protocolos realizados por otras investigaciones similares (16,33,54,55) y por técnicas establecidas para la obtención de cultivos primarios (38,40,44,56), a partir del cual, se subcultivaron hasta obtener la confluencia adecuada para poder desarrollar la investigación. Se mantuvieron en condiciones artificiales mimetizando las condiciones *in vivo*. Posteriormente, el conteo celular se realizó utilizando el programa ImageJ siguiendo un protocolo automatizado sugerido en investigaciones anteriores (57). Debido a las características de los fibroblastos observados sobre los discos de zirconia, no fue posible realizar el conteo de forma automatizada en su totalidad, pero se realizó el conteo y la medida de longitud de las células calibrando la medida de referencia facilitada por la imagen del microscopio. Las muestras de zirconia no mostraron fluorescencia intrínseca al ser observados tanto en luz UV como en el microscopio de fluorescencia, y fue posible observar las células adheridas a los discos sin la necesidad de realizar una tinción. Debido a esto, solo fue posible apreciar áreas irregulares bien delimitadas y brillosas, que corresponden al núcleo y al citoplasma de los fibroblastos gingivales humanos sin lograr ver la forma fusiforme característica de esta línea celular. Por lo tanto, no se pudo continuar con la determinación del grado de citotoxicidad.

El análisis de la rugosidad de la superficie fue realizado en un perfilómetro después de pulir las muestras con instrumentos rotatorios siguiendo el protocolo de pulido de 3 pasos

de la marca SS White (Filadelfia, Estados Unidos). Se utilizó una distancia de desplazamiento de 0.25 μm en tres puntos aleatorios en ambas caras de las muestras, recorriendo una distancia total de 1.25 μm . Obteniendo una R_a promedio de 0.18 μm , 0.21 μm y 0.17 μm para los grupos UTML, STML y HL respectivamente. Según Yang Y y cols., la rugosidad de las superficies se puede clasificar en cuatro tipos: lisa (0.0-0.4 μm), Ligeramente áspera (0.5-1.0 μm), medianamente áspera (1.0-2 μm) y áspera (>2.0 μm). Por lo tanto, utilizando esta clasificación, podemos determinar que todos los discos tuvieron una rugosidad de superficie lisa. Se ha demostrado que necesitamos de una rugosidad de 0.2 μm para lograr un sellado estable en los tejidos periodontales (58). El resultado obtenido en este estudio nos demuestra que los fibroblastos gingivales humanos se comportaron mejor sobre las superficies de la zirconia STML solamente a las 48 horas, sin encontrar diferencias significativas ($p > 0.05$) con los otros grupos a las 24 y 72 horas. Resultados obtenidos por autores anteriores coinciden con las observaciones hechas anteriormente, donde resaltan que la rugosidad de la superficie favorece la proliferación de los fibroblastos (32,33,55), pero, a la vez, una superficie muy rugosa puede contribuir a la formación de placa dentobacteriana (59).

Fueron utilizados discos de zirconia de diferente nivel de traslucidez de la marca Katana (Kuraray) multicapa, y un grupo de zirconia tradicional sin múltiples capas, evaluándolos a las 24, 48 y 72 horas en contacto con cultivos de fibroblastos gingivales humanos. A las 24 y 72 horas se observó mayor proliferación celular en los grupos STML y HT respectivamente, pero sin diferencias significativas ($p > 0.05$). Solamente se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos UTML y HT estudiados a las 48 horas. La hipótesis científica fue parcialmente aceptada debido a que se encontraron diferencias significativas entre dos grupos solamente a las 48 horas. En cuanto al tamaño de las células no se encontró una diferencia significativa entre los 3 grupos estudiados durante las 72 horas destinadas a este estudio.

Según el fabricante de nuestras muestras (Katana, Kuraray), las tabletas de zirconias utilizadas tienen distinto contenido mineral, estando constituidas por óxido de hafnio, óxido de zirconio y óxido de itrio. La zirconia UTML tiene una traslucidez de 43% con un contenido del 87-92% de $\text{ZrO}_2 + \text{HfO}_2$, 8-11% de Y_2O_3 ; la zirconia STML contiene $\text{ZrO}_2 + \text{HfO}_2$ en un 88-93% y de un 7-10% de Y_2O_3 ; mientras que la zirconia HT sin estratos

logra hasta un 45% de translucidez. Según otro estudio, en el cual, evaluaron la resistencia a la fractura de las cuatro marcas de zirconia translúcida más comunes, mencionan la composición química de estas: Amann Girrbach con una translucidez de 30% (ZrO_2 , 4-5.6% de Y_2O_3 , 5% de HfO_2 , 0.5% de Al_2O_3), Cercon HT con una translucidez de 41% (ZrO_2 , 5% de Y_2O_3 , <3% de HfO_2), Cercon XT con translucidez de 49% (ZrO_2 , 9% de Y_2O_3 , <3% de HfO_2) y, finalmente, Vita YZ XT que logra una translucidez del 50% (ZrO_2 , 8-10% de Y_2O_3 , 1-3% de HfO_2). Mencionan que, una de las formas para obtener mayor translucidez en una zirconia, es aumentar el contenido de Itrio, por lo que las diferencias en contenido de Itrio de las zirconias que utilizaron, pudo afectar en sus resultados (60). Actualmente no existe suficiente evidencia que compare la viabilidad celular sobre diferentes niveles de translucidez de zirconia. Es por eso por lo que se sugiere continuar la actual línea de investigación comparando zirconias translúcidas de diferentes casas comerciales y relacionar los resultados con su composición química.

Asimismo, anteriormente se han incluido en otras investigaciones distintas variables como la aplicación de luz UV, distintos tratamientos de superficie para modificar la humectabilidad, y así, aumentar el ángulo de área de contacto (16,58,61). Se sugiere también, agregar más variables, como distintas rugosidades, tratamientos de superficie, y considerar la aplicación de tinciones como lo han realizado investigadores anteriormente, para lograr observar adecuadamente la forma fusiforme de los fibroblastos adheridos e identificarlas de forma automatizada en un software como el que fue utilizado en este proyecto (ImageJ) y experimentar con tiempos de observación más prolongados como en estudios realizados previamente (33).

11. CONCLUSIÓN

No hay diferencia significativa en la viabilidad de fibroblastos gingivales humanos en zirconias de diferente nivel de translucidez.

No hay diferencia significativa en el tamaño de los fibroblastos gingivales humanos sobre diferentes niveles de translucidez de zirconia.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Resnik RR. Misch's Contemporary Implant Dentistry. 4th ed. Elsevier, editor. Elsevier; 2021. 2–20 p.
2. Naveau A, Rignon-bret C, Wulfman C. Zirconia abutments in the anterior region: A systematic review of mechanical and esthetic outcomes. *J Prosthet Dent.* 2013;1–8.
3. Guillaume B. Dental implants: A review. *Morphologie.* 2016;1–10.
4. S Hurson. Implant/Abutment Biomechanics and Material Selection for Predictable Results. *Compend July/August 2018.* 2018;39(7):440–6.
5. Gomes A, Montero J. Zirconia implant abutments: A review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16(1):50–5.
6. Gautam C, Joyner J, Gautam A, Rao J, Vajtai R. Zirconia based dental ceramics: structure, mechanical properties, biocompatibility and applications. *R Soc Chem.* 2016;19194–215.
7. Acosta PA. COMPARACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR DE FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS SOBRE DIFERENTES TIPOS DE ZIRCONIA: REVISIÓN SISTEMÁTICA. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2021.
8. Piconi C, Sandri M. New Materials for Dental Implantology. *Key Eng Mater.* 2017;750:189–94.
9. Buser D, Sennerby L, De Bruyn H. Modern implant dentistry based on osseointegration: 50 years of progress, current trends and open questions. *Periodontol 2000.* 2017;73(1):7–21.
10. Wirwicki, Mateusz; Topoliński T. Zirconium Dioxide As a Biomaterial; the Microstructure. *J Polish CIMAC.* 2012;14–7.
11. Asharaf S, Suma A, Deivanai M, Mani R. Zirconia: Properties and application - A review. *Prosthodontics.* 2014;34:178–83.
12. Martínez Rus F, Pradies Ramiro G, Suárez García MJ, Rivera Gómez B. Cerámicas dentales: clasificación y criterios de selección. *Rcoe.* 2007;12(4):253–63.
13. Montece-Seixas ER, Lima-tamay KE. Importance of Zirconium for fixed partial denture free of metal *Importancia del Zirconio para prótese parcial fija libre de metal.* *Dominio las ciencias.* 2017;3:613–27.
14. Ghodsi S, Jafarian Z. A Review on Translucent Zirconia. *Eur J Prosthodont Restor Dent.* 2018;62–74.
15. Vichi A, Sedda M, Fabian Fonzar R, Carrabba M, Ferrari M. Comparison of contrast ratio, translucency parameter, and flexural strength of traditional and “augmented translucency” zirconia for CEREC CAD/CAM system. *J Esthet Restor Dent.* 2016;28:S32–9.
16. Rutkunas V, Borusevicius R, Balciunas E, Jasinskyte U, Alksne M. The Effect of

- UV Treatment on Surface Contact Angle, Fibroblast Cytotoxicity, and Proliferation with Two Types of Zirconia-Based Ceramics. *Int J Environmental Res Public Heal*. 2022;19.
17. Dangra Z, Gandhewar M. Case Report The Use of Newer High Translucency Zirconia in Aesthetic Zone. *Case Rep Dent*. 2014;2014(Figure 1):3–5.
 18. Shahmiri R, Standard C, Hart JN, Sorrell CC. Optical properties of zirconia ceramics for esthetic dental restorations: A systematic review. *J Prosthet Dent*. 2015;1–11.
 19. Tuncel İ, Turp I, Üşümez A. Evaluation of translucency of monolithic zirconia and framework zirconia materials. *J Adv Prosthodont*. 2016;8(3):181.
 20. Kurtulmus-Yilmaz S, Ulusoy M. Comparison of the translucency of shaded zirconia all-ceramic systems. *J Adv Prosthodont*. 2014;6(5):415.
 21. Ahmed DM, Omar SS. Cementing Line Configuration of Bioactive Engineered Zirconia Implants (*In Vivo* Histological Study). *Key Eng Mater*. 2018;786:236–47.
 22. Laass A, Sailer I, Hüsler J, Hämmerle C, Thoma D. Randomized Controlled Clinical Trial of All-Ceramic Single-Tooth Implant Reconstructions Using Modified Zirconia Abutments: Results at 5 Years After Loading. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2018;39(1):17–27.
 23. Atsü S, Aksan M, Bulut A. Fracture Resistance of Titanium, Zirconia, and Ceramic-Reinforced Polyetheretherketone Implant Abutments Supporting CAD/CAM Monolithic Lithium Disilicate Ceramic Crowns After Aging. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2019;34(3):622–30.
 24. NORBERT CIONCA DH& AM. Zirconia dental implants: where are we now and where are we heading? *Periodontol 2000*. 2017;73:241–58.
 25. Mangano F, Margiani B, Admakin O. A Novel Full-Digital Protocol (SCAN-PLAN-MAKE-DONE®) for the Design and Fabrication of Implant-Supported Monolithic Translucent Zirconia Crowns Cemented on Customized Hybrid Abutments: A Retrospective Clinical Study on 25 Patients. *Int J Environmental Res Public Heal*. 2019;1–20.
 26. Delgado Pichel A, Inarejos Montesinos P, Herrero Climent M. Espacio biológico: Parte I: La inserción diente-encía. *Av en Periodoncia e Implantol Oral*. 2001;13(2):1–8.
 27. Obădan F, Crăițoiu Ș, Manolea HO, Hîncu MC, Iacov-Crăițoiu MM. The evaluation of the morphological evolution of the tissue integration of dental implants through conventional histology and immunohistochemistry techniques. *Rom J Morphol Embryol*. 2018;59(3):851–9.
 28. Paul S, Hanisch O, Nestic D. Human Gingival Fibroblast Proliferation on Materials Used for Dental Implant Abutments: A Systematic Review. 2021;34(6).
 29. Kajiwara N, Masaki C, Mukaibo T, Kondo Y. Soft tissue biological response to Zirconia and Metal Implant Abutments Compared With Natural Tooth:

- Microcirculation Monitoring as a Novel Bioindicator. *Implant Dent.* 2015;37–41.
30. Chai WL, Brook IM, Palmquist A, Van Noort R, Moharamzadeh K. The biological seal of the implant-soft tissue interface evaluated in a tissueengineered oral mucosal model. *J R Soc Interface.* 2012;9(77):3528–38.
 31. Altmann B, Rabel K, Kohal RJ, Proksch S, Tomakidi P, Adolfsson E, et al. Cellular transcriptional response to zirconia-based implant materials. *Dent Mater.* 2016;1–15.
 32. Fischer NG, Wong J, Baruth A. Effect of Clinically Relevant CAD / CAM Zirconia Polishing on Gingival Fibroblast Proliferation and Focal Adhesions. *Materials (Basel).* 2017;1–16.
 33. Rausch MA, Shokoohi-tabrizi H, Wehner C, Pippenger BE, Wagner RS, Ulm C, et al. Impact of Implant Surface Material and Microscale Roughness on the Initial Attachment and Proliferation of Primary Human Gingival Fibroblasts. *Biology (Basel).* 2021;1–14.
 34. Rohr N, Zeller B, Matthisson L, Fischer J. Surface structuring of zirconia to increase fibroblast viability. *Dent Mater.* 2020;1–8.
 35. Esfahanizadeh N, Motalebi S, Daneshparvar N. Morphology , proliferation, and gene expression of gingival fibroblasts on Laser-Lok, titanium and zirconia surfaces. *Lasers Med sci.* 2016;1–16.
 36. Mehl C, Kern M, Schütte A, Kadem LF, Selhuber-unkel C. Adhesion of living cells to abutment materials , dentin , and adhesive luting cement with different surface qualities. *Dent Mater.* 2016;1–12.
 37. Sun T, Liu R, Liu X, Feng X, Zhang Y, Lai R. The Biocompatibility of Dental Graded Nano-Glass-Zirconia Material After Aging. *Nanoscale Res Lett.* 2018;1–8.
 38. Baust JM, Buehring GC, Campbell L, Elmore E, Harbell JW, Nims RW, et al. Best practices in cell culture : an overview. *Vitr CellDevBiol—Animal.* 2017;1–5.
 39. Coecke S, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hay R, et al. Guidance on Good Cell Culture Practice A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. 2005;261–87.
 40. Oyeleye OO, Ogundeji ST, Ola SI, Omitogun OG. Basics of animal cell culture : Foundation for modern science. *Acad Journals.* 2016;11(May):6–16.
 41. Mishra SK, Chowdhary R, Kumari S. Microleakage at the different implant abutment interface: A systematic review. *J Clin Diagnostic Res.* 2017;11(6):ZE10–5.
 42. Philippeos C, Hughes RD, Dhawan A, Mitry RR. Chapter 1 Introduction to Cell Culture. 2011;806:1–13.
 43. Acosta Gómez AP. El fibroblasto: su origen, estructura, funciones y heterogeneidad dentro del periodonto. *Univ Odontológica.* 2006;25:26–33.
 44. Bationo R, Rouamba A, Diarra A, Beugré-kouassi ML, Jordana F, Beugré J. Culture of Human Gingival Fibroblasts: An Experimental Model. *Cell Biol.* 2020;8(1):8–11.

45. Ahangar P, Mills SJ, Smith LE. Human gingival fibroblast secretome accelerates wound healing through anti-inflammatory and pro-angiogenic mechanisms. *npj Regen Med.* 2020;1–12.
46. Grenade C, Pauw-gillet M De, Gailly P. Biocompatibility of materials with Human Gingival Fibroblasts (HGFs). *Dent Mater.* 2016;32(0):1–13.
47. Hernandez MR, Cañas JC. Citotoxicidad in vitro: sistema para la evaluación de biomateriales y equipos médicos implantables en Cuba. *Rev CENIC ciencias Biol.* 2006;37(2):173–6.
48. LI W, ZHOU J, XU Y. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomed Reports.* 2015;3(5):617–20.
49. (CSA) CSA. ISO 10993-5 in vitro cytotoxicity. *Int Organ.* 2009;2007:1–11.
50. Zirconia D. Dental Zirconia ENGLISH INSTRUCTIONS FOR USE. 2016;3:4–5.
51. Hirosama Y, Akagawa Y, Tsuru H. Tissue compatibility in vivo and stability of a new zirconia ceramic. *J Prosthet Dent.* 1992;68(2):322–6.
52. Zheng M, Yang Y, Liu XQ, Liu MY, Zhang XF, Wang X, et al. Enhanced biological behavior of in vitro human gingival fibroblasts on cold plasma-treated zirconia. *PLoS One.* 2015;10(10):1–18.
53. Sicilia A, Quirynen M, Fontollet A, Francisco H, Friedman A, Linkevicius T, et al. Long-term stability of peri-implant tissues after bone or soft tissue augmentation. Effect of zirconia or titanium abutments on peri-implant soft tissues. Summary and consensus statements. The 4th EAO Consensus Conference 2015. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26:148–52.
54. Aktas C, Sci ME, Mehraein Y, Lipp P, Kaestner L. Differential Behavior of Fibroblasts and Epithelial Cells on Structured Implant Abutment Materials: A Comparison of Materials and Surface Topographies. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2014;1237–49.
55. Rutkunas V, Bukelskiene V, Sabaliauskas V. Assessment of human gingival fibroblast interaction with dental implant abutment materials. *J Mater Sci Mater Med.* 2015;169.
56. Diar-bakirly S, El-bialy T. Saudi Journal of Biological Sciences Human gingival fibroblasts : Isolation , characterization , and evaluation of CD146 expression. *Saudi J Biol Sci.* 2021;28(4):2518–26.
57. Baviskar SN. A Quick & Automated Method for Measuring Cell Area using ImageJ HOW TO DO IT A Quick & Automated Method for. *BioOne Res Evolved.* 2011;73(9):554–6.
58. Yang Y, Zhou J, Liu X, Zheng M, Yang J, Tan J. Ultraviolet light-treated zirconia with different roughness affects function of human gingival fibroblasts in vitro: The potential surface modification developed from implant to abutment. *Soc Biomater.* 2014;116–24.
59. Relevance C. Monolithic Ceramics : Effect of Finishing Techniques on Surface

- Properties , Bacterial Adhesion and Cell Viability. 2018;315–25.
60. Crowns Z, Kongkiatkamon S, Booranasophone K, Tongtaksin A, Kiatthanakorn V. Comparison of Fracture Load of the Four Translucent. *Molecules*. 2021;1–10.
 61. Baharloo B, Textor M, Brunette DM. Substratum roughness alters the growth, area and focal adhesions of epithelial cells and their proximity to titanium surfaces. *J Biomed Mater Res*. 2005;12–22.

13. ANEXOS

Nombre del Paciente: _____ **Edad:** _____
Teléfono: _____

Domicilio: _____ **Estado:** _____
Municipio: _____

Por el presente autorizo al Residente de maestría en estomatología C.D. Jesús Martín Mendoza Zepeda para que lleve a cabo la toma de muestra de tejido gingival, el cual se encuentra asentado en la Historia Clínica. Estoy consciente que, si surgiera cualquier circunstancia imprevisible durante el proceso en la que requiera, a su juicio, procedimientos adicionales o diferentes de aquellos que se contemplan en este momento, le solicito y autorizó para que proceda de la manera que considere aconsejable. El (los procedimientos (s) indicado (s) antes, lo he platicado con os alumnos y facultativos y sé los riesgos y complicaciones que implica, me han sido explicados y comprendo perfectamente la naturaleza y consecuencia del (los) procedimiento (s).

Me han explicado que el procedimiento es con motivo de que las muestras de tejido sean utilizadas en proyectos de investigación de los cuales se me han explicado también los usos, manejo y propósitos del estudio.

Me han explicado que los tratamientos se realizarán bajo anestesia local, lo cual, se me va a administrar mediante una o varias inyecciones a fin de bloquea de forma reversible la trasmisión del impulso nervioso para realizar la intervención sin dolor. También he sido informado (a) de las posibles consecuencias de colocar cualquier tipo de anestésico (parestesia temporal, irritación o prurito etc.) estoy consciente y sin que nadie me presione he declarado todos mis antecedentes en el momento. Así mismo autorizó Residente de maestría en estomatología C.D. Jesús Martín Mendoza Zepeda para que preserve con fines científicos, didácticos o para que se desponga de cualquier otra manera de tejidos, partes u órganos extraídos como parte de los procedimientos autorizados previamente. Consiento que se utilicen fotografías, vídeos, radiografías, presentaciones, acerca de mi caso en particular con fines educativos y de investigación o para publicaciones en revistas científicas, foros, conferencias, ponencias.

Notifico que me han desglosado y explicado todo que me han explicado que el procedimiento es con motivo que las muestras de tejido sean utilizadas en proyectos de investigación de los cuales se me han explicado también los usos, manejo y propósitos del estudio.

Me comprometo a asistir a todas mis citas que se me requiera por parte de la Institución y que se refieran a la preparación, rehabilitación y seguimiento del (os) acto (s) operatorio (s) en cuestión. Siendo está una institución académica es obligatorio para los alumnos asistir a clases, cursos, conferencias nacionales e internacionales; por lo que dichos eventos no tendrán trabajo de clínica con el trato de pacientes.

De conformidad con lo dispuesto en la ley 21/2000 de 29 de diciembre de Derechos de Información Concernientes a la Salud y la Autonomía del Pacientes y la Documentación Clínica de Rehabilitación Oral de la Maestría de Estomatología con Terminal en Rehabilitación Oral de la Facultad de Estomatología de la BUAP: ubicada en la 31 poniente 304, col. Volcanes de Puebla Pue. Es la responsable de recabar sus datos personales, del uso que se le dé a los mismos y de si protección, haciendo extensiva esta responsabilidad a todos sus empleados y colaboradores.

LUGAR Y FECHA: _____

NOMBRE Y FIRMA DEL MÉDICO TRATANTE

NOMBRE Y FIRMA DEL PACIENTE

NOMBRE Y FIRMA DE TESTIGO