



Universidad de Sevilla
Facultad de Odontología
Departamento de Estomatología

*Estudio comparativo del comportamiento
celular temprano sobre superficies de
circonia frente a cerámicas de silicato de
litio reforzado con circonia.*

TESIS DOCTORAL
MARÍA RIZO GORRITA
Sevilla, 2019



Facultad de Odontología
Departamento de Estomatología



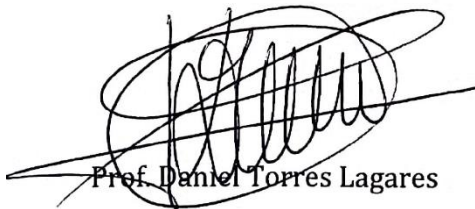
Medalla y Encomienda
Orden Civil de Sanidad

D. DANIEL TORRES LAGARES, Catedrático de la Universidad de Sevilla adscrito al Departamento de Estomatología, y D. JOSÉ LUIS GUTIERREZ PÉREZ, Profesor Titular del Departamento de Estomatología de la Universidad de Sevilla, en calidad de directores del Proyecto de Tesis de la Licenciada en Odontología D^a. MARÍA RIZO GORRITA.

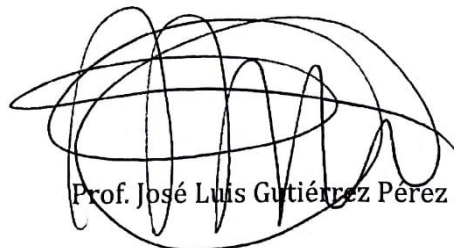
CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado “Estudio comparativo del comportamiento celular temprano sobre superficies de circonia frente a cerámicas de silicato de litio reforzado con circonia”, presentado por D^a. María Rizo Gorrita ha sido realizado bajo nuestra dirección, siendo conforme para su presentación como Tesis Doctoral, cumpliendo todos los requisitos para optar al grado de Doctor.

Sevilla, 16 de septiembre de 2019



Prof. Daniel Torres Lagares



Prof. José Luis Gutiérrez Pérez

A mi familia,

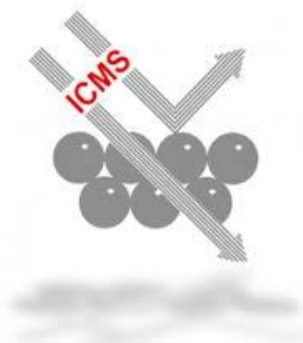
AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias a las personas que han hecho posible esta tesis doctoral, comenzando por mis directores de tesis, Daniel Torres Lagares y José Luis Gutiérrez Pérez por darme la oportunidad de continuar con mis estudios de investigación, por su gran apoyo, paciencia y disponibilidad y por hacerme partícipe de la rutina universitaria de la que tanto disfruto.

Agradecer también a Modesto Carballo Álvarez, a Laura Navarro Sampedro y a Cristina Reyes Guirao del Servicio General de Biología del Centro de Investigación Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS). Han sido un pilar fundamental durante la fase experimental de este proyecto de investigación y les estaré siempre agradecida.

A Cristina Vaquero Aguilar, a Juan Luis Ribas Salgueiro y a Consuelo Cerrillos González del Servicio de Microscopía del Centro de Investigación Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) por su buena disposición, ideas y explicaciones de este complejo mundo de la investigación.

Por último, agradecer a Ángel Barranco Quero y a M.^a Carmen López Santos, del Instituto de Ciencias de los Materiales de Sevilla (ICMS), centro adscrito al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Este proyecto de investigación se ha enriquecido gracias a sus conocimientos, su profesionalidad y a su apoyo. Por todo ello, quiero expresarles mi gratitud.



ÍNDICE

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS	11
1.RESUMEN	17
2.INTRODUCCIÓN	23
2.1 BIOLOGÍA Y ANATOMÍA DE LOS TEJIDOS BLANDOS PERIIMPLANTARIOS.....	23
2.1.1 El fibroblasto: estructura y funciones	23
2.1.2 Proteínas responsables de la adhesión celular	25
2.1.3 Anatomía de los tejidos blandos periimplantarios	30
2.1.4 Cicatrización de los tejidos periimplantarios	32
2.1.5 Interacción de la célula con la superficie del material de rehabilitación implantológica.....	34
2.1.6 Factores implicados en la respuesta celular a la superficie del material de rehabilitación implantológica.....	35
2.2 BIOCMPATIBILIDAD	41
2.3 BIOMATERIALES	42
2.3.1 Metales: titanio y aleaciones	44
2.3.2 Biocerámicas	45
2.3.3 Ventajas y desventajas de las restauraciones totalmente cerámicas.....	63
2.4 MATERIALES CAD/CAM	64
2.5 TRATAMIENTOS DE SUPERFICIE EN LOS MATERIALES IMPLANTOLÓGICOS Y DE RESTAURACIÓN IMPLANTOLÓGICA	69
3. HIPÓTESIS.....	75
4. OBJETIVOS	79
Objetivo general.....	79
Objetivos específicos.....	79
5. MATERIAL Y MÉTODO	83
5.1. MATERIAL.....	83
5.1.1 Cerámicas de estudio	83
5.1.2 Fabricación de los discos de estudio	84
5.1.3 Material empleado para el cultivo celular	85
5.1.4 Material empleado para la visualización de muestras.....	87
5.2. MÉTODO.....	87
5.2.1 Estudio de caracterización de superficie.....	89
5.2.2 Cultivo celular.....	94
5.2.3 Estudio citomorfométrico y de cubrimiento celular de los discos.....	96
5.2.4 Estudio de citotoxicidad del material.....	103

5.2.5 Estudio de secreción de colágeno tipo I.....	109
6. RESULTADOS	119
6.1 CARACTERIZACIÓN DE SUPERFICIE	119
6.1.1 Análisis de composición de superficie.....	119
6.1.2 Topografía de superficie.....	120
6.1.3 Perfilometría	121
6.1.4 Humectabilidad	124
6.2 ESTUDIO CITOMORFOMÉTRICO Y DE CUBRIMIENTO CELULAR DE LOS DISCOS.....	127
6.3 VALORACIÓN CUALITATIVA DEL EFECTO DE LOS MATERIALES DE ESTUDIO A NIVEL MORFOLÓGICO Y DE ANCLAJE CELULAR.....	138
6.4 ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD DEL MATERIAL.....	141
6.5 ESTUDIO DE SECRECIÓN DE COLÁGENO TIPO I.....	145
7. DISCUSIÓN.....	151
7.1 Tipo de célula empleada en los cultivos.....	152
7.2 Importancia del material empleado para la organización de los tejidos blandos periimplantarios.....	153
7.3 Composición y topografía de superficie: factores influyentes en la respuesta celular ..	154
7.4 Influencia de la humectabilidad de superficie en el anclaje celular	158
7.5 Influencia de los materiales de estudio en el conteo celular, citomorfometría y cubrimiento del disco.....	161
7.6 Citotoxicidad de los materiales estudiados.....	163
7.7 Influencia del tipo de material en la secreción de colágeno tipo I	166
7.8 Limitaciones del estudio.....	168
7.9 Perspectivas futuras	170
8. CONCLUSIONES	174
9. BIBLIOGRAFÍA.....	178
10. ANEXOS	214
Anexo 1. Artículo publicado	214
Anexo 2. Publicación de resolución de premio al mejor artículo científico.....	232
Anexo 3. Artículo publicado	234

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

ω^2 : Omega cuadrado (índice estadístico empleado en ANOVA)

ε^2 : Épsilon cuadrado (índice estadístico empleado en Kruskal-Wallis)

M: Molar

3D: Tridimensional

AC: Ángulo de contacto.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AG: Sociedad Anónima (*Aktiengesellschaft*).

ANOVA: Análisis de varianza (*ANalysis Of Variance*)

ATZ: Alúmina reforzada con circonio (*Alumina Toughened Zirconia*)

BSA: Albúmina bovina sérica (*Bovine Serum Albumin*)

CAD/CAM: Diseño asistido por ordenador - Fabricación asistida por ordenador (*Computer Aided Design-Computer Aided Manufacturing*)

Céls: Células

CEREC: Reconstrucción en cerámica (*CEramic REConstruction*)

CITIUS: Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla

cm: Centímetro

CNC: Controlada numéricamente por ordenador (*Computer Numeric Controlled*)

CO₂: Dióxido de carbono

COL1: Colágeno tipo I

Cos: Coseno

CpTi: Titanio comercialmente puro (*Commercially pure Titanium*)

CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Sevilla

DAPI: Fluorocromo 4',6-diamino-2-fenilindol

DeCS: Descriptores en Ciencias de la Salud

DIC: Contraste de interferencia diferencial (*Differential Interference Contrast*)

DLP: Proyección de luz digital (*Digital Light Projection*)

DMEM: Medio de Dulbecco Modificado por Eagle. (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMLS: Sinterizado directo de metal por láser (*Direct Metal Laser Sintering*)

DMSO: DiMetil Sulfóxido

DPBS: Tampón fosfato salino de Dulbeccos (*Dulbeccos Phosphate Buffered Saline*)

EDAX: Análisis por dispersión de energías de rayos-X (*Energy Dispersive Analysis X-ray*)

EDS: Espectrómetro de energía dispersiva (*Energy Dispersive Spectrometer*)

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético (*Ethylene Diamine Triacetic Acid*)

EELS: Espectroscopía de pérdida de energía de electrones (*Electron Energy-Loss Spectroscopy*)

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*)

ETD: Detector Everhart-Thornley (*Everhart-Thornley Detector*)

FE-SEM: Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (*Field Emission- Scanning Electron Microscopy*).

Fig.: Figura

FSZ: Circonia totalmente estabilizada (*Fully stabilized Zirconia*)

g: Fuerza o medida de aceleración.

GmbH: Sociedad con responsabilidad limitada (*Gesellschaft mit beschränkter Haftung*).

GPa: GigaPascal

GPS: Especificaciones geométricas del producto. (*Geometric Product Specifications*).

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HGFs: Fibroblastos gingivales humanos. (*Human Gingival Fibroblasts*).

HRP: Enzima peroxidasa del rábano (*Horseradish Peroxidase*).

ICAM: Molécula de adhesión intercelular (*InterCellular Adhesion Molecule*)

ISC: Instituto para la investigación de silicatos (*Institute for Silicate Research*)

ISO: Organización Internacional para la Estandarización (*International Organization for Standardization*)

IVDR: Regulación de dispositivos in vitro (*In Vitro Devices Regulation*)

LS₂: Disilicato de litio (*Lithium Disilicate*)

LED: Diodo emisor de luz (*Light-Emitting Diode*)

LSM: Microscopio confocal de barrido láser. (*Laser Scanning Microscope*).

LTD: Degradación a baja temperatura (*Low Temperature Degradation*) MDR: Regulación de dispositivos médicos (*Medical Devices Regulation*)

MEB: Microscopio Electrónico de Barrido

MEC: Matriz extracelular

MEM: Medio de cultivo modificado de Eagle (*Modified Eagle's Medium*)

MeSH: Encabezados de temas médicos (*Medical Subject Headings*)

MIT: Instituto Tecnológico de Massachusetts (*Massachusetts Institute of Technology*)

ml: mililitro

MMP: Metaloproteinasas de la matriz extracelular (*Matrix MetalloProteinase*)

MPa: MegaPascal

MSC: Cabina de seguridad microbiológica. (*Microbiological Safety Cabinet*)

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide.

Nº: Número

ng: nanogramo

nm: nanómetro

nM: nanoMolar

OD: Densidad óptica (*Optical Density*)

p: probabilidad estadística

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

pH: Potencial de hidrogeno.

PICN: Matriz de cerámica infiltrada con polímero (*Polymer Infiltrated Ceramic Network*)

PSZ: Circonia parcialmente estabilizada (*Partially Stabilized Zirconia*)

RCF: Campo centrífugo relativo (*Relative Centrifugal Field*)

RDI: Regiones de interés

RGB: Rojo verde azul (*Red Green Blue*)

RPM: Revoluciones por minuto.

Sa: Media aritmética de la rugosidad en tres dimensiones.

SAMs: Monocapas autoensambladas (*Self-Assembled Monolayers*)

SDD: Cámara de deriva de silicio (*Silicon Drift Detectors*).

SE: Electrón secundario (*Secondary Electron*)

SFB: Suero Fetal Bovino

SFE: Energía Libre de Superficie (*Surface Free Energy*)

SL: Estereolitografía (*StereoLitography*)

SLM: Fundición selectiva por láser (*Sintering Laser Melting*)

SLS: Sinterizado Selectivo por Láser (*Selective Laser Sintering*)

SPSS: Paquete estadístico para ciencias sociales. (*Statistical Package for the Social Sciences*).

STL: Lenguaje de triangulación estandarizado (*Standard Triangulation Language*)

TBS: Tampón salino Tris (*TRIS-Buffered Saline*)

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β (*Transforming Growth Factor β*)

TIF: Archivo de imagen etiquetado (*Tagged Image File*)

TMB: Sustrato enzimático cromogénico 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

TZP: Circonia tetragonal policristalina (*Tetragonal Zirconia Polycrystal*)

u: unidad de masa atómica

μm : Micrómetro

UV-C: Rayos ultravioleta tipo C

v./ver.: Versión

wt.%: porcentaje en masa (*weight percentage*)

Y-TZP: Circonia tetragonal policristalina estabilizada con itrio. (*Yttria-stabilized Tetragonal Zirconia Polycrystal*)

ZLS: Silicato de litio reforzado con circonia (*Zirconia-reinforced Lithium Silicate*)

ZTA: Circonia reforzada con alúmina (*Zirconia Toughened Alumina*)

Resumen



1. RESUMEN

Introducción: Esta tesis doctoral tiene como propósito la valoración de un nuevo material CAD/CAM: el silicato de litio reforzado con circonia (ZLS) y su comparación con circonia (Y-TZP), considerado *gold estándar* en su uso como aditamento implantológico en restauraciones estéticas. Diversas publicaciones han analizado las propiedades mecánicas de ZLS, pero pocos estudios tratan de su comportamiento en contacto con tejidos blandos.

Hipótesis de trabajo: Se asume la igualdad de comportamiento celular en ambos materiales de estudio.

Objetivo: Evaluar la respuesta *in vitro* de fibroblastos gingivales humanos (HGFs) al ser cultivados sobre superficies de ZLS, Y-TZP y discos control de poliestireno.

Material y Método: Se realizó la caracterización de los discos de estudio a través de un análisis composicional, topográfico y de humectabilidad de superficie. Se compararon distintos parámetros citomorfométricos, conteo y esparcimiento celular temprana a las 24 horas. Se evaluó la citotoxicidad del material a través del análisis de la viabilidad celular por contacto directo con el material en tres tramos de tiempo: 24, 48 y 72 horas. Se cuantificó la secreción de colágeno tipo I por parte de las células a las 24 y 72 horas.

Resultados: La superficie de circonia estabilizada con itrio (Y-TZP) presentó un mayor número de células y éstas exhibieron parámetros citomorfométricos superiores con mayor cubrimiento del disco. Ambos materiales mostraron una moderada citotoxicidad en las primeras 24 horas, que se redujo no habiendo diferencias estadísticamente significativas a partir de las 48 horas, alcanzándose niveles biológicamente aceptables (>70% viabilidad) a las 72 horas. La secreción de colágeno no reveló superioridad de un material respecto a otro a las 24 horas, aunque Y-TZP fue significativamente superior a las 72 horas ($p < 0,001$).

Conclusión: La superficie de Y-TZP genera una respuesta celular más favorable a nivel de conteo celular y esparcimiento sobre la superficie, con mayor viabilidad inicial a las 24 horas. La secreción de colágeno fue superior en Y-TZP a las 72 horas sin presentar diferencias en relación a ZLS a las 24 horas. Son necesario más estudios para poder afianzar estos hallazgos y poder extrapolar los resultados al ámbito clínico.

Palabras clave (DeCS): Porcelana Dental; Circonia; Silicatos; Pilares Dentales; CAD-CAM; Propiedades de superficie; Humectabilidad; Ensayo de Materiales; Fibroblastos; Supervivencia Celular; Colágeno Tipo I.

ABSTRACT

Introduction: The purpose of this doctoral thesis is to evaluate a new CAD/CAM material: zirconia-reinforced lithium silicate (ZLS) and compare it with zirconia (Y-TZP), which is considered the gold standard when used as implant abutment for aesthetic restorations. The mechanical properties of ZLS have been the subject of many studies, but few have evaluated soft tissues response to this material.

Working hypothesis: The working hypothesis was an equal cellular behavior on both studied materials.

Aim: To evaluate the *in vitro* response of human gingival fibroblasts (HGFs) seeded on ZLS and Y-TZP surfaces and control discs of polystyrene.

Material and Methods: A compositional, topographical and wettability surface characterization of the discs was conducted. Cytomorphometric parameters and early cellular count and spreading were evaluated at 24 hours. Cytotoxicity assays were undertaken through the material direct contact cellular viability analysis at 24, 48 and 72 hours. Cellular collagen type I secretion was quantified at 24 and 72 hours.

Results: Yttrium stabilized zirconia (Y-TZP) surface improved the cellular response, with higher cell count and cytomorphometric parameters with increased surface coverage. Both materials showed a moderate cytotoxicity within the first 24 hours, but it decreased over time, not having statistically significant differences between both groups after 48 hours and reaching acceptable levels (>70% viability) at 72 hours. Secretion of collagen was superior on Y-TZP at 72 hours ($p < 0.001$) not having statistically significant differences with ZLS at 24 hours.

Conclusion: Y-TZP provides a better cellular response for cell count and spreading on the surface and higher early viability at 24 hours. Secretion of collagen was superior on Y-TZP at 72 hours not having statistically significant differences with ZLS at 24 hours. Further studies are needed to consolidate these findings and therefore extrapolate the results into clinical practice.

Keywords (MeSH terms): Dental Porcelain; Zirconium/chemistry; Silicates/chemistry; Dental Abutments; CAD-CAM; Surface Properties/Wettability; Materials Testing; Fibroblasts/cytology; Cell Survival; Collagen Type I.

Introducción



2. INTRODUCCIÓN

Para poder comprender las interacciones que tienen lugar entre una superficie cerámica y los tejidos blandos periimplantarios, es importante conocer la disposición anatómica que da lugar al sellado biológico una vez se conecta un aditamento al implante dental.

2.1 BIOLOGÍA Y ANATOMÍA DE LOS TEJIDOS BLANDOS PERIIMPLANTARIOS

2.1.1 El fibroblasto: estructura y funciones

El fibroblasto es la célula predominante del tejido conectivo del periodonto y deriva de la cresta neural. Se trata de la célula menos especializada del sistema conectivo por ausencia de carácter epitelial, inflamatorio o vascular.^{1,2} Debido a su falta de diferenciación, los fibroblastos intraorales presentan potencial de diferenciación osteogénica *in vitro*.³ Su función consiste en la formación y remodelación del tejido conectivo a través de la síntesis de moléculas estructurales de la matriz extracelular (MEC). Además, tienen un papel fundamental en la homeostasis y poseen motilidad y contractibilidad para remodelar los tejidos tras una lesión.⁴ Presentan un fenotipo fusiforme o estrellado cuando la célula está totalmente extendida sobre una superficie.²

Las interacciones que se dan entre las células y la MEC dependen, entre otros factores, del citoesqueleto, el cual está formado por varios componentes responsables de la movilidad de la célula y de proporcionar soporte mecánico para mantener su estructura interna. Además, regula el crecimiento, la diferenciación y la división celular. Está formado por proteínas en forma de microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos (figura 1).⁵ Los microfilamentos son los también llamados fibras de estrés y consisten en haces paralelos de filamentos que tienen entre 5 y 7 nm de diámetro. Estos filamentos generalmente se encuentran proyectados de forma oblicua con un extremo en el citoplasma y otro en la membrana plasmática en zonas de adhesión al sustrato. También se encuentran en una capa cortical bajo la membrana plasmática tanto en la parte superior como inferior de las superficies celulares, pero formando una red en la que los filamentos están dispuestos de forma desordenada. Esta capa da soporte y resistencia a la membrana plasmática. Los microfilamentos son proteínas de actina, miosina, troponina, tropomiosina, filamina y α -actinina. La miosina es una proteína muy presente en la motilidad celular y que presenta dos formas: globular (G-actina) y filamentosa (F-actina) y tiene un polo negativo y otro positivo. Los filamentos de actina van acompañados de la proteína actina en forma de monómeros y también con otra proteína llamada miosina, responsable de la contractibilidad celular.^{5,6}

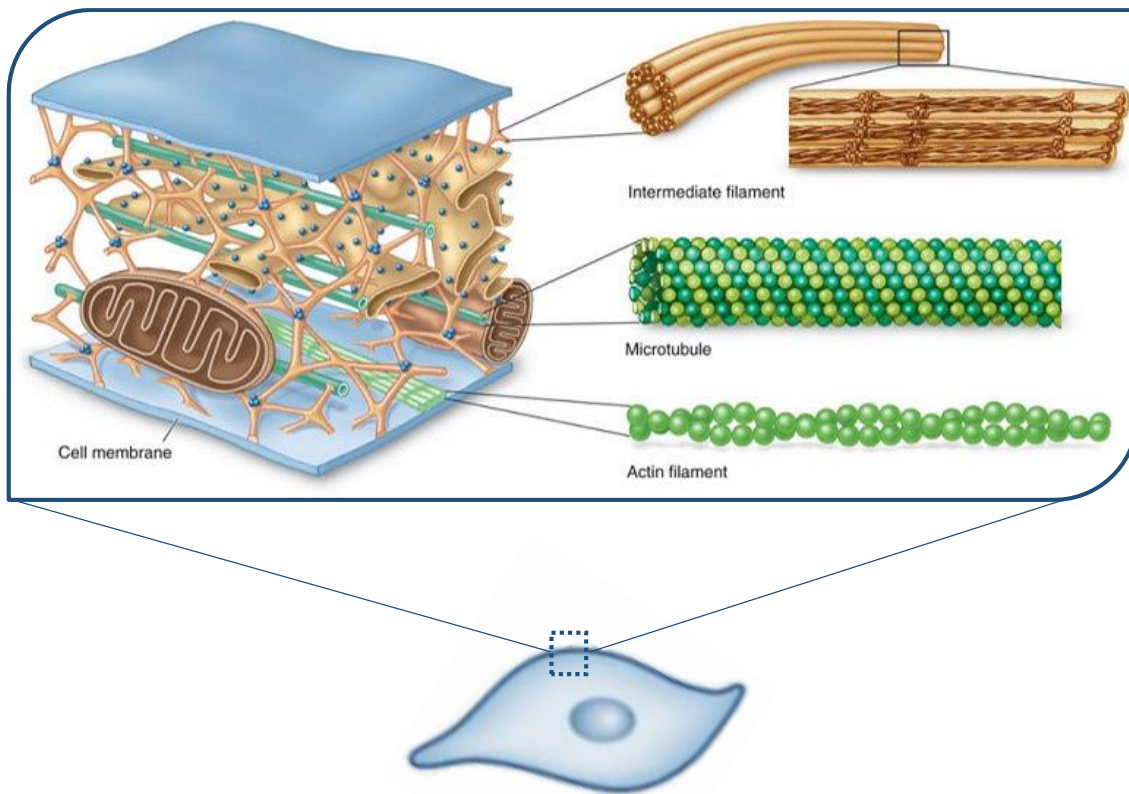


Figura 1. Disposición de los filamentos del citoesqueleto en la membrana plasmática de un fibroblasto.⁷

Los filamentos intermedios, tal y como su nombre indica, son los de tamaño intermedio con un diámetro de alrededor de 10 nm. Se encuentran en el interior del citoplasma y se basan en la unión de diferentes subunidades proteicas que se clasifican en cinco grupos: filamentos de queratina (presentes en células epiteliales), vimentina (presente en células de origen mesenquimal como los fibroblastos), neurofilamentos, filamentos gliales y filamentos de desmina en las células musculares. Estos filamentos rodean el núcleo y se extienden por el citoplasma hasta la periferia donde interactúan con la membrana plasmática y su función es dar estabilidad mecánica. Son las fibras más resistentes, no son polares y generalmente acompañan a los microtúbulos en su función de apoyo mecánico.

Los microtúbulos están formados principalmente por la proteína tubulina, la cual es polar como la actina. Generalmente se encuentran en el citoplasma de forma individual o en haces organizados de unos 25 nm dando forma a la célula. Su función consiste en organizar los orgánulos intracelulares y proporcionar soporte en la motilidad celular.⁶

2.1.2 Proteínas responsables de la adhesión celular

Cuando se inserta o implanta un biomaterial, no se produce un contacto directo entre las células y la superficie del material. La interacción entre ambos se produce a través de las proteínas del plasma y de la matriz extracelular (MEC) si se trata de un medio natural, o bien a través de las proteínas del suero fetal bovino (SFB) en condiciones *in vitro*.^{5,8,9}

Las proteínas se pueden clasificar en adhesivas y no adhesivas en función de si permiten o no la posterior adhesión celular a una superficie. La albúmina es una proteína no adhesiva y la fibronectina, el fibrinógeno o la vitronectina son proteínas adhesivas basadas en su unión al receptor de integrina.¹⁰

En un tejido vivo, las células sintetizan la matriz extracelular, formada por proteínas con las que interactúa para llevar a cabo diversas funciones. La MEC es el componente no celular que se encuentra presente en todos los tejidos y que está compuesta de moléculas procedentes del suero y/o secretadas por las células.¹¹ Es una estructura muy dinámica que constantemente remodela sus componentes moleculares y otorga propiedades mecánicas y bioquímicas al órgano o tejido y además ejerce protección a través de un efecto tampón que mantiene la homeostasis extracelular y la retención de agua. La remodelación de la MEC se basa en la síntesis de proteínas y proteólisis, esta última llevada a cabo por metaloproteinasas (MMP).¹⁰

Otra de las funciones de la MEC es interactuar con los factores de crecimiento y los receptores transmembrana para la transducción de señales al interior de la célula para generar una respuesta fisiológica.¹² Además, tiene un papel crucial en mediar la adhesión celular cuando se implanta un nuevo material a través de su organización y producción de moléculas y proteínas.¹³ La interacción de la célula con la matriz extracelular es por tanto un proceso complejo, dinámico y bidireccional.

La composición de la MEC dependerá del tejido. Las principales macromoléculas que podemos encontrar en la MEC de un fibroblasto gingival son los proteoglicanos, los glicosaminoglicanos, las proteínas fibrosas como el colágeno I y III, la elastina y las proteínas adhesivas como la fibronectina, la vitronectina y la laminina. Estas últimas son mediadoras de las interacciones entre las células y las superficies de los materiales. Las proteínas fibrosas proporcionan soporte estructural a la matriz extracelular.¹²

Existen identificados más de 20 tipos de colágeno siendo el colágeno tipo I el que representa la mayor proporción del total del colágeno en todo el cuerpo. Es el tipo de colágeno más abundante en los tejidos periodontales (representa el 60% de las proteínas).¹⁴ Se encuentra en hueso, tendones, ligamentos, vasos sanguíneos, pulmones, córnea y dermis. Es la proteína fibrosa más abundante (hasta un 30% del

Introducción

total proteico) dentro de la MEC intersticial y proporciona resistencia a la tensión, regula la adhesión celular y promueve la migración celular.¹⁵

El colágeno es una molécula compuesta por tres cadenas estrechamente unidas por puentes de hidrógeno en una triple hélice que mide 300 nanómetros de largo y 1,5 nanómetros de diámetro. Dos de las cadenas son llamadas $\alpha 1$ y la otra $\alpha 2$. Se basa en la repetición de una secuencia de aminoácidos (Gly-X-Y) en la que se encuentra glicina, prolina e hidroxiprolina (figura 2). Estas cadenas se ensamblan en forma de fibrillas y este proceso tiene lugar en el interior de la célula para formar la molécula de procolágeno que posteriormente se excreta desde el interior del fibroblasto hacia el espacio extracelular. Las proteasas escinden los grupos terminales amino y carboxilo para dar lugar a la formación a las fibras de colágeno o fibrilogénesis. Posteriormente las fibrillas se agrupan en fibras que constituyen los tejidos.^{16,17}

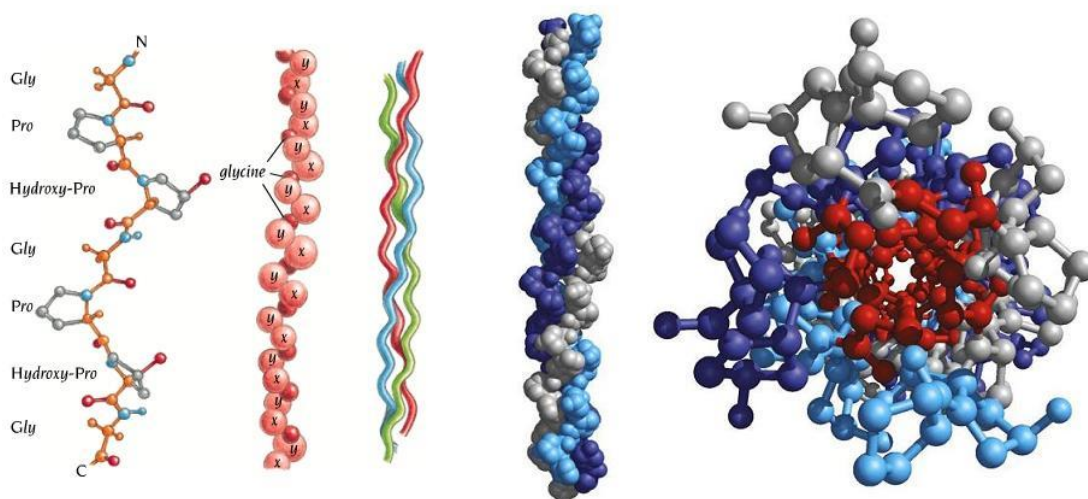


Figura 2. Estructura del colágeno.¹⁸

Una vez ya formado el colágeno, las colagenasas y las metaloproteinasas son las que degradan el colágeno en los tejidos. Este es un proceso necesario para la normal remodelación y reparación de los mismos. Un exceso o defecto en esa remodelación implica la aparición de enfermedades como el síndrome de Ehler-Dalos o el de Marfan.¹⁹

El segundo tipo de colágeno más abundante en los tejidos periodontales es el colágeno tipo III, que está formado por tres cadenas $\alpha 1$ y se presenta en pulmones, vasos sanguíneos y dermis. Se presenta junto con el tipo I en los tejidos elásticos excepto en el hueso.²⁰ El tipo I mantiene la estructura de los tejidos gingivales mientras que el tipo III da elasticidad a los tejidos junto con la elastina.¹³

El fibrinógeno es otra glicoproteína fibrosa y precursor de la fibrina, que se encuentra en el plasma sanguíneo desempeñando funciones como la homeostasis, angiogénesis, inflamación y curación de heridas.²¹

Las proteínas adhesivas ayudan a la célula a anclarse a una zona apropiada de la MEC a través de la exposición de una secuencia de aminoácidos específica (Arg-Gly-Asp=RGD) que en el caso de los fibroblastos está presente en la fibronectina y que es reconocida por los receptores de superficie de la célula.^{1,5,11,22,23} La fibronectina es una glicoproteína adhesiva que se presenta de forma plasmática soluble y está presente en la sangre y en fluidos extracelulares. En la MEC del tejido conectivo se presenta en forma de fibrillas insolubles. Está implicada en diversas funciones como la organización de la MEC intersticial, la adhesión de los fibroblastos, el crecimiento, la motilidad y la diferenciación celular.²⁴ La vitronectina es una glicoproteína multifuncional presente en la matriz extracelular que une glicosaminoglicanos, colágeno, y otras moléculas de la MEC. Se encuentra principalmente en el tejido conectivo de la encía, el periostio y el ligamento periodontal.¹⁴

En el caso de las células epiteliales, la proteína que ancla las células a la lámina basal es la laminina-5, la cual es una glicoproteína que promueve el anclaje de las células epiteliales a través de la formación de hemidesmosomas.¹³

Además, existen proteínas transmembrana que actúan de receptores de membrana y unen las proteínas intracelulares con las de la MEC para conseguir su adhesión al sustrato. Existen cuatro tipos: integrinas, cadherinas, selectinas y moléculas de adhesión intercelular (ICAMs).⁵

Las integrinas constituyen una de las principales familias de receptores de adhesión celular y están compuestas por una subunidad α y una subunidad β . Además, presentan una parte extracelular, una parte transmembrana y un dominio citoplasmático a través del cual se anclan a proteínas del citoesqueleto.^{14,25} Estas proteínas regulan diversas funciones como la motilidad, la forma, el crecimiento y la diferenciación celular.²⁶ Los fibroblastos gingivales expresan subunidades de integrinas α_2 , α_5 y β_1 que son receptores específicos de adhesión celular y de unión al colágeno tipo I.^{27,28}

Introducción

En la mucosa periimplantaria las integrinas tienen un papel fundamental en la adhesión de las células a la superficie de un material ya que son las proteínas que permiten la unión de estructuras intracelulares con proteínas de la MEC. Sin embargo, la unión de las proteínas transmembrana a los dominios de la matriz extracelular no supone una unión suficiente como para asegurar la adhesión de la célula a la superficie de un material y es por ello por lo que estas proteínas transmembrana deben de unirse a su vez a otras proteínas de anclaje intracelular como la talina que a su vez se une a la vinculina y ésta a la actina del citoesqueleto. Se forma por lo tanto una cadena proteica que da lugar a la formación de los llamados contactos o adhesiones focales.^{10,29} Estos complejos supramoleculares están formados por otras proteínas como la α -actinina y moléculas de señalización como la quinasa de adhesión focal FAK o paxilina (figura 3).^{24,30}

Las integrinas reconocen los ligandos RGD de las proteínas de la matriz extracelular matriz y se unen a ellas. Dicha unión induce a la reorganización del citoesqueleto de actina y así éste puede enviar señales de contractibilidad para orientar la MEC sobre la superficie de un biomaterial. Generalmente los contactos focales se encuentran en células fibroblásticas y median en su adhesión y esparcimiento sobre la superficie de un biomaterial.⁸ Los ligandos de unión RGD a una superficie disminuyen en densidad conforme más fuerte es la adhesión celular a la superficie.³¹ La quinasa de adhesión focal (FAK) es una proteína reguladora de la migración celular, señalización de la adhesión y mecanosensora. En los contactos focales se unen a la talina y ésta a su vez al dominio citoplasmático de la integrina. Esta unión es crítica en la regulación de la fuerza de adhesión celular.^{5,32}

Otro tipo de estructuras multiproteicas son los hemidesmosomas, que realizan la unión célula-célula y además unen las células epiteliales con los elementos de la lámina basal de la MEC a través de las integrinas.⁵ La lámina basal, que forma una barrera entre el epitelio y el tejido conectivo, está mayoritariamente compuesta por glicoproteínas como la laminina.¹⁴ Las integrinas se unen a las plectinas intracelulares las cuales están a su vez unidas a los filamentos intermedios del citoesqueleto; las integrinas también se unen por el otro extremo a las lamininas-5 de la MEC. Estas últimas se encuentra en la superficie basal de las células epiteliales y las anclan a la lámina basal.¹⁰

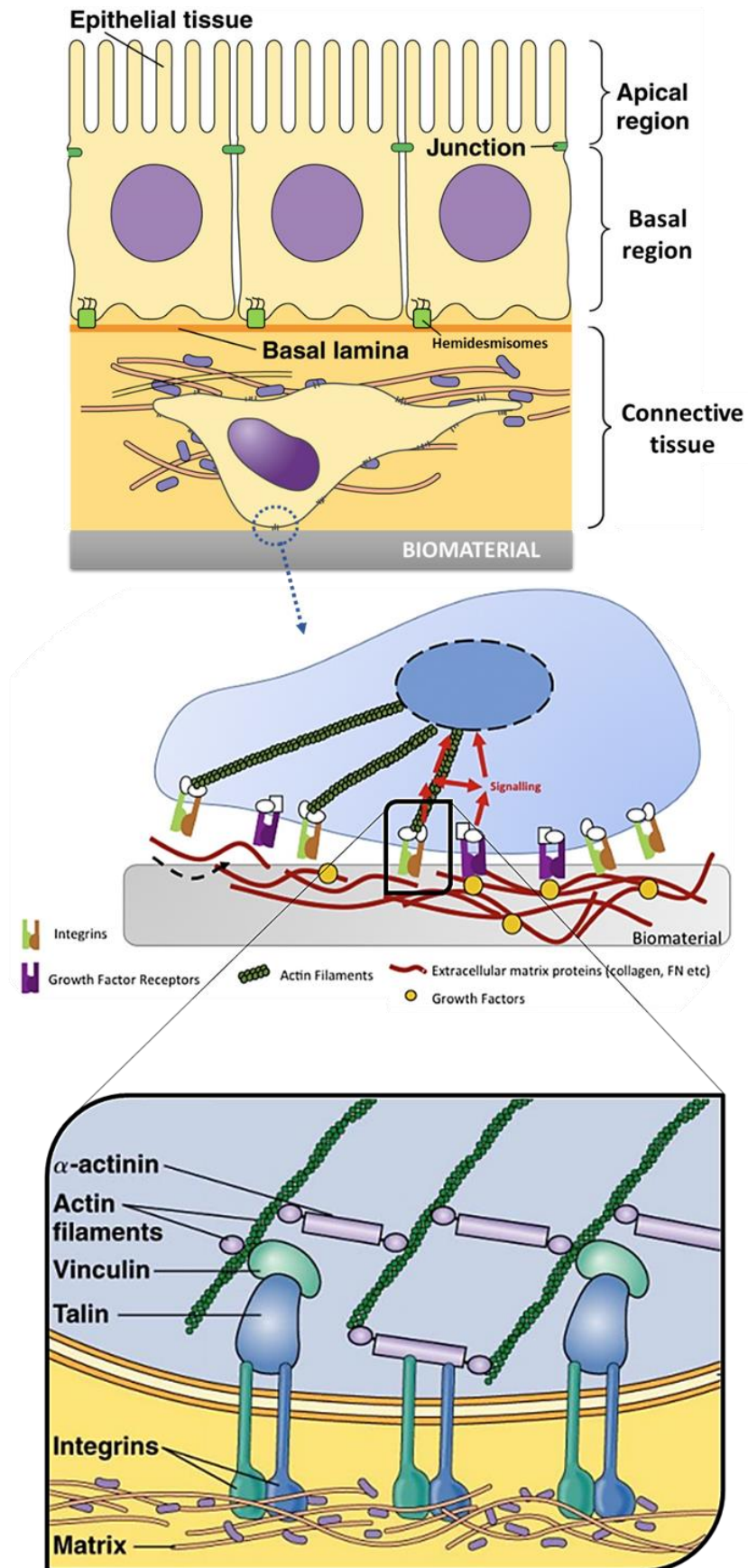


Figura 3. Adhesión focal de un fibroblasto a la superficie de un biomaterial. ^{7,29}

Introducción

En condiciones *in vivo*, las células se adhieren a una superficie a través de las proteínas plasmáticas como el fibrinógeno y la albúmina y a través de proteínas de la MEC como la fibronectina o la vitronectina; tras un contacto más prolongado, se produce la adsorción de proteínas como el colágeno y la laminina.²⁴

En condiciones *in vitro* las células se adhieren a las proteínas que se encuentran en el SFB como la albúmina, la vitronectina y la fibronectina.³⁴ Los fibroblastos dependen primariamente de la vitronectina y la fibronectina para conseguir su anclaje inicial y esparcimiento. Ambas proteínas forman parte de la matriz extracelular en igual cantidad en el medio natural, pero en el suero la vitronectina se encuentra en mayor cantidad que la fibronectina ya que presenta mayor habilidad en su adsorción competitiva y así conseguir el anclaje celular.³¹ Cuando se realiza un cultivo celular es importante controlar la proporción de proteínas adhesivas/no adhesivas del suero fetal bovino que se incorpora a un medio de cultivo para optimizar la adhesión celular a una superficie.³⁵ Habitualmente se añade un 10% de SFB al medio de cultivo.

2.1.3 Anatomía de los tejidos blandos periimplantarios

Los tejidos de la mucosa periimplantaria son similares a los que se encuentran alrededor de los dientes: el epitelio del surco, el epitelio de unión y el tejido conectivo (figura 4). La mucosa oral es escamosa estratificada y puede o no estar queratinizada;³⁶ el epitelio del surco y el de unión son no queratinizados. Ambos epitelios se anclan al aditamento y/o a la superficie del implante a través de hemidesmosomas en la lámina basal interna,^{3,37,38} Este anclaje se da únicamente a nivel apical del epitelio de unión.^{3,39}



Figura 4. Disposición de la mucosa periimplantaria.⁴⁰

El anclaje epitelio-conectivo desde el epitelio del surco hasta la zona supracrestal forma un ancho biológico de 3-4 mm, la barrera epitelial mide alrededor de 2 mm y la conectiva alrededor de 1-1.5 mm de altura.^{41,42} Por otro lado, los haces de fibras de colágeno transcurren de forma paralela a la superficie del aditamento bien en el sentido apico-coronal o bien de forma circunferencial alrededor del aditamento y en ellos se basa la estabilidad de la mucosa periimplantaria.^{3,43,41} Sin embargo, con la llegada de los tratamientos de descontaminación de superficie como el plasma de argón, se ha observado que la orientación de las fibras de colágeno se da de forma perpendicular y oblicua alrededor de los 180° sobre la superficie del aditamento y el implante.⁴⁴ Además, la creación de surcos a nivel nanométrico en la zona transgingival del aditamento, consigue guiar el anclaje de las fibras de colágeno a su alrededor con proyección perpendicular, evitando la migración apical del epitelio de unión.⁴⁵

El tejido conectivo supracrestal presenta una zona interna que es rica en fibroblastos, pero presenta pocos vasos sanguíneos y fibras de colágeno en comparación con la anatomía dentaria. El anclaje del tejido conectivo se establece a través de los fibroblastos. Por otro lado, la zona externa de este tejido conectivo presenta una composición cicatricial ya que tiene poca cantidad de fibroblastos, pero es rica en vasos sanguíneos y en colágeno. Esta distribución histomorfométrica se ha observado tanto en aditamentos de titanio como de circonia.^{43,46} El aporte de nutrientes por parte del flujo sanguíneo depende del tejido conectivo y del tejido óseo circundante a falta de tejidos como el ligamento periodontal.⁴² El colágeno del tejido conectivo periimplantario se corresponde principalmente con los tipos I y III además de IV, V y VI en menor proporción.^{38,47}

A pesar de que los tejidos constituyentes de la mucosa periimplantaria son similares a los que se encuentran alrededor de los dientes, cuando se realiza una incisión y se coloca un implante o un aditamento, la barrera de protección del hueso subyacente se interrumpe y no proporciona el mismo sellado frente a las bacterias que cuando se encuentra alrededor de un diente, es por tanto un sellado más débil. Esto es debido principalmente a una cuestión anatómica, ya que las fibras de colágeno no tienen una capa de cemento sobre la que insertarse como sucede en la anatomía dental (fibras de Sharpey) (figura 5). De acuerdo con algunos estudios, el débil anclaje de los tejidos implantarios en la zona transmucosa podría deberse a otros factores secundarios como la menor capacidad inmunológica de los tejidos y a las características electroestáticas del titanio o la liberación de iones de su estructura; no obstante, la razón todavía no está clara.^{48,49}

El buen mantenimiento de los tejidos blandos es clave para conseguir un buen pronóstico a largo plazo de los implantes y del tejido óseo que lo rodea. Es importante mantener unido de forma permanente el aditamento transgingival al implante para evitar la ruptura del anclaje creado ya que el tejido que principalmente se ve afectado es el conectivo, que pierde altura con la continua conexión y desconexión de pilares de cicatrización, no ocurriendo esto en el tejido epitelial.³⁸

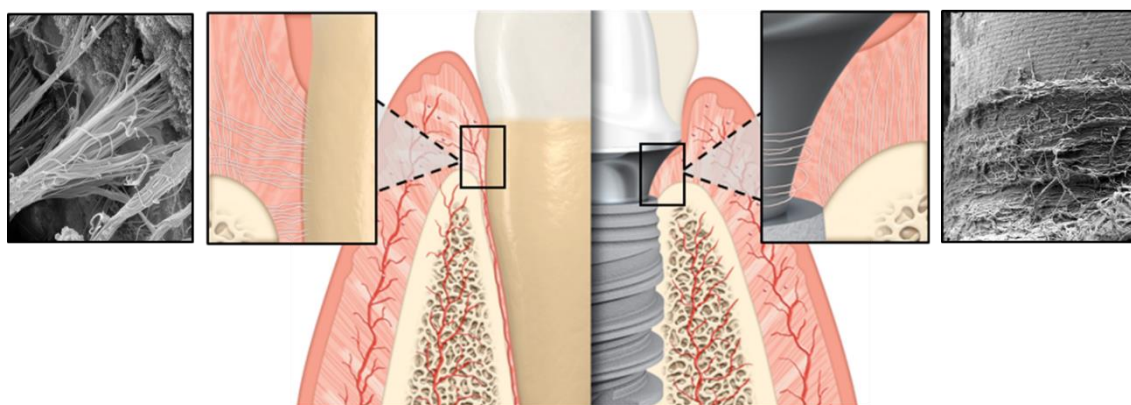


Figura 5. Comparación de tejido epitelio-conectivo en diente e implante.

Izquierda: fibras de Sharpey ancladas en el cemento óseo en un diente (izquierda). Derecha: fibras de colágeno con disposición paralela a la zona transgingival del aditamento.^{3,40}

2.1.4 Cicatrización de los tejidos periimplantarios

La incisión que se realiza en la encía para la colocación de un aditamento o un implante conlleva la generación de una respuesta secuenciada de curación de la herida para volver a sellar los tejidos alrededor del nuevo material. Esta respuesta implica a células epiteliales, conectivas y endoteliales.

Se suceden tres fases en la respuesta de curación de una herida: formación de coágulo sanguíneo e inflamación, formación de nuevo tejido y remodelación de los tejidos. La formación del coágulo se produce entre la mucosa y la superficie del aditamento o el implante para controlar el sangrado arterial y venoso. Se forma un tapón plaquetario que contiene fibrina, fibronectina, plaquetas y fibrinógeno que proporciona un andamiaje provisional para la restructuración de los tejidos (figura 6).⁵⁰ Este tapón o matriz también permite la migración de células a la zona de la herida como neutrófilos y macrófagos que llegan en las primeras horas de la lesión y fagocitan los microorganismos contaminantes. Posteriormente los macrófagos inician el proceso de formación y regulación de nuevo tejido a través de la liberación de factores de crecimiento.⁵¹ Esta fase inflamatoria dura aproximadamente dos días y los leucocitos disminuyen en número y migran a la zona coronal. La formación de nuevo tejido corre a cargo de células del tejido epitelial, conectivo y endotelial que liberan factores de crecimiento como TGF- α y TGF- β que inducen la expresión de las integrinas, colagénesis y angiogénesis.^{50,51} Con el paso de las semanas, se produce la formación de nuevos vasos sanguíneos o angiogénesis y la matriz cicatricial es invadida por miofibroblastos—que son un subtipo de fibroblastos que se producen en tejidos de granulación—, los cuales están muy implicados en la respuesta de curación de la herida. Éstos sintetizan y organizan los haces de fibras de colágeno tipo III en la lámina propia para reestructurar el tejido conectivo en la zona apical de la superficie del aditamento y en la zona de interfase con el implante. Posteriormente

las metaloproteinasas o colagenasas fibroblásticas (MMP-1) de la MEC degradan el colágeno tipo III y éste es reemplazado por colágeno tipo I.^{13,52}

La cicatrización ocurre de coronal hacia apical con la formación progresiva de epitelio de unión y del tejido conectivo hacia apical durante las primeras cuatro semanas de la lesión y que se completa a las 6-8 semanas.³⁶

Para resumir, podría decirse que se produce un ciclo de síntesis y degradación de fibras de colágeno que dan lugar a la reestructuración de la matriz extracelular para proporcionar suficiente resistencia a la herida y evitar su posterior dehiscencia.^{50,52}

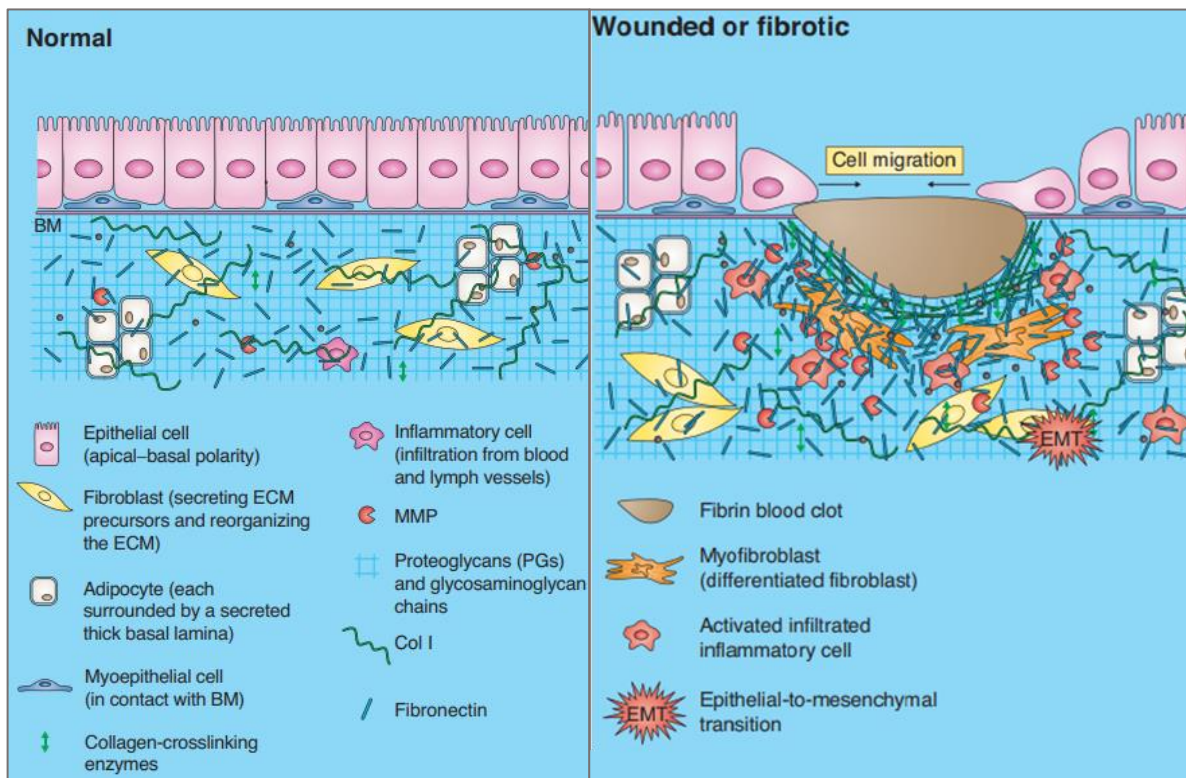


Figura 6. Estructura y moléculas que conforman la matriz extracelular normal (izquierda) y la formación del tapón plaquetario tras una lesión (derecha).¹²

La maduración de los tejidos puede prolongarse hasta las 6 -12 semanas. La cantidad de células fibroblásticas disminuye conforme más alejado esté el tejido de la superficie del aditamento o implante. La cicatrización de los tejidos alrededor del nuevo material sucede de la misma manera en animales y en humanos⁵³ y las dimensiones de los tejidos periimplantarios – que se alcanzan a las doce semanas- se mantienen estables durante 12-15 meses.⁵⁴⁻⁵⁶

El proceso de curación descrito anteriormente es necesario para eliminar el detrito celular y prevenir una posible infección.⁵⁷

2.1.5 Interacción de la célula con la superficie del material de rehabilitación implantológica.

Cuando se coloca un biomaterial en la mucosa periimplantaria como por ejemplo un aditamento implantológico cerámico, se desencadena una cascada de interacciones. La forma en la que los diferentes elementos interactúan con la superficie dependerá de la composición, estructura y propiedades del material (figura 7).

Las interacciones entre los grupos moleculares de la superficie del material (y/o las impurezas incorporadas) con las moléculas de la sangre o el medio de cultivo se producen en los primeros segundos de contacto. Las biomoléculas pueden proceder también del biofilm salival acelular compuesto fosfoproteínas y glicoproteínas y que se forma en función del pH, flujo y composición salivar. Estas interacciones están basadas en interacciones covalentes, iónicas o no covalentes como las interacciones electrostáticas, de van der Waals, en enlaces de hidrógeno o interacciones hidrófobas.⁵⁸ Los grupos moleculares de la superficie del material determinan el tipo de interacción y el grado de adsorción y plegamiento proteico.²⁴ Esta primera capa molecular, llamada capa de hidratación, ayuda a reducir la adhesión bacteriana.^{59,60}

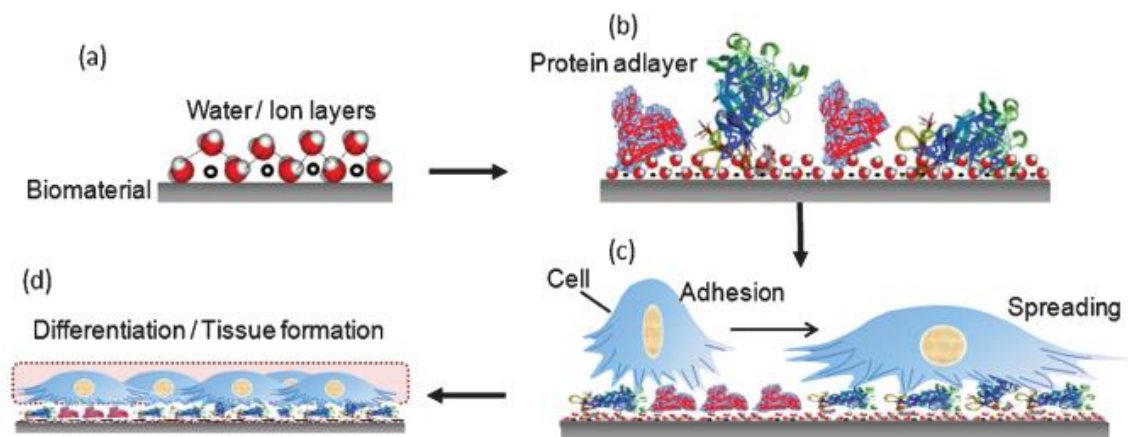


Figura 7. Orden de las interacciones que se suceden con la superficie de un biomaterial. (a): formación de capa de moléculas de agua e iones, (b): adsorción proteica, (c): adhesión y esparcimiento celular, (d): diferenciación y formación de tejidos.³⁵

Los siguientes elementos en adherirse a la superficie son las proteínas solubles como la albúmina o la fibronectina—procedentes de la sangre o del suero del medio de cultivo—que interactúan con las moléculas de agua de la capa de hidratación, la cual determina la conformación que adoptarán las proteínas para adsorberse a la superficie. Esta capa proteínica es dinámica y específica de la superficie ya que diferentes superficies desarrollarán recubrimientos muy diferentes en el mismo tejido debido a sus diferentes propiedades químicas.⁵⁸ La adsorción proteica se produce de forma competitiva, es decir, diversas proteínas compiten por adherirse a la superficie. Se produce así la desorción de algunas proteínas con la posterior adsorción de otras nuevas con mayor afinidad por la superficie, este fenómeno es conocido como efecto Vroman.⁶⁰⁻⁶² Las proteínas se adsorben a la superficie a través de enlaces iónicos, interacciones hidrófobas y de intercambio ion-dipolo.^{57,63}

La adhesión celular se produce a continuación, las células se adhieren a la capa proteica a través de los receptores de membrana de la matriz extracelular. Dicha matriz es una estructura dinámica al igual que la superficie del material, es por ello que entre ambas se produce el intercambio de proteínas, iones o moléculas. El resultado de dicha interacción dará lugar a la formación de un nuevo tejido organizado si la respuesta celular es favorable o por el contrario puede dar lugar a un tejido reactivo inflamatorio y fibroso.^{58,64}

2.1.6 Factores implicados en la respuesta celular a la superficie del material de rehabilitación implantológica

La adhesión de una célula a una superficie determinará la morfología, la proliferación, la migración e incluso la viabilidad de la misma. Los factores que influyen sobre el anclaje inicial de la célula y su posterior proliferación y diferenciación son la humectabilidad, la rugosidad, la topografía, la composición química, la rigidez y la carga de superficie.⁹

La composición química de una superficie, que comprende a los elementos constituyentes y a los grupos funcionales, da lugar a propiedades de superficie como la humectabilidad y la carga de superficie. Todos estos factores afectan en mayor o menor medida a la adsorción, plegamiento o desnaturalización proteica.⁶⁵

Las biomoléculas que se adsorben a la superficie pueden presentar distintos grupos funcionales como grupos hidrofóbicos (grupos aromáticos o cadenas alcalinas) o grupos hidrofílicos (-OH) o bien grupos de disociación como el carboxilo (-COOH); estos dos últimos grupos interactúan con los átomos de hidrógeno de las moléculas de agua.³⁵

La concentración de grupos hidroxilo (-OH) determina tanto la energía de superficie como la hidrofiliidad del sustrato. La interacción de los dominios de las proteínas con las moléculas de agua y los grupos químicos determina la

Introducción

conformación de las moléculas adsorbidas. Cuanto mayor es la cantidad de grupos hidroxilo sobre la superficie, mayor es el carácter hidrófilo de la misma y menor adsorción de fibrinógeno y fibronectina se produce. En superficies con un bajo contenido en grupos hidroxilo (-OH), se produce una conformación proteica adecuada que soporta el posterior anclaje celular, y la célula es capaz de eliminar la capa de proteínas preadsorbidas y secretar nuevas proteínas a la MEC a través de las cuales adherirse a la superficie. La adhesión podría producirse incluso sin eliminar dicha capa de proteínas preadsorbidas siempre que haya pocos grupos hidroxilo en la superficie; sin embargo, en las superficies con elevada densidad de grupos -OH, no se produce una buena conformación proteica y por lo tanto el biomaterial no es un buen soporte para las células, que no desempeñan adecuadamente su función y ven comprometida su viabilidad.²⁴

Las propiedades mecánicas también influyen en la interacción de la célula con un material. El comportamiento celular está determinado por la rigidez de la MEC y la del sustrato sobre el que estén cultivadas. Dependiendo de la composición de la MEC en los distintos tejidos, ésta presenta diferentes grados de rigidez. Tanto la rigidez como la nanotopografía proteica de la MEC definen el fenotipo y la función celular. Esta interacción es bidireccional se transmiten fuerzas de tensión desde el interior celular a la MEC y viceversa.^{24,66}

La detección de la rigidez de superficie es dependiente del tipo de célula. Los fibroblastos concretamente responden a la mayor rigidez de la superficie donde estén cultivadas, desplazándose sobre una superficie hacia zonas de mayor módulo de elasticidad, fenómeno llamado durotaxis. Diversos autores han observado que al sembrar fibroblastos en sustratos con rigidez creciente se produce mayor proliferación y esparcimiento celular con mayor formación de fibras de estrés y síntesis de colágeno en los sustratos de mayor rigidez, lo cual está relacionado con mayor adhesión debido a un mayor número de adhesiones focales sobre la superficie.⁶⁶ En superficies de mayor rigidez se produce una acumulación de células porque éstas son más eficientes al moverse hacia este tipo de superficies. Por otro lado, en superficies muy rígidas no se produce la acumulación celular porque no todas las células consiguen llegar hasta allí ya que se reduce la velocidad de migración; esto es debido a que ven su movilidad reducida en este tipo de sustratos al no poder controlar el citoesqueleto a través de la matriz extracelular por no poder desanclar las adhesiones focales ni poder generar otras nuevas sobre las que avanzar.⁶⁷⁻⁷⁰

La rigidez óptima de un biomaterial debería adaptarse a las necesidades de tejido en el que se implante y la función que deberá proporcionar.

La topografía y la rugosidad son otros dos factores que influyen sobre la adhesión celular a una superficie. La topografía habitual de un biomaterial está caracterizada por la presencia de valles y picos, que pueden analizarse con un estudio de perfilometría en 2D o 3D y que es necesario adaptar para cada tipo de célula. Las

células pueden percibir variaciones de pocos nanómetros en la topografía de una superficie y responder a ella.

La creación de topografías a nivel micrométrico y nanométrico induce cambios en la forma celular, patrón de adhesión, la orientación celular y en su forma de esparcirse en el sustrato, pero todo ello dependerá también de la forma y el tamaño de las características topográficas, de la composición química de la superficie y del tipo de célula.¹¹ Patrones como los microsuros y las microvellosidades promueven la adhesión celular, y guían la formación de adhesiones focales y la dirección del movimiento celular.⁷¹

Las células que se siembran en superficies lisas presentan una MEC más organizada con una distribución homogénea de las adhesiones focales en los bordes de la célula que es donde tiene lugar el anclaje con un material. La creación de patrones en surcos en una superficie dirige la orientación de las células a lo largo de microsuros en lo que se conoce como la contacto celular guiado.⁴⁷ La topografía a nivel nanométrico y micrométrico influye en el patrón de adsorción proteica; sin embargo, no parece que exista una tendencia en la cantidad de proteínas adsorbidas en superficies con una topografía definida ni siquiera para un único tipo de proteínas.⁶⁵

La humectabilidad de superficie es uno de los factores que más afecta a la respuesta celular a un biomaterial. El ángulo de contacto que forma un líquido sobre una superficie sólida (representado con el símbolo θ_w) define la humectabilidad de la misma. Tradicionalmente el ángulo de 90° se ha establecido como umbral para definir si una superficie es hidrófoba (mayor de 90°) o hidrófila (menor de 90°) (figura 8).⁷²

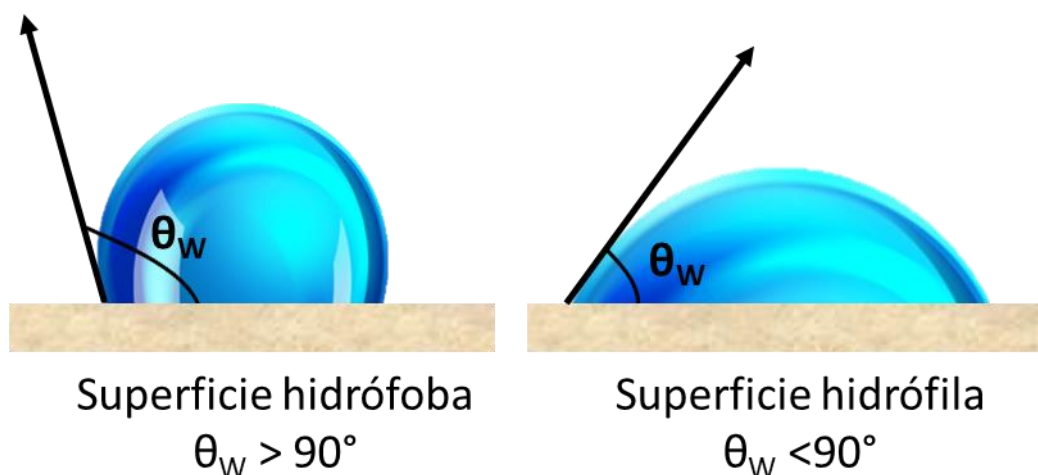


Figura 8. Superficie hidrófoba e hidrófila.

Introducción

El primer paso para evaluar la humectabilidad de un material es medir el grado de esparcimiento de una gota depositada en su superficie. A menor ángulo de contacto (AC) entre la superficie y el líquido, mayor esparcimiento de la gota sobre la superficie, mayor mojabilidad y por lo tanto mayor hidrofiliidad de superficie. Sucede al contrario para las superficies hidrófobas.^{73,74}

Cuando un líquido se pone en contacto con una superficie sólida, es necesario que se produzca energía o tensión superficial necesaria para conseguir la reorganización de átomos y moléculas del líquido sobre dicha superficie. Se basa en la suma de fuerzas de interacción entre las moléculas de un sólido y un líquido, valorando el grado de atracción de uno por el otro. La tensión superficial está compuesta por componentes polar y dispersiva, las cuales determinan el tipo de interacción con la superficie bien sea a nivel de distribución y fluctuación de cargas (componente dispersiva o apolar) o a nivel de dipolos (componente polar). Para realizar dicha medición es necesario emplear dos líquidos: uno polar y uno dispersivo, cuyos valores de tensión superficial sean conocidos. El cálculo se realiza midiendo el ángulo que forma una gota de cada líquido con la superficie estudiada.⁷⁵ Calculando la proporción entre la componente polar y dispersiva de la tensión superficial entre dos superficies se puede evaluar el grado de adhesión entre ellas. Es necesario que la energía superficial del sólido sea superior a la tensión superficial del líquido para que haya buena adhesión entre ambos.^{76,77}

Las superficies hidrofílicas son aquellas que tienen polaridad, donde las moléculas de la superficie o sus grupos químicos tiene un dipolo eléctrico o momento multipolar.⁷² El agua es un solvente polar y no interactúa con las superficies no polares. Cuando entra en contacto con superficies hidrófobas se une con otras moléculas de agua a través de uniones de hidrógeno.³¹ Cuanto mayor sea el carácter apolar o dispersivo de una superficie, más difícil es la adhesión de un líquido, una molécula o una proteína sobre su superficie por el atrapamiento de burbujas de aire. De modo contrario sucede con un mayor carácter polar de una superficie (figura 9).⁷⁸ Cuanto más cercanas sean las proporciones entre las componentes, mayor será la adhesión.⁷⁹

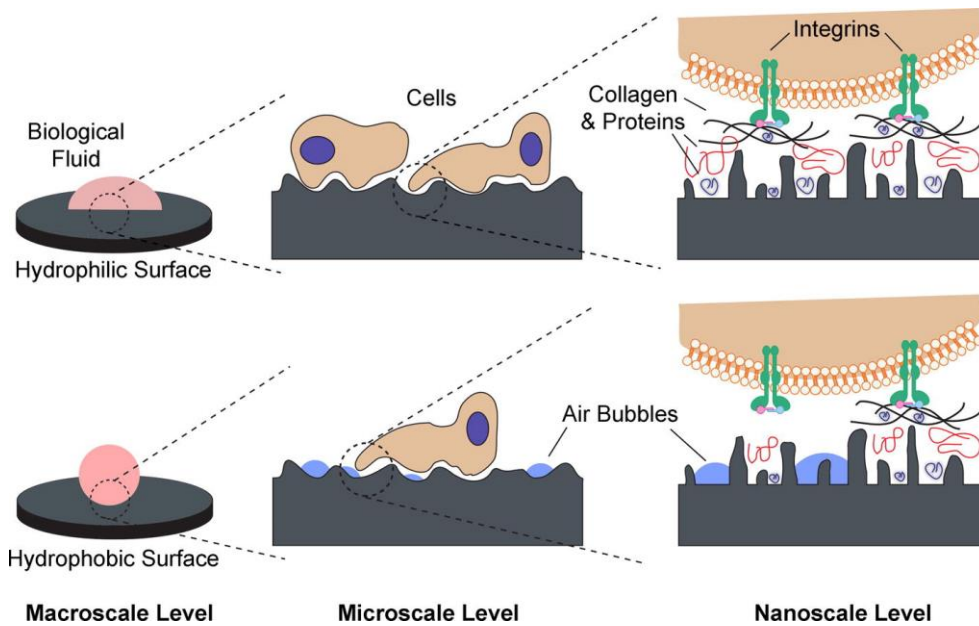


Figura 9. Imagen superior: adsorción proteica y adhesión celular en superficie hidrófila, imagen inferior: formación de burbujas de aire en una superficie hidrófoba que dificulta la interacción con la misma.⁸⁰

La energía libre de superficie de un sólido, medida indirectamente por el ángulo de contacto líquido-sólido, está relacionada con la humectabilidad.⁸⁰ Cuanto mayor sea la humectabilidad de un sólido, mayor es la energía de superficie y mejores son las propiedades de adhesión con el líquido, si éste contiene grupos polares funcionales como por ejemplo la sangre o un medio de cultivo.⁷⁸ De la misma forma, cuanto menor sea el ángulo de contacto, mayor hidrofiliidad presentará la superficie.

Cuando una superficie hidrofílica se pone en contacto con agua, los grupos funcionales hidroxilo y oxígeno son los de capa más externa y esta capa mejora la interacción con los iones y biomoléculas de los fluidos tisulares.⁵⁷ En el caso de la inserción de un aditamento implantológico, interesa que la superficie sea hidrófila y que mejore la vascularización en la zona ya que, tras la colocación de un implante, el nivel de vascularización de los tejidos periimplantarios en la zona de conexión del aditamento es muy pobre.⁵⁹

Existen diversos estudios que han evaluado el comportamiento celular en materiales cerámicos a través de la cuantificación del nivel de proteínas adsorbidas como la fibronectina, integrinas, laminina, fibronectina, quinasa (FAK) o colágeno tipo I y III, entre otras.^{32,47,81} Estas proteínas, como la albúmina, están presentes de forma habitual en sangre, saliva o en el suero del medio de cultivo. Pueden estar implicadas en la formación del coágulo sanguíneo durante la cicatrización de las heridas – como el fibrinógeno – o bien implicadas en el anclaje celular, como la fibronectina, la integrina o la vinculina.^{5,82,83}

Introducción

Se ha observado que la humectabilidad y la carga eléctrica de superficie son dos de las principales propiedades que podrían dirigir la adsorción de las proteínas desde la sangre e influir en la retención de la fibrina durante las fases iniciales de la reparación lo cual es determinante para el sellado de los tejidos blandos alrededor del material.^{31,84} Las superficies hidrófilas que presentan grupos funcionales con carga positiva son las que más favorecen el anclaje celular.⁸⁵

Las proteínas generalmente tienden a adsorberse en superficies hidrófobas⁶⁰ y la posterior adhesión celular dependerá del carácter hidrófilo o hidrófobo de la superficie. Diversos autores han observado que se produce una mayor adsorción de proteínas adhesivas en superficies hidrófilas con elevada energía de superficie; por otro lado, las proteínas no adhesivas presentes en el suero fetal bovino (como por ejemplo la albúmina), se adsorben preferentemente en superficies hidrófobas con baja SFE y no presentan zonas de reconocimiento de las células, evitando el anclaje de las mismas.^{60,82,86,87}

En superficies con un marcado carácter hidrófilo ($\theta_w < 10^\circ$) se crea una unión mucho más fuerte entre la superficie y las moléculas de agua que se forman al inicio y que luego impide que éstas sean desplazadas por proteínas. En superficies hidrófobas el desplazamiento de moléculas de agua no supone una barrera energética sustancial, de forma que las proteínas puedan adsorberse a la superficie, siendo normalmente las proteínas no adhesivas como la albumina las que primero se adhieren ya que son las que presentan menor peso molecular.^{31,34} En superficies con un marcado carácter hidrófobo ($\theta_w > 150^\circ$), debido a la alta afinidad de las proteínas no adhesivas, éstas no son fáciles de desplazar por las proteínas adhesivas de la MEC, pudiendo darse la desnaturalización de las proteínas adhesivas por falta de adsorción sobre la superficie y la consecuente falta de adhesión celular.^{65,82,88,89}

En el caso de los fibroblastos gingivales, se ha observado que consiguen su anclaje a través de la adhesión a una superficie moderadamente hidrofílica ($60^\circ > \theta_w > 80^\circ$) que permita un equilibrio en el que se puedan adherir tanto las moléculas de agua como posteriormente las proteínas y finalmente los fibroblastos.⁹⁰

Además, la humectabilidad modula la estructura, la composición y la densidad inicial de las adhesiones focales. La densidad es proporcional a la cantidad de fibronectina adsorbida en la superficie. A su vez, esta adsorción determinará la adhesión y el esparcimiento celular.²⁴ Como se comentaba anteriormente, las proteínas en general –y por ello también la fibronectina– tienen mayor tendencia a la adsorción sobre superficies hidrófobas, pero a baja densidad.^{91,92} Sin embargo, en este tipo de superficies la capacidad de los fibroblastos de secretar proteínas de la MEC se ve muy disminuida.⁹³ Por otro lado, en superficies hidrófilas la MEC de los fibroblastos reestructura la fibronectina, hecho que casi no ocurre en superficies hidrófobas. Esto da a entender que, a pesar de que la fibronectina está adsorbida más débilmente en superficies hidrófilas, proporciona mejor sustrato para el crecimiento

celular debido a que la célula necesita eliminar y reestructurar la fibronectina adsorbida para realizar sus funciones de forma normal.²⁴

La modificación de una superficie afecta a la humectabilidad y al área de contacto de un líquido con la superficie del material; sin embargo, no afecta a las propiedades del material ni a la composición química del mismo. Tratamientos de superficie como el arenado, grabado ácido o anodizado reducen la mojabilidad de superficie debido a la topografía que se crea. Por otro lado, tratamientos como la radiación UV o la electrohumectación consiguen reducir drásticamente el ángulo de contacto de una superficie, aplicando rayos UV-C o un campo eléctrico respectivamente.^{80,94}

2.2 BIOCOMPATIBILIDAD

La biocompatibilidad de un material se define como la capacidad de desempeñar la función para la que ha sido diseñado, generando la mejor respuesta celular o tisular posible, y al mismo tiempo que no desencadene ningún tipo de reacción local o sistémica con los tejidos que lo rodean.⁹⁵ Desde un punto de vista biológico, se trata de la aceptación de un biomaterial sintético e inerte por parte de un huésped que es un ser vivo ya sea un animal mamífero o un ser humano.

Las condiciones necesarias que debe tener un biomaterial son las siguientes: debe ser bioquímicamente compatible, no tóxico, no irritativo, no alergénico y no carcinogénico; además debe ser biomecánicamente compatible con los tejidos circundantes estableciéndose entre ambos un contacto bioadhesivo.⁹⁶

En función de la biocompatibilidad del material y de la respuesta del huésped, los biomateriales se pueden clasificar en tres categorías:

Bioinertes y biotolerantes, que son aquéllos que generan poca o ninguna respuesta en el huésped y presentan un bajo nivel de reactividad, como por ejemplo la alúmina.

En segundo lugar, se encuentran los materiales bioactivos, capaces de anclarse directamente a los tejidos y formar uniones químicas y biológicas durante la fase temprana de implantación, un ejemplo de ello son los biovidrios o los fosfatos cálcicos.

Por último, los materiales bioreabsorbibles son aquéllos que sufren una degradación progresiva al mismo tiempo que son reemplazados por nuevos tejidos nativos, ejemplo de ello son el cemento óseo o el fosfato tricálcico.^{8,96}

La biocompatibilidad de un material dependerá del lugar de implantación. La forma de evaluar las propiedades de biocompatibilidad de un material es a través de ensayos *in vitro* e *in vivo* ya sea en animales o en estudios clínicos. Todos ellos se rigen de acuerdo con la norma ISO-10993.⁹⁷

En los ensayos *in vitro* se evalúa la interacción célula-superficie del material, o lo que es lo mismo, la citocompatibilidad. Habitualmente se basan en cultivos celulares, ensayos de citotoxicidad o antimicrobianos. Los ensayos de citotoxicidad se basan en la medición de la actividad mitocondrial de las células viables. Además, también puede medirse la producción proteica por parte de las células al estar en contacto con el material, generalmente a través de ensayos PCR o ELISA. En todos estos ensayos es habitual emplear un material de referencia o material control en el que tanto las respuestas celulares como la del material sean conocidas, reproducibles y cuantificables. Una vez que se evalúan los materiales de estudio y se conoce la respuesta celular y la del material, se debe determinar si se acepta o se rechaza el uso de dicho material para la aplicación estudiada.⁹⁸

2.3 BIOMATERIALES

La definición actual de biomaterial es la propuesta por la *European Society for Biomaterials* en 1986: “un material, de origen natural o artificial, que pretende sustituir o reemplazar todo o una parte de un órgano deficiente”.⁹⁹ En ella, queda implícito que el biomaterial ha de tener la capacidad de interactuar con los tejidos que lo rodean sin causar reacciones adversas como una reacción inflamatoria, reacción a cuerpo extraño o formación de una capsula fibrosa alrededor del material.¹⁰⁰

En la Unión Europea los primeros biomateriales comenzaron a utilizarse en la década de los 70. Desde su implantación, mucho se ha evolucionado, siendo también biomateriales aquellos recubrimientos empleados para mejorar la respuesta del huésped a nivel de adsorción proteica o anclaje celular. Los más recientes son los nanomateriales que no sólo se emplean como recubrimiento sino también como nanopartículas terapéuticas (combinan terapia y diagnóstico) principalmente en el campo oncológico y de la medicina nuclear.¹⁰¹

Para el desarrollo de biomateriales, es necesario la unión de diferentes disciplinas como la medicina, la química, la física o la ingeniería. Los principales grupos de materiales a partir de los cuales se fabrican los biomateriales son tres: metales, cerámicas y polímeros. En un primer momento los materiales más empleados fueron los metales, como el titanio o aleaciones de cobalto, cromo o acero inoxidable. Sin embargo, hoy en día los polímeros son el material más empleado, seguido de los metales y las cerámicas.¹⁰² Otros grupos son los composites y los biomateriales naturales (proteínas y polisacáridos). Los composites surgen de la necesidad de combinar las mejores propiedades de al menos dos de estos tres materiales primarios mencionados y que estas propiedades sean superiores a las de los dos materiales por separado en lo que se refiere a módulo de elasticidad, dureza y resistencia.¹⁰³

Las biocerámicas son uno de los principales materiales destinados a la prostodoncia debido a su biocompatibilidad y propiedades estéticas. El desarrollo de nuevas tecnologías busca mejorar las propiedades mecánicas de las mismas, así como

crear nuevas biocerámicas. A pesar de que son materiales empleados en la clínica diaria desde hace muchos años y generalmente son inertes en mayor o menor grado, es importante analizar la biocompatibilidad de las nuevas cerámicas ya sean de nueva composición o cerámicas híbridas por la unión de varios tipos de materiales ya que esto puede afectar a su carácter inerte.⁹⁶

Los biomateriales se emplean como dispositivos médicos, los cuales se clasifican de acuerdo con el riesgo que pueden conllevar su uso o implantación. Cuanto mayor es el riesgo, mayor es el escrutinio que se ha de aplicar antes de su salida al mercado, lo cual se denomina valoración de conformidad. Todo ello le compete a la Unión Europea, la cual establecerá un nuevo Reglamento de regulación de Dispositivos Médicos 2017/745 (MDR) y de dispositivos empleados *in vitro* 2017/746 (IVDR) en el año 2020 que viene a sustituir a los reglamentos anteriores 93/42/EEC (MDR) de 1993 y 98/79/EC (IVDR) de 1998 utilizados hasta la fecha.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶

La clasificación sobre el riesgo en los productos dentales se extrae de la realizada por la Directiva 93/42/EEC todavía vigente y que se ha resumido y adaptado en la Tabla 1.¹⁰⁵

Clase ¹	Riesgo	Ejemplos
I	Producto no invasivo, bajo nivel de riesgo	Prótesis removible provisional, prótesis fija provisional de resina.
Productos invasivos		
IIa	Riesgo moderado	Coronas metal-cerámica, de resina, totalmente cerámica.
IIb	Riesgo moderado	Implante dental, aditamento dental.
III	Elevado potencial de riesgo	Injerto óseo.

Tabla 1. Clasificación de dispositivos adaptado a materiales de rehabilitación oral.

Algunos de estos materiales, como los destinados a fabricar implantes dentales, van destinados a ser empleados como dispositivos médicos implantables que, de acuerdo con la norma ISO 13485:2016, se trata de “dispositivos médicos que únicamente pueden ser retirados mediante una intervención quirúrgica, estando éstos total o parcialmente introducidos en el cuerpo humano durante al menos 30 días o de forma permanente tras la intervención”.¹⁰⁷

¹Existe una cuarta clase de dispositivos médicos, llamados dispositivos médicos implantables activos (como por ejemplo un marcapasos o un desfibrilador). No son aplicables al ámbito odontológico.

Se está implementando el uso de materiales CAD/CAM (*Computer Aided Design/Computer Aided Manufacturing*) como material de aditamento implantológico en su colocación al mismo tiempo que la inserción quirúrgica de un implante o posteriormente en la llamada segunda fase quirúrgica o bien como pilar definitivo de una rehabilitación sobre implantes. En los dos primeros casos, el aditamento queda expuesto al medio oral, pero al mismo tiempo en contacto con sangre y tejidos blandos, los cuales se reorganizan a su alrededor. Si bien según la clasificación de dispositivos médicos, el término “aditamento dental” sólo se refiere al pilar protésico definitivo y no al pilar de cicatrización que se coloca de forma provisional. Al estar insertado en la encía conectando el implante con la corona protésica, se le considera material implantable tipo IIb al igual que un implante dental.¹⁰⁴

2.3.1 Metales: titanio y aleaciones

Como se comentó anteriormente, los metales y sus aleaciones fueron los primeros materiales empleados como biomateriales, debido a su elevada ductilidad y resistencia a la flexión y al desgaste. En el ámbito odontológico, la confección de restauraciones metal-cerámica se comenzó a emplear a partir del año 1962 en el que Weinstein y cols. resolvieron el problema de diferente coeficiente de expansión térmica entre la cerámica de recubrimiento y la estructura metálica,¹⁰⁸ lo cual supuso un gran avance dado que a día de hoy las restauraciones realizadas en clínica siguen también esta configuración.¹⁰⁹

Los metales más empleados en odontología son el oro, cromo, cobalto, titanio y platino. Las principales aleaciones son las de titanio, cromo-cobalto y cromo-níquel, estando esta última en desuso debido a la reacción alérgica que puede desencadenar el níquel. Las más empleadas para la confección de restauraciones metal-cerámica son las de cromo-cobalto, ya que poseen buena resistencia al desgaste y a la fatiga, por lo que se usan como material de las estructuras base de las prótesis fijas y removibles sobre las que incorporar resina o cerámica.

Hoy en día con la introducción de la tecnología CAD-CAM, es posible obtener estructuras enteras a partir del fresado de discos y bloques de titanio grado II o aleaciones cromo-cobalto. Sin embargo, a pesar de que las restauraciones metal-cerámica han sido el *gold estándar* en las últimas décadas, la falta de estética por la opacidad del metal subyacente y el deslaminado de las cerámicas de recubrimiento fueron dos factores determinantes a la hora de comenzar a emplear únicamente materiales cerámicos.

Por otro lado, el titanio continúa siendo el principal material destinado a la fabricación de implantes dentales. El titanio puro (CpTi) se presenta en cuatro grados en función de su contenido en oxígeno en orden creciente. Los porcentajes oscilan entre 0,18% para el grado I hasta 0,40% para el grado IV. Las propiedades mecánicas también siguen un orden creciente, siendo el grado IV el de menor ductilidad y mayor tenacidad, siendo el más empleado para la fabricación de implantes dentales. Generalmente los implantes están compuestos de titanio puro tipo IV o tipo V en aleación con otros elementos metálicos como el aluminio, vanadio, cromo, cobalto o níquel para hacer aleaciones tipo V (Ti-₆Al-₄V).¹¹⁰

Cuando la superficie de estas aleaciones entra en contacto con moléculas de oxígeno, se forma espontáneamente la denominada capa pasiva que es una película estable de óxido de titanio sobre la superficie. Se trata de una forma de resistencia a la corrosión, siendo una de las propiedades del titanio y sus aleaciones. Además, presenta una buena biocompatibilidad, resistencia a la fatiga y bajo módulo de elasticidad si se compara con las aleaciones de cromo-cobalto. Por otro lado, tiene poca resistencia al desgaste.¹⁰²

2.3.2 Biocerámicas

Las cerámicas son biomateriales inertes e inorgánicos, sintetizados por tratamiento térmico y posterior enfriamiento.¹¹¹ A pesar de ser inertes, generan una respuesta en los tejidos de su alrededor a través de uniones iónicas y/o covalentes. Las que presentan uniones covalentes son aquellas con estructuras cuya base es la unión de átomos de carbón (no oxídicas) y los iónicos son propios principalmente de las cerámicas oxídicas como la alúmina, la circonia o el sílice.¹⁰²

Generalmente todas presentan propiedades mecánicas adecuadas ya que son materiales rígidos con elevado módulo de elasticidad, tienen mayor resistencia a la compresión, tensión y al desgaste que los metales, pero son frágiles porque se fracturan sin sufrir deformación plástica. Presentan diferentes grados de humectabilidad que permiten la adsorción proteica y la posterior adhesión celular.¹¹² Son materiales muy biocompatibles con elevada resistencia a la corrosión. La ventaja de las cerámicas oxídicas es que no están sujetas a ninguna reacción oxidativa y esto implica que se reduce considerablemente la liberación de iones citotóxicos por corrosión del material y por lo tanto proporcionan una seguridad biológica elevada.¹¹³

Introducción

Cuando comenzaron a desarrollarse las biocerámicas en los años 60, la prioridad era que el material implantado fuera lo menos reactivo posible y en esa época surgieron la alúmina Al_2O_3 y el óxido de circonio o circonia ZrO_2 . El objetivo en ese momento era conseguir una respuesta bioactiva con los tejidos y surgieron las cerámicas vítreas. En el ámbito odontológico las cerámicas se comenzaron a usar en 1770 sustituyendo a otros materiales anteriormente empleados como marfil o madera. Mucho se ha evolucionado desde aquel momento hasta ahora ya que el objetivo actual es obtener el máximo conocimiento acerca de las interacciones a nivel molecular y proteico con la superficie del material a través de la unión de los conocimientos en ingeniería y biotecnología para así poder dirigir la innovación tecnológica en este sentido.¹¹²

Las cerámicas tradicionales de silicato básicamente están constituidas por una fase vítrea y una fase cristalina. La fase vítrea es óxido de silicio en estado amorfo y es la que presenta irregularidades y confiere las propiedades estéticas y de translucidez a la cerámica. Por otro lado, la fase cristalina es organizada y otorga las propiedades mecánicas a las cerámicas, cuanto mayor es el contenido en cristales, mayores son las propiedades mecánicas.¹⁰² Hoy en día existen muchos tipos de cerámicas en el mercado en distintas formas de presentación y es todavía más importante conocer las propiedades mecánicas y estéticas que nos ofrecen para saber cuál es su indicación clínica.

2.3.2.1 Clasificación de las biocerámicas

Kelly y cols. realizaron en 2011 una clasificación de las cerámicas en función de su contenido en fase vítrea: las vitrocerámicas (con una matriz vítrea que contiene algunos cristales); las cerámicas infiltradas con una matriz cristalina y por último las cerámicas policristalinas las cuales están formadas únicamente por cristales. Cuanto menor es el contenido en fase vítrea, peores son las propiedades estéticas de la cerámica por la menor translucidez.¹¹⁴ Recientemente, Gracis y cols. han propuesto una nueva clasificación en base a su microestructura (figura 10).

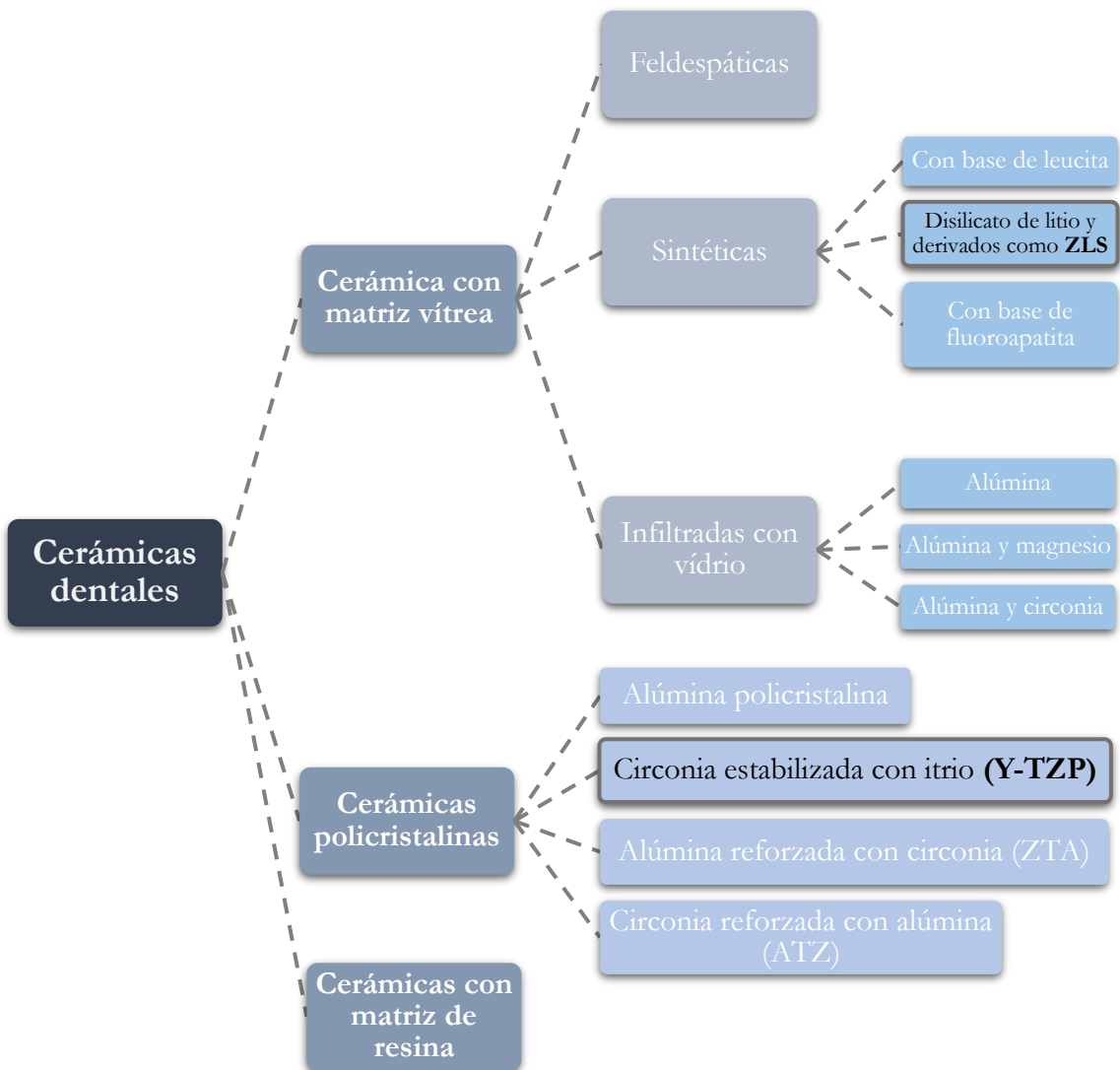


Figura 10. Adaptación de la nueva clasificación de cerámicas dentales propuesta por Gracis y cols.¹¹⁵

Introducción

Esta nueva clasificación se basa en la fase o fases presentes en la composición química de las cerámicas y deja atrás la dificultad de saber el contenido en fase vítrea de una cerámica. De acuerdo con Gracis y cols. existen tres grupos principales de cerámicas: las cerámicas con matriz vítrea, las cerámicas policristalinas y las cerámicas de matriz de resina.

Las cerámicas con matriz vítrea son aquellas cerámicas inorgánicas y no metálicas que contienen una fase vítrea. A su vez estas cerámicas se dividen en tres subgrupos: feldespáticas, sintéticas e infiltradas con vidrio.

Las cerámicas feldespáticas son de origen natural—feldespato, caolín y cuarzo—pero no son las más usadas ya que son monocromáticas, es necesario maquillar su superficie para mejorar la estética, son frágiles, presentan una menor resistencia mecánica debido a su bajo contenido en fase cristalina (20%).^{102,116} Progresivamente están siendo sustituidas por cerámicas de origen sintético como el disilicato de litio y sus derivados.^{115,117} Con estas cerámicas sintéticas se pretende depender en menor medida de recursos naturales y por otro lado introducir una fase cristalina que venga a mejorar las propiedades mecánicas de las cerámicas feldespáticas, evitando o reduciendo la propagación de grietas en la estructura.

Los cristales se crean de forma artificial a través de procedimientos basados en la nucleación y cristalización, ambas controladas a medida de las necesidades estéticas y mecánicas requeridas. Las propiedades mecánicas se determinan de acuerdo al número de cristales, su geometría, su tamaño, su distribución homogénea en la estructura y que la expansión y contracción térmica coincidan tanto en la fase cristalina como en la fase vítrea. Además, también va a depender de otros factores externos como hábitos parafuncionales que pueda tener el paciente, posibles variaciones del pH salival o el tipo de dieta, lo cual va a su vez determinará el desgaste de la superficie del material.¹¹⁷

Las cerámicas infiltradas con vidrio varían en función de la composición química de la matriz cristalina: de alúmina, mezcla de alúmina y circonia o bien de espinela ($MgAl_2O_4$)—obtenida de la unión de óxido de magnesio con óxido de aluminio—. Todas ellas presentan una estructura en la que la matriz cristalina supone aproximadamente el 75% del volumen del material. Debido a esto, el contenido en fase vítrea es muy bajo y son difíciles de grabar con ácidos, por lo que generalmente se usan como material de infraestructura, aunque se encuentran en desuso y se han visto reemplazadas por el disilicato de litio o la circonia.

El segundo gran grupo son las cerámicas policristalinas como la alúmina o la circonia, las cuales no contienen fase vítrea. Surgieron a principios de los años 90 junto con el desarrollo de los sistemas CAD-CAM. Este tipo de cerámicas presenta una elevada densidad de cristales dispuestos uniformemente en la estructura e impidiendo o reduciendo la propagación de grietas gracias a su elevada tenacidad y resistencia a la fractura. Por otro lado, son difíciles de grabar con ácido fluorhídrico

por lo que no se recomiendan para restauraciones parciales como por ejemplo las incrustaciones. Su translucidez es limitada.^{115,118}

Un tercer grupo de cerámicas que no estaba incluida en la clasificación de Kelly y cols. son las cerámicas con matriz de resina que están diseñadas específicamente para confección con CAD-CAM. Presentan un elevado relleno cerámico (>80%) con nanopartículas cerámicas embebidas en una matriz resinosa. Presentan un pequeño porcentaje de contenido orgánico (polímero) con el que se busca obtener materiales más fáciles de fresar, de ajustar y de reparar que las cerámicas convencionales, con un módulo de elasticidad similar a la dentina (figura 11)¹¹⁵.

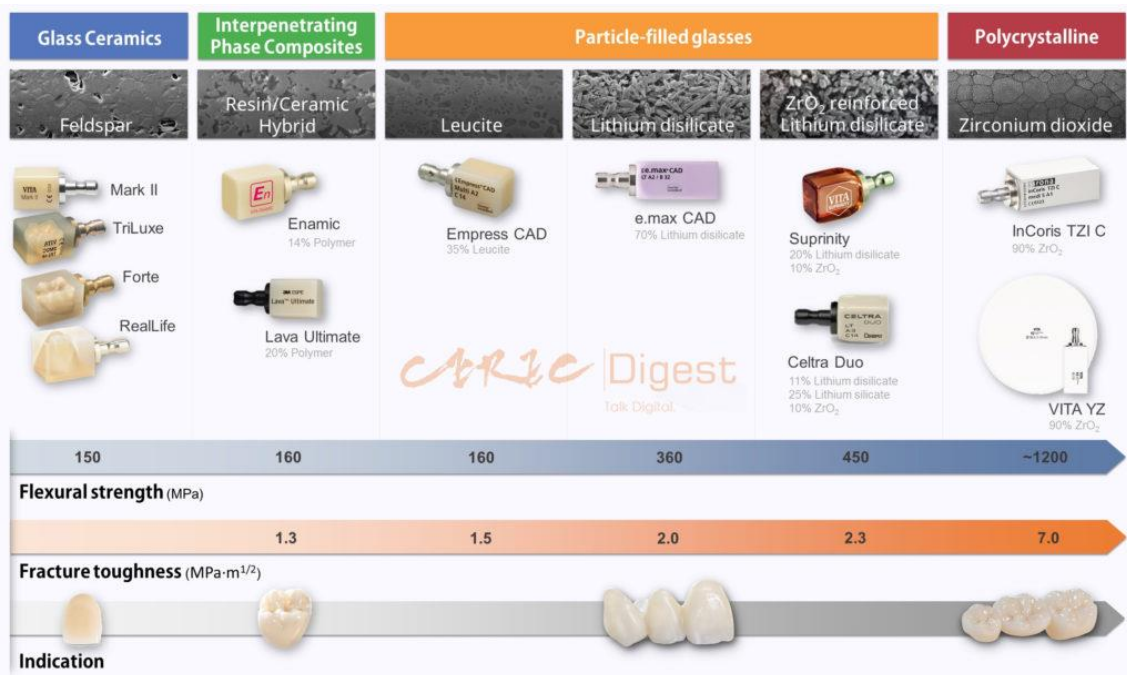


Figura 11. Cerámicas CAD-CAM ordenadas por composición y propiedades mecánicas.¹¹⁹

Las cerámicas también se pueden clasificar en base a su temperatura de sinterización, composición química o sus propiedades mecánicas, entre otras. En la figura 12 se resume las formas de clasificación a partir de las clasificaciones realizadas por otros autores.

Clasificación de las cerámicas

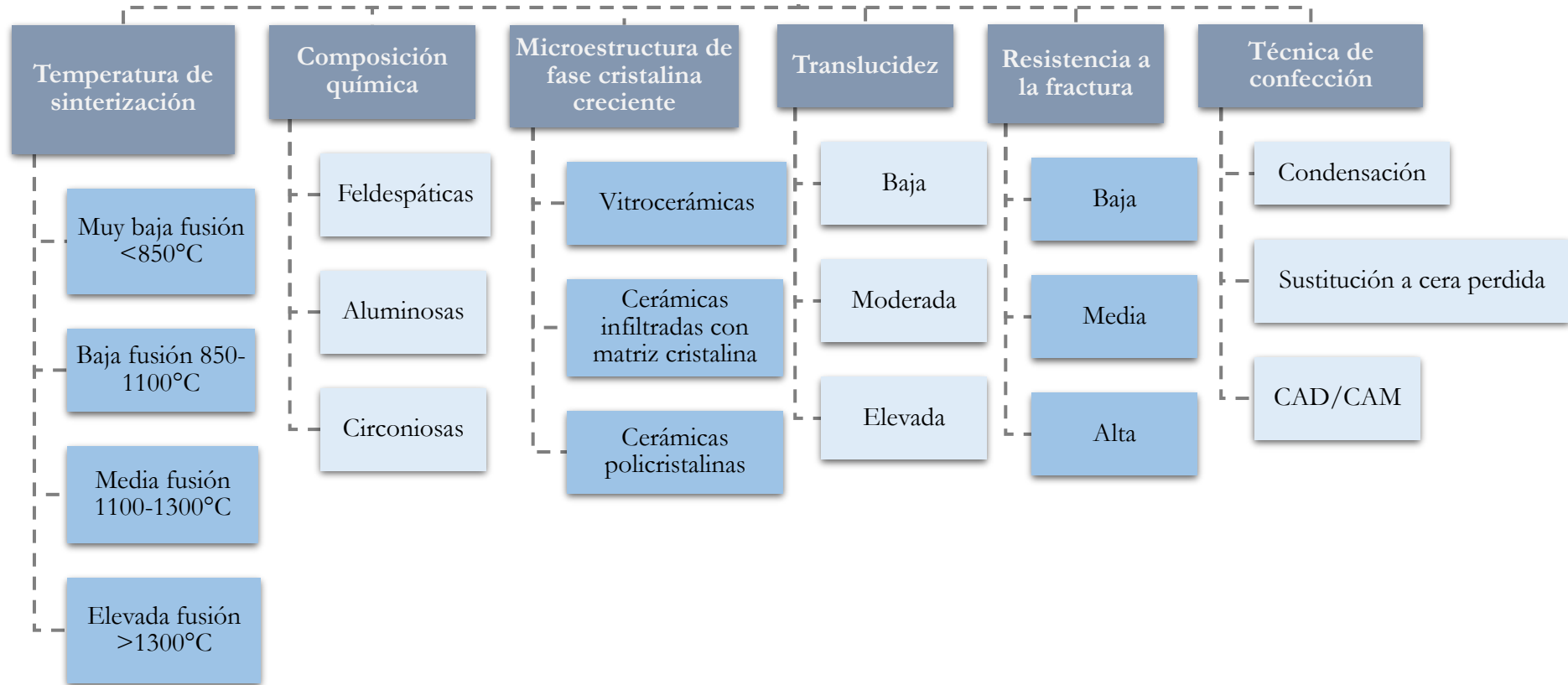


Figura 12. Clasificación de cerámicas dentales.^{114,120-122}

2.3.2.2 Cerámicas con matriz vítrea

Estas cerámicas son resultado de la combinación de una fase vítrea con una fase cristalina—que constituye el núcleo de la estructura—para generar materiales con propiedades mecánicas y estéticas superiores a las cerámicas feldespáticas tradicionales. La obtención de estas cerámicas puede ser a través de la nucleación desde la superficie del vidrio o desde el interior del vidrio, siendo las que se obtienen con este último método las que habitualmente se emplean en odontología. La fase vítrea suele estar compuesta por óxido de silicio (SiO_2), de potasio (K_2O), de fósforo (P_2O_5) o de óxido de aluminio (Al_2O_3) y la fase cristalina está formado por cristales de apatita y leucita. La fase vítrea apenas ve incrementado su volumen durante el sinterizado.¹¹² Tras el sinterizado presentan una resistencia a la flexión de 400-700 MPa, pero al mismo tiempo son moldeables para dar lugar a las restauraciones.

En este grupo de cerámicas el más empleado es el disilicato de litio, del cual deriva el material de estudio de esta tesis: el silicato de litio reforzado con circonia (ZLS).

- Disilicato de litio

El disilicato de litio ($\text{Li}_2\text{Si}_2\text{O}_5$) deriva del mineral silicato cuya estructura se basa en unidades tetraédricas SiO_4^{4-} . El silicato con carga neutra en forma de cristal se denomina sílice (óxido de silicio) el cual existe en tres formas: cuarzo, tridimita y cristobalita.¹²³

Su formación se basa en la cristalización controlada de determinados vidrios gracias a un tratamiento térmico que da lugar a la nucleación y formación de una o varias fases cristalinas dentro de la matriz vítrea.¹²⁴

Se introdujo en el mercado en 1998 en forma de pastillas para inyección con un tamaño de partícula de 3 a 6 μm .¹²⁵ Estaba indicada únicamente para infraestructuras por su elevada opacidad; más tarde en 2006 se lanzó al mercado en forma de bloque para procesado CAD-CAM.¹²⁶

El disilicato de litio pasa por una primera fase en forma de ortosilicato de litio presinterizado (Li_4SiO_4) y a continuación se sinteriza para alcanzar la llamada fase cristalina intermedia o estado azul que está caracterizada por contener un 40% de cristales de metasilicato de litio (Li_2SiO_3) embebidos en la matriz vítrea con un tamaño aproximado de 0,5 μm . El bloque se fresa y se sinteriza a 850°C durante 20-25 minutos para que se forme un 70% de cristales de disilicato de litio ($\text{Li}_2\text{Si}_2\text{O}_5$) con un tamaño de 1,5 μm .^{125,127,128} A pesar del alto contenido cristalino, esta cerámica presenta una translucidez muy elevada, similar a una matriz de vidrio (figura 13).

En cuanto a sus propiedades mecánicas, presenta una resistencia a la flexión de 300-400MPa, más del doble que otras cerámicas vítreas como las de base de leucita.

Introducción

Además, presenta una resistencia a la fractura de 2.8-3.5 MPa m⁻¹ y un módulo de elasticidad de 95 GPa.^{124,129} Cuando ya está totalmente sinterizado presenta una elevada dureza por lo que cuesta mucho de fresar y es por ello que se fresa en fase de metasilicato de litio parcialmente sinterizado y posteriormente se realiza la cocción de la cerámica.¹³⁰

Posee buenas propiedades mecánicas y ópticas, lo que lo convierte en una de las cerámicas más empleadas en odontología. Su elevada resistencia mecánica es gracias a su microestructura entrelazada y la forma de sus cristales, los cuales presentan un tamaño de 2-4 μm que obstaculizan una posible propagación de grietas.¹³¹⁻¹³³ La forma de los cristales va a depender de la cantidad de agentes de nucleación añadidos, la temperatura y el tiempo de cocción.¹³⁴ Aquellos disilicatos que presentan únicamente sílice y óxido de litio presentan una durabilidad limitada y es por ello que se le añaden nanopartículas de alúmina, óxido de circonio u óxido de fósforo (P₂O₅) para mejorar su duración reforzando su estructura. Gracias a la adición de estos agentes de nucleación se produce la cristalización con un volumen controlado y se mejoran las propiedades mecánicas y estéticas.¹³³

El disilicato de litio (LS₂) tiene múltiples indicaciones como la confección de carillas, *onlays*, *inlays*, coronas unitarias o prótesis fija sobre varias piezas anteriores o posteriores ya sea sobre dientes o en restauraciones implantológicas.

Las restauraciones de disilicato de litio tanto de recubrimiento como monolíticas, presentan una tasa de supervivencia elevada a 5 años: ~97% para restauraciones unitarias y ~78% para restauraciones múltiples.¹²⁹⁻¹³⁵



Figura 13. Disilicato de litio en forma de pastillas para inyección con color final de la cerámica (izquierda); disilicato de litio presinterizado en fase azul comercializado en forma de bloque para fresado con CAD-CAM.¹²⁶

- Silicato de litio reforzado con circonia (ZLS)

Recientemente ha salido al mercado un nuevo tipo de cerámica vítrea: las cerámicas de silicato de litio con refuerzo de circonia (ZLS). Estas cerámicas se plantean como una alternativa a las cerámicas de disilicato de litio en casos que requieran mejores propiedades mecánicas y alta demanda estética.¹³⁶ Se trata de una mezcla de una cerámica opaca con otra de alta translucidez.

La fabricación de esta cerámica también pasa por tres fases similares a las del disilicato de litio. La fase cristalina contiene una doble microestructura compuesta de un 25% de cristales muy finos de metasilicato de litio (Li_2SiO_3) y un 11% de disilicato de litio (Li_2SiO_5) con una matriz vítrea que contiene partículas óxido de circonio altamente dispersas en esta matriz.^{137,138} El tamaño de los cristales es de 0,5-0,7 μm , significativamente menor que los encontrados en LS_2 .^{124,139,140}

Estas cerámicas fueron desarrolladas en 2013 a través de la unión de Vita Zahnfabrik y Degudent GmbH en el Instituto Fraunhofer para Investigación en Silicato ISC (*Institute for Silicate Research*) en Alemania, dando lugar a Vita Suprinity® y a Celtra® Duo.^{141,142} Actualmente cada compañía distribuye su versión del material. Estas dos formas comerciales presentan ligeras diferencias a nivel de composición química aportadas por cada fabricante. Vita Suprinity® contiene como aditivo el óxido de potasio y Celtra® Duo contiene óxido de terbio, siendo similar el resto de la composición (figuras 14 y 15).



Figura 14. Fresado de bloques presinterizados VITA Suprinity®.^{143,144}



Figura 15. Fresado de bloque sinterizado Celtra® Duo.¹⁴²

La ventaja que presenta Celtra® Duo (material empleado en este estudio) es que se comercializa en fase final de sinterización, lo cual ofrece la posibilidad de poder hacer el fresado en el color final de la restauración sin necesidad de hacer un segundo sinterizado, a no ser que se prefieran unas mejores propiedades mecánicas. Vita Suprinity® únicamente se comercializa en un estado presinterizado que únicamente contiene metasilicato de litio, lo cual facilita su fresado antes de la sinterización. El tiempo de sinterización es de 1,5 minutos para Celtra® y de ocho minutos para Suprinity®.^{140,145}

La inclusión partículas de óxido de circonio altamente dispersas en la matriz vítrea asegura una elevada resistencia mecánica debido que obstaculiza el crecimiento de finos cristales de disilicato que, junto con el elevado contenido en matriz vítrea, otorga al material buenas propiedades ópticas y mecánicas.^{131,138-140,146,147}

Celtra® Duo posee una resistencia a la fractura de $\sim 2 \text{ MPa m}^{-1}$, módulo de elasticidad de $\sim 70 \text{ GPa}$ y resistencia a la flexión de $\sim 200 \text{ MPa}$. Esta resistencia se puede incrementar a $\sim 370 \text{ MPa}$ tras un segundo sinterizado en clínica o en laboratorio.¹⁴⁸ Diversos estudios han reportado que sus propiedades mecánicas son superiores al disilicato de litio, a las cerámicas feldespáticas o a las híbridas.¹⁴⁹⁻¹⁵¹

Otra ventaja de este material con respecto al disilicato de litio es el ahorro de tiempo tanto en el sinterizado como en el fresado y pulido de los bloques debido al menor tamaño de los cristales en la microestructura.¹³⁶

A pesar de que las cerámicas ZLS se presenten como la nueva generación de materiales creados para mejorar las propiedades mecánicas de las cerámicas de disilicato de litio, esta afirmación genera controversia de acuerdo con los estudios realizados.^{139,140,152} Elsaka y cols. compararon las propiedades mecánicas de LS_2 y ZLS, ambos en forma de bloque para CAD-CAM. Observaron que ZLS mostró mayor resistencia a la fractura, a la flexión y mayor módulo de elasticidad. Los autores lo atribuyen al relleno con óxido de circonio al igual que otros estudios;^{153,154} sin embargo, el disilicato de litio presentó menor dureza que ZLS, los autores lo interpretaron como una ventaja por el menor desgaste del disilicato con dientes antagonistas.¹⁴⁰

Por otro lado, Preis y cols.2017 consideran que debería matizarse que, de acuerdo con un estudio de espectroscopía realizado por Belli y cols., la circonia se presenta disuelta en la fase vítrea en vez de estar presente como partícula reforzante tras el sinterizado ^{147,153,155,156}. Es por ello que, de acuerdo con varios autores, la circonia añadida aporta un escaso mecanismo de refuerzo, ya que presenta valores de resistencia a la fractura similares a otras cerámicas vítreas como el disilicato de litio. ^{155,157,158}

Este tipo de material se ha desarrollado únicamente en formato CAD-CAM para la confección de *inlays*, *onlays*, carillas y coronas unitarias anteriores o posteriores, contraindicado en pacientes con poco espacio protésico disponible y en casos de hábitos parafuncionales como el bruxismo. ^{131,159}

2.3.2.3 Cerámicas policristalinas

- Alúmina policristalina

En la naturaleza, el óxido de aluminio se presenta en forma de minerales corindón o esmeril si presenta impurezas. Los minerales de los que se extrae polvo de alúmina con una pureza superior al 99% son la bauxita y el corindón nativo. ¹⁶⁰

Fue la primera cerámica policristalina en denominarse biomaterial en 1933 pero en el ámbito odontológico no se comercializó hasta los años 60 en Alemania. ¹¹³ La alúmina de aquel momento era muy porosa y por lo tanto muy humectable. Esto suponía la ventaja de una mayor absorción química de una capa de grupos hidroxilo que permitía la unión de moléculas y de proteínas; sin embargo, esta mayor humectabilidad de superficie provocaba su degradación en ambientes húmedos debido a la formación de defectos de superficie por la presencia de moléculas de agua. ¹⁶¹ Con el paso del tiempo su estructura se fue mejorando, disminuyendo los niveles de CaO, NaO y SiO₂ que provocaban la menor resistencia a la fractura. ¹¹³

En la década de los 70 se investigó la alúmina como material de implantes dentales pero debido a su rigidez y poca resistencia a la fractura se reorientó su uso como material de restauración coronal junto con las cerámicas feldespáticas empleando ambas en forma de polvo que contenía un 55% de Al₂O₃. ¹¹³

La alúmina policristalina, que es la que se emplea actualmente, presenta una estructura porosa de grano fino de <4µm compuesta por óxido de aluminio de alta pureza (>99,5%). ¹⁰² Está indicado como material de infraestructura cerámica. Su superficie sigue estando caracterizada por una gran humectabilidad. Presenta una elevada resistencia mecánica y la mayor dureza de todas las biocerámicas oxídicas (17-20GPa) sólo superado por el diamante. El óxido de aluminio es polimorfo pudiéndose presentar en diferentes fases metaestables como la cubica, monoclinica o tetragonal, entre otras. ⁸ Cuando se le aplica un tratamiento térmico de 1050-1200°C, se transforma de forma irreversible a α-alúmina la cual presenta una estructura

Introducción

hexagonal que es la más estable de todas. La unión entre los cationes de aluminio y los aniones de oxígeno le otorgan unas buenas propiedades mecánicas: resistencia a la corrosión y una baja conductividad térmica y eléctrica, pero sin embargo tiene un punto de fusión elevado y una elevada dureza que hace que su maquinabilidad sea compleja. Además, presenta un módulo de elasticidad muy elevado ($\sim 400\text{GPa}$), esto unido al hecho de que es frágil y que presenta una resistencia moderada a la tensión, son los principales inconvenientes en cuanto a su comportamiento mecánico.¹¹²

La biocompatibilidad de la alúmina ha sido evaluada en estudios *in vitro* por contacto directo o indirecto con distintas líneas celulares como los fibroblastos, osteoblastos o macrófagos. Se ha observado que la liberación de alúmina en contacto indirecto por extractos es muy baja mientras que en métodos por contacto directo la liberación depende de la concentración y también de la forma de presentación de la misma (polvo, gránulos, etc.).¹¹³ También se ha evaluado la biocompatibilidad *in vivo* en tejidos blandos y se ha observado que el tejido conectivo que rodea a dichas cerámicas se transforma en una membrana fibrosa con el paso del tiempo.

Debido a los inconvenientes descritos anteriormente en cuanto a propiedades mecánicas y poca biocompatibilidad *in vivo*, esta cerámica ha entrado en desuso.¹¹⁵

- Circonia estabilizada

La circonia—también llamada óxido de circonio—no se encuentra como metal nativo en la naturaleza, sino que se encuentra unido a otros elementos formando minerales, entre ellos el circón que es un mineral de silicato de circonio (ZrSiO_4) y de donde se extrae mayoritariamente la circonia que se consume. También es posible encontrarlo en otros minerales como la baddeleyita. El hafnio posee unas propiedades químicas similares a la circonia, y también forma parte del circón, por lo que es complicado separar ambos elementos, lo cuales forman parte del dióxido de circonio de forma habitual.¹⁶²

Este material puede procesarse para obtenerlo en forma de metal (industria nuclear) o en forma de cerámica. El circonio puro es metálico y es dúctil, se oxida y se corroe muy fácilmente. Por otro lado, la cerámica de óxido de circonio es un material inerte, se presenta en forma de polvo blanco cuya estructura molecular es monoclinica. Es un material duro, rígido, pero con poca resistencia a la fractura; también es resistente al desgaste y a la oxidación y no sufre corrosión química.^{163,164}

Durante muchos años el uso que se le dio al óxido de circonio fue de pigmento blanco ya que es un buen aislante térmico y eléctrico. A finales los años 60 se empezó a utilizar como biomaterial en el campo de la medicina y de la odontología en forma de coronas, implantes, brackets de ortodoncia, postes de endodoncia o aditamentos implantológicos.^{165,166}

Se presenta en tres formas cristalógraficas dependiendo de temperatura de su procesamiento, lo que permite su adaptación para mejorar la fuerza y resistencia del material. La fase monoclinica es la fase más estable y la de menor temperatura, desde temperatura ambiente hasta 1170°C. La fase tetragonal es la empleada habitualmente en odontología, alcanza esta fase cuando se sinteriza a temperaturas entre 1170°C y 2370°C. Por último, cuando se encuentra en fase cúbica, también llamada circonita, es la forma más estable, con las partículas de menor tamaño y se obtiene a una temperatura mínima de 2370°C hasta su punto de fusión a 2715°C con un cambio mínimo de volumen (figura 16).¹⁶⁷

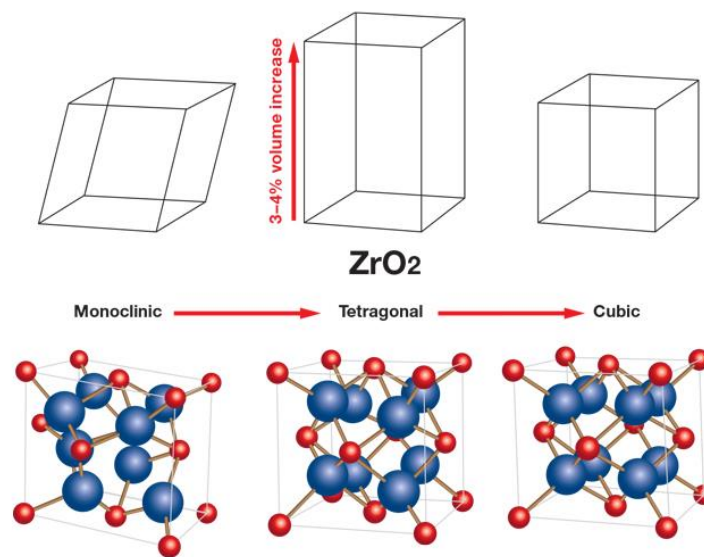


Figura 16. Fases del óxido de circonio de acuerdo con la temperatura.¹⁶⁸

Con el aumento progresivo de la temperatura, se produce contracción del volumen del material. El óxido de circonio puro en fase tetragonal es muy inestable, pudiendo pasar de nuevo a fase monoclinica durante su enfriamiento por debajo de 950°C, lo cual da lugar a un aumento de volumen de aproximadamente el 4,5% y a la formación de grietas en la estructura.^{169,170} Garvie y cols. y posteriormente Gupta y cols. descubrieron que, para prevenir este cambio de fase de tetragonal a monoclinico, es necesario estabilizarla con otros óxidos como el óxido de magnesio (MgO), óxido de calcio (CaO) u óxido de itrio (Y_2O_3).¹⁷¹⁻¹⁷⁴

Introducción

Gracias a la adición de estos óxidos, se estabiliza la fase tetragonal a temperatura ambiente y se activa el mecanismo de refuerzo de la circonia que se llama “endurecimiento por transformación”. Cuando se forma una grieta debido al aumento de volumen, las partículas de circonia que están en cambio fase tetragonal a monoclinica y que poseen un mayor volumen, se orientan en el sentido contrario a la grieta, evitando su propagación (figura 17). A este fenómeno se debe la elevada tenacidad de la circonia.¹⁷²

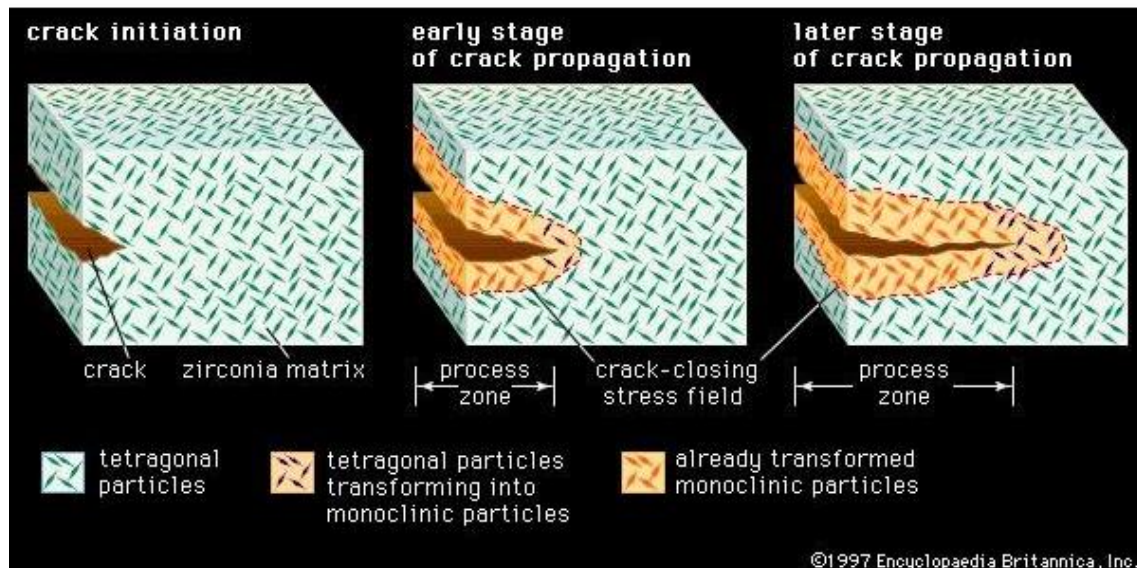


Figura 17. Fenómeno de endurecimiento por transformación de la circonia. Resistencia al avance de la grieta en la que las pequeñas partículas tetragonales se transforman en partículas monoclinicas de mayor tamaño que ejercen una fuerza de cierre de la grieta en la zona de la punta evitando su propagación.¹⁷⁵

La circonia estabilizada se puede clasificar de acuerdo a su microestructura en: circonia totalmente estabilizada (FSZ), circonia parcialmente estabilizada (PSZ) y circonia tetragonal policristalina (TZP). La circonia totalmente estabilizada se encuentra en fase cúbica, la parcialmente estabilizada presenta partículas en fase tetragonal y monoclinica en una matriz cúbica.¹⁷⁶

Cuando el óxido de circonio se estabiliza con itrio se le llama Y-TZP (*Yttria-stabilized Tetragonal Zirconia Polycrystal*) el cual contiene entre un 96-99,8% de óxido de circonio en fase tetragonal metaestable y es el más usado en el ámbito odontológico.¹⁷⁰

Solamente la circonia estabilizada con itrio $ZrO_2-Y_2O_3$ es la que cumple la norma ISO 13356:2008 de utilización de “Implantes quirúrgicos. Materiales cerámicos a base de circonia tetragonal estabilizada con itrio Y-TZP”. Esta norma exige que la fase monoclinica constituya menos del 25% después del envejecimiento inducido por la esterilización de los materiales durante cinco horas a 134°C y a dos bar de presión.¹⁷⁷ Este requerimiento está basado en un estudio de envejecimiento realizado por Chevalier y cols., que argumenta que el envejecimiento de la circonia

obtenido a partir del tratamiento con autoclave durante una hora a 134°C y dos bar de presión da lugar a una transformación de fase tetragonal a fase monoclinica que se corresponde con aproximadamente tres o cuatro años de uso clínico del material.¹⁷⁸

Una concentración de óxido de itrio del 3-6% estabiliza de forma parcial la estructura del óxido de circonio, favoreciendo una menor transformación de fase tetragonal a monoclinica que si se emplea menos de un 2%; porcentajes superiores al 6% mantienen la circonia en fase cúbica estabilizada, no obstante, se evita trabajar con circonia en fase cúbica ya que va en detrimento de la resistencia al desgaste.^{171,179}

El sinterizado de Y-TZP a una temperatura de 1400-1500°C consiste en un 80% de fase tetragonal y un 20% de fase cúbica.¹⁸⁰

La circonia empleada tradicionalmente en odontología contiene un 3% molar de itrio ya que presenta buenas propiedades mecánicas, pero sin embargo es muy opaca. Con el paso del tiempo se fue aumentando el porcentaje de itrio para mejorar la translucidez de la circonia y esto fue acompañado de un aumento de circonia en fase cúbica desde un 25% en el caso de 4Y-PSZ (4 %molar de itrio) hasta un 50% en el caso de 5Y-PSZ (5% molar de itrio) cuya fase principal puede ser cúbica en más de un 50% y es por ello que también se le denomina circonia parcialmente estabilizada. Debido a esta mayor fase cúbica, estas dos últimas cerámicas presentan propiedades mecánicas similares al disilicato de litio (LS₂).^{181,182,183}

El desarrollo de nuevas tecnologías ha permitido que, por ejemplo, al reducir el tamaño de las partículas a un grosor menor de 2 mm, las cerámicas tradicionalmente opacas como la circonia, alcancen tal grado de translucidez que se usen como único material de restauración sin recurrir al recubrimiento con otras cerámicas más estéticas.¹⁸⁴ La mejor forma de estabilizar la circonia en fase tetragonal es mantener el tamaño de las partículas por debajo de los 20 nm independientemente del tipo y concentración del agente estabilizador.¹⁸⁵

El uso del itrio como aditivo estabilizador del óxido de circonio origina otro fenómeno de desgaste llamado degradación a baja temperatura (LTD) cuando el material está en un ambiente húmedo, ya que las moléculas de agua penetran en la superficie de la estructura cristalina provocando una corrosión y el cambio de fase de tetragonal a monoclinica. Este cambio de fase va acompañado de un aumento de volumen estructural y es por ello se producen microgrietas, alteraciones de superficie y pérdida de fuerza (figura 18). Se han investigado otros aditivos como el silicio, el magnesio o la alúmina añadida al itrio para retrasar el efecto degradante del itrio y mantener las propiedades mecánicas.^{102,117,186}

Introducción

Otra opción es el empleo de 8-12% molar de óxido de cerio en sustitución al itrio, pero el inconveniente es el color amarillo de este aditivo, el cual otorga un color amarillo o incluso marrón a la restauración final. Otro factor influyente en la LTD es el tamaño de las partículas del óxido de circonio, el cual debería ser lo más pequeño posible, del orden nanométrico ($<300\text{nm}$) para poder prevenirlo. La temperatura de sinterizado es otro factor que influye en la LTD, una temperatura superior a 1550°C implica la formación de partículas superiores a $0,6\ \mu\text{m}$ y la transformación espontánea a fase monolítica.¹⁸⁷

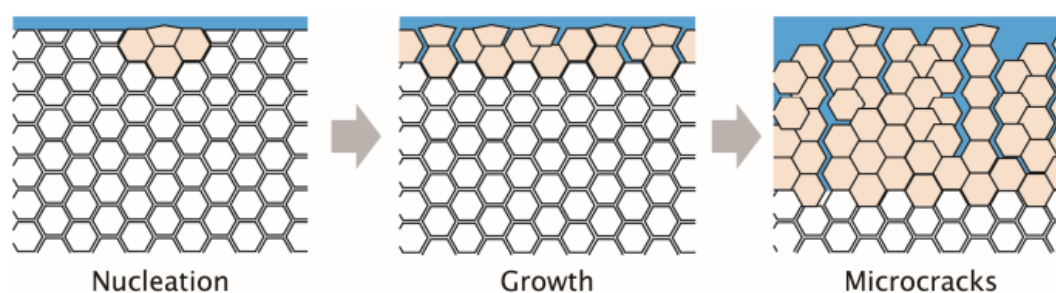


Figura 18. Esquema del proceso LTD. Las moléculas de agua (azul) en contacto con la superficie de circonio, desestabiliza las partículas tetragonales (blancas) para transformarlas en monoclinas (marrón) de mayor volumen y así separarlas conforme va penetrando el agua en el interior de la estructura, dando lugar a la formación de microgrietas.¹⁸⁸

La circonio para confección de restauraciones por tecnología CAD/CAM se comercializa de dos formas: para maquinado de bloques totalmente sinterizados o maquinado de bloques presinterizados para su posterior sinterización (figura 19). El primer método implica una elevada dureza del material que implica la utilización de un equipamiento especial y mayor tiempo de trabajo. Por otro lado, la circonio parcialmente sinterizada presenta una consistencia blanda similar a la tiza, con poros de tamaño de 20-30 nm, lo cual previene la transformación de fase tetragonal a monoclinica inducida por el estrés que se genera durante el fresado de una estructura parcialmente sinterizada como es el caso de las cerámicas en forma de bloques CAD-CAM. Estas cerámicas presentan mayor susceptibilidad a la formación de grietas en su estructura.¹⁷¹ El bloque se comercializa sobredimensionado para compensar la contracción de volumen de aproximadamente un 20-25% que se produce después del sinterizado,^{137,189,190} lo cual conlleva el riesgo de que exista discrepancia dimensional con la restauración que se quiere obtener y con la que se obtendría si el fresado fuese en circonio totalmente sinterizado.¹⁹¹

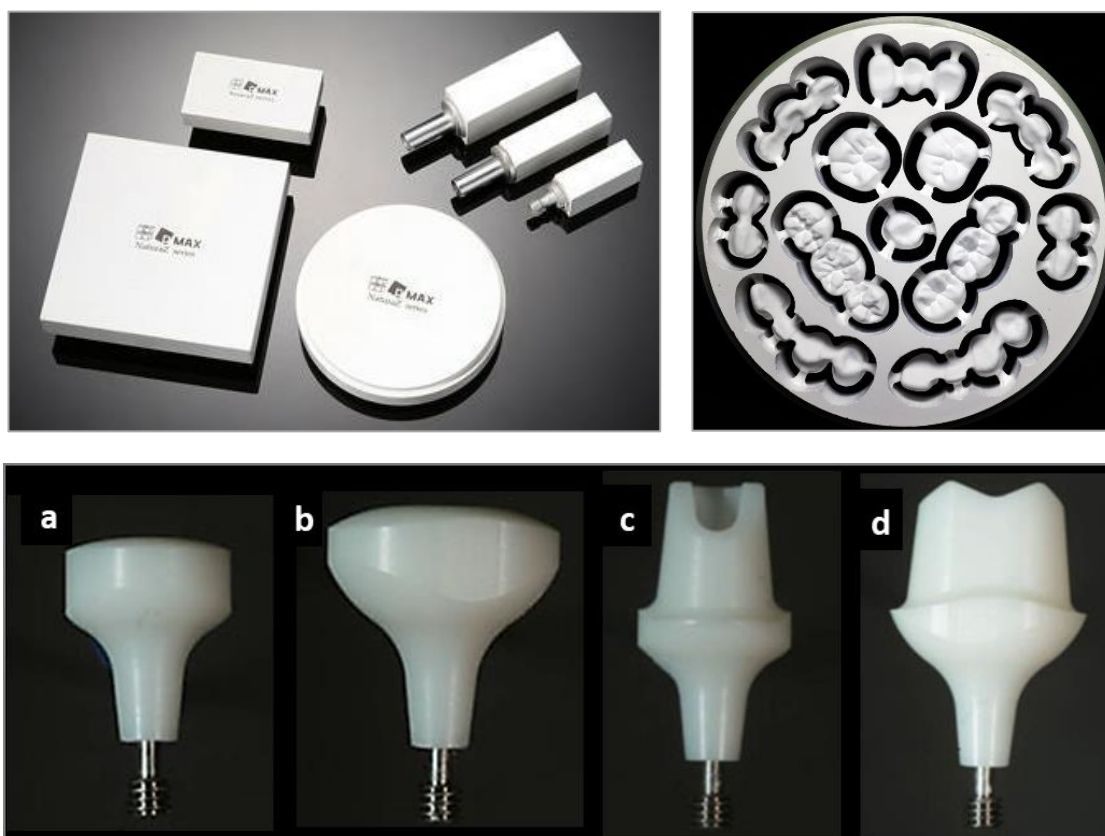


Figura 19. Discos y bloques de circonia para procesado CAD-CAM (izquierda arriba).

Disco presinterizado fresado (derecha arriba). Aditamentos de Y-TZP (abajo): pilares de cicatrización (a, b) y pilares de prótesis sobre implantes (c, d).¹⁹²⁻¹⁹⁴

La circonia es un material que posee excelentes propiedades mecánicas y muy superiores a la alúmina o al disilicato de litio, sin embargo, sus propiedades estéticas no mejoran a las del disilicato de litio debido a su elevada opacidad. Sus propiedades mecánicas dependen en gran medida del tamaño de las partículas de su estructura, que oscila entre 0,2-0,5 μm ya que, a mayor tamaño de partícula, mayor transformación a fase monolítica y peores propiedades mecánicas.¹⁹⁵ Reduciendo el tamaño de partícula se consigue aumentar la dureza y disminuir el módulo de elasticidad de la circonia.⁵⁷ Además, presenta una resistencia a la flexión de 900-1200MPa, resistencia a la fractura de 7-10 MPa $\text{m}^{1/2}$ y módulo de elasticidad de ~ 210 GPa.¹¹¹ Debido a su mecanismo de refuerzo de endurecimiento por transformación, la circonia posee dos veces más resistencia a la flexión que la alúmina o el disilicato de litio. No obstante, debido a su opacidad, hasta ahora se confeccionaban recubrimientos de cerámica sobre las estructuras de circonia, pero esto desencadena el deslaminado de los mismos. Esto es debido a las peores propiedades mecánicas de las cerámicas de recubrimiento, hábitos parafuncionales y estrés térmico residual. Este estrés es debido al diferente coeficiente de expansión térmica entre la cerámica de recubrimiento y la circonia al enfriarse la estructura tras el sinterizado.¹⁹⁶ Es por ello que los esfuerzos han ido orientados al desarrollo de estructuras de circonia monolíticas en forma de bloques y discos de CAD-CAM para la confección de

Introducción

casquillos, coronas sobre dientes y sobre implantes en zonas anteriores y posteriores, así como material de aditamento implantológico como pilar de cicatrización o pilar protésico. La circonia monolítica y sin recubrimiento estaría indicado en los casos de rehabilitaciones en zonas posteriores con menor exigencia estética. Se han realizado estudios *in vitro* del desgaste de piezas antagonistas por parte de restauraciones monolíticas de circonia y se ha observado un menor desgaste que con el disilicato de litio.¹⁹⁷ La tasa de supervivencia a los cinco años para coronas unitarias es superior al 98%.¹⁹⁸

Al ser un material policristalino, es complicado grabar su superficie con ácido por lo que es necesario hacer un tratamiento de la superficie con abrasión con aire que contiene, entre otras, partículas de óxido de aluminio y sílice para conseguir texturizar la superficie y así conseguir realizar el grabado de la misma.¹⁹⁹

Desde hace unos años, la circonia también es un material destinado a la fabricación de implantes dentales generalmente en forma de monobloque sobre todo en casos de pacientes alérgicos al titanio.²⁰⁰ A diferencia de los implantes de titanio, si los de circonia presentan algún defecto en su fabricación como la formación de poros o microfisuras, éstos pueden ser el origen de una posible fractura del cuerpo del implante en caso de que éste se vea sometido a sobrecarga.^{201,202} No obstante, de acuerdo con la literatura revisada, se ha observado mejor organización de los tejidos blandos y de las fibras de colágeno en implantes de circonia al compararlo con titanio y no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas a nivel de torque de remoción entre ambos²⁰³. Tampoco se han observado diferencias significativas a nivel de unión hueso-implante, aunque se recomienda no hacer carga inmediata en este tipo de implantes por la mayor tasa de fracaso observada.²⁰³⁻²⁰⁶ La tasa de supervivencia de implantes de circonia a cinco años es de entre 74-88%. No obstante, los autores remarcan la falta de estudios clínicos aleatorizados a largo plazo y la poca evidencia existente para poder apoyar su uso cotidiano.²⁰⁷⁻²¹⁰

De acuerdo con la literatura publicada, la circonia no presenta ningún efecto mutagénico ni carcinogénico cuando se han cultivado fibroblastos sobre su superficie.²¹¹

- Alúmina reforzada con circonia (ZTA) y circonia reforzada con alúmina (ATZ).

Los composites de nanopartículas de alúmina y circonia combinan la dureza de la alúmina con la mayor resistencia a la fractura de la circonia. De acuerdo con Gracis y cols., ZTA debería de tener más de un 50% en peso de alúmina y ATZ debería presentar más de un 50% de circonia. Ambas presentan mayor resistencia a la degradación a baja temperatura (LTD) al compararlo con Y-TZP, así como mayor tenacidad y resistencia a la fractura y la fatiga. Ambos composites se usan principalmente en la fabricación de prótesis articulares.^{115,212,213}

El objetivo de este tipo de composites es mejorar la resistencia al desgaste de las cerámicas anteriormente mencionadas. Actualmente se fabrican composites basados en la unión de ZTA e Y-TZP que presentan mejores propiedades mecánicas que la circonia y la alúmina por separado.^{113,171}

Los materiales cerámicos que se emplean para la fabricación de aditamentos implantológicos son el disilicato de litio y derivados como el silicato de litio reforzado con circonia, la circonia estabilizada (PSZ); la alúmina reforzada con circonia (ZTA) y la circonia reforzada con alúmina (ATZ).

2.3.3 Ventajas y desventajas de las restauraciones totalmente cerámicas

Las restauraciones totalmente cerámicas acumulan menos placa bacteriana sobre su superficie, pudiendo usarse en la zona subgingival. Poseen una elevada biocompatibilidad, especialmente las de última generación como el disilicato de litio o la circonia que presentan menor tasa de corrosión y mayor viabilidad celular en estudios *in vitro* que las cerámicas tradicionales (a base de leucita o feldespáticas).²¹⁴ Tienen una alta estabilidad química en medios acuosos con baja liberación de elementos de la superficie. Además, sus propiedades estéticas son superiores con respecto a los metales debido a su estructura y composición química que permiten el paso de luz. Son materiales con una baja conducción térmica por lo que generan mejor irritación pulpar en el caso de restauraciones sobre dientes vitales.

Por otro lado, las restauraciones cerámicas también presentan ciertos inconvenientes. Son materiales que tienen cierta tendencia a la fractura por defectos en su fabricación durante el maquinado o en clínica al realizar un ajuste oclusal en la corona ya glaseada. Este fallo estructural se ve aumentado en ambientes húmedos como el medio oral. Otro inconveniente es el desgaste de las piezas antagonistas a las cerámicas lo cual ha favorecido el desarrollo de cerámicas poliméricas que presentan menor desgaste. La falta de adaptación marginal y las microfiltraciones son otros inconvenientes, aunque esto se ha visto mejorado con la introducción de las tecnologías CAD-CAM y los cementos de resina adhesiva.¹¹⁶

La fabricación en forma monolítica y con mayor fase cristalina han mejorado las propiedades mecánicas de las cerámicas, sin embargo, cuanto menor es la fase vítrea mayor resistencia ofrece la superficie al grabado ácido y por lo tanto no es posible modificar totalmente la superficie para hacerla más adhesiva al cementado.^{137,215}

2.4 MATERIALES CAD/CAM

La introducción de nuevos materiales cerámicos en el ámbito odontológico ha conllevado también a la introducción de nuevas tecnologías para su procesado, cómo es la tecnología CAD CAM, la cual está basada en el diseño y fabricación de restauraciones asistida por ordenador. Esta tecnología permitió uniformizar la producción de las restauraciones, reducir costes a largo plazo y reducir el número de errores que se cometen con los métodos de confección tradicional.¹⁹¹

Esta tecnología se desarrolló en Francia en 1972 gracias al doctor Duret, que comenzó con la confección de coronas dentales a través de la impresión óptica de los muñones y su posterior diseño y fresado por ordenador.²¹⁶ Más adelante, en Italia, el doctor Mormann desarrolló el sistema CEREC® (*CEramic REConstruction*) para la confección de coronas unitarias en la clínica en vez de en el laboratorio.²¹⁷ Esto supuso un avance al disponer de restauraciones en el mismo día. Posteriormente en Suecia en el año 1983, el doctor Andersson desarrollaba el sistema Procera®, el cual vino a suplir la carencia de estructuras metálicas coronarias que no estuvieran basadas en las aleaciones de níquel-cromo debido a las alergias reportadas. Estas estructuras comenzaron siendo de titanio y posteriormente dio lugar a la confección de muchos más tipos de restauraciones y desde los años 80 el sistema CAD-CAM no ha dejado de evolucionar.^{159,218,219}

Los sistemas CAD CAM constan de tres componentes principales: el primer elemento es la unidad de adquisición de datos, la cual recoge la información a partir de la boca del paciente y antagonista o a partir de los modelos de trabajo. Se realiza una impresión virtual a través de escáneres intraorales y así se obtiene un modelo virtual con el que trabajar. El segundo componente es el software de diseño virtual de la restauración sobre el que luego aplicar unos parámetros de fresado. Por último, es necesario un dispositivo de fresado guiado por ordenador para la fabricación de la restauración partiendo de un bloque sólido del material (figura 20).^{220,221}

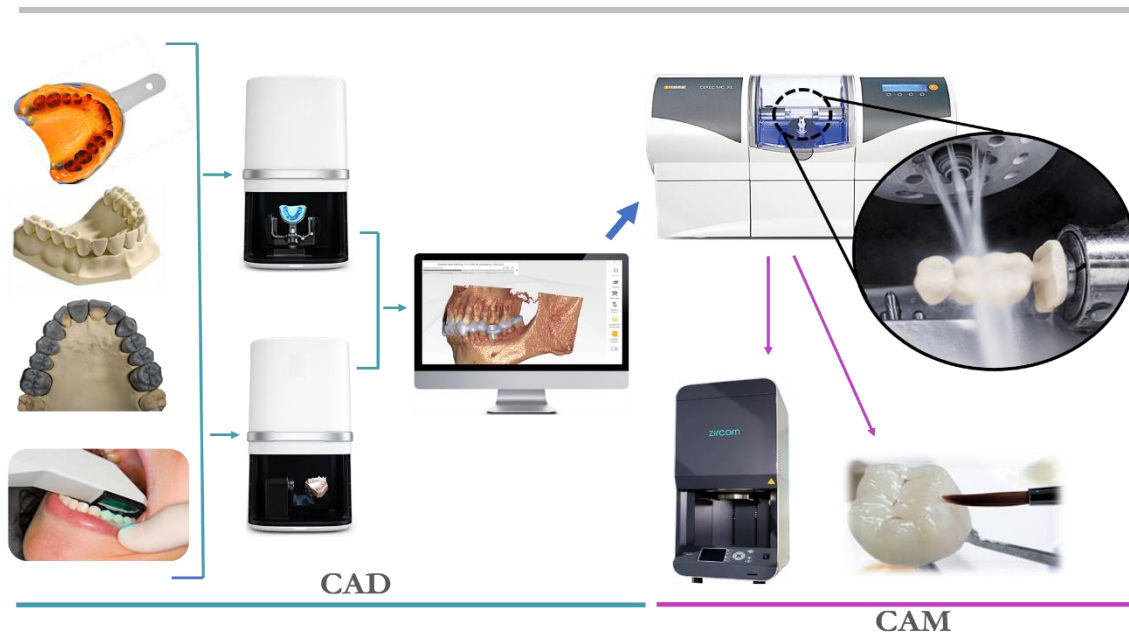


Figura 20. Secuencia de confección de rehabilitaciones con método CAM-CAM. Se realiza el escaneo de una impresión, molde de trabajo, encerado o escaneo intraoral y esa información se transmite a un ordenador en forma de archivo STL para el diseño CAD de la restauración. Una vez diseñado, la información se envía a la fresadora para fresar el bloque o disco del material según el diseño realizado. Por último, se procede a la sinterización si es necesario.

En lo que se refiere al escaneado, es posible tomar una impresión, obtener el modelo, hacer el encerado diagnóstico y escanearlo para luego hacer el diseño CAD o bien hacer el escaneado del muñón y hacer el encerado CAD; por otro lado, también es posible realizar un escaneo de la cubeta de la impresión realizada o directamente de forma intraoral. Para esta última forma, algunos sistemas requieren de la aplicación de polvo opaco de dióxido de titanio que refleja la luz y elimina la dispersión de luz para que el sistema pueda captar las estructuras más brillantes como las de titanio.²²² Los sistemas más avanzados permiten hacer toma de color durante el escaneado o incluso transferir la localización del arco maxilar a un articulador virtual.^{223,224} El escaneado puede realizarse con “cámaras de imagen única” que toman la imagen de varias piezas a la vez y son superpuestas y reorganizadas posteriormente en el sistema informático, o por otro lado el escaneado se puede hacer con videocámara.

La imagen generada por el escaneado es un archivo STL (*Standard Triangulation Language*) que bien se puede diseñar y fresar en clínica con un sistema tipo CEREC (método directo) o bien el archivo STL se envía a un laboratorio o a un centro de producción para su diseño y fresado (método indirecto).²²⁵ Además, los sistemas CAD-CAM se pueden clasificar como sistemas abiertos o cerrados. Los sistemas cerrados son aquellos en los que tanto el escaneado como el diseño y el fresado de la estructura debe de ser con los sistemas de la misma compañía; por otro lado, el sistema abierto permite realizar el diseño CAD y la fabricación CAM a través de sistemas diferentes de forma independiente.²²⁶

Introducción

El uso del sistema tipo CEREC tiene la ventaja de poder obtener restauraciones en la misma visita. Sin embargo, el elevado coste de este sistema y el hecho de que algunos procedimientos como el glaseado de una restauración cerámica o el maquillaje de una incrustación son procedimientos que habitualmente se realizan en un laboratorio, hacen que el método indirecto o *out office* continúe siendo el más empleado.²²³

Con el escaneado intraoral, la impresión es mucho más precisa, así como el ajuste de las estructuras encontrándose unas discrepancias de no más de 150 μm .²²⁷

El diseño por software permite hoy en día la confección de encerados diagnósticos, prótesis provisionales, postes de endodoncia, casquillos, barras de sobredentadura, cubetas individualizadas, férulas de desprogramación mandibular, análisis ortodóncico, guías quirúrgicas y aditamentos implantológicos hechos a medida.^{221,223} Los programas contienen bibliotecas para hacer un diseño básico a partir del cual acabar la restauración a medida.

La fabricación CAM es el último paso de este sistema. Existen dos métodos de procesado que son el sustractivo (fresado y devastado) y el aditivo o de prototipado rápido.

2.4.1 Sistema de sustracción

Se basa en el fresado del bloque o disco del material a través de la información que transmite el software CAD a una máquina CNC (*Computer Numeric Controlled*) en la que se indican los parámetros a emplear como la secuencia de fresado, las fresas a usar, la dirección o la velocidad de fresado, entre otros.¹⁹¹ Generalmente dos fresas trabajan al mismo tiempo en 3, 4 o 5 ejes de acuerdo a las coordenadas programadas, en la cara externa e interna del bloque gracias a un giro permitido de 180°. ²²⁸ En las máquinas con 4 y 5 ejes, éstos se mueven linealmente hacia arriba y abajo en los 3 ejes del espacio (x, y, z) con rotación en el eje x (en el caso de las unidades con 4 ejes) o en el eje x e y (máquina de 5 ejes).²²¹ La precisión en el fresado depende de las dimensiones de las fresas empleadas, siendo aquellas de menor diámetro (del orden de 1 mm) las que aportan mayor precisión, aunque ante la necesidad de fresar ángulos internos inferiores al menor diámetro de fresa, se produce un fresado excesivo que implica errores de ajuste.^{191,229}

En función del tipo de material y la forma de presentación (presinterizado o totalmente sinterizado), el fresado de la pieza se hará en seco o mojado, con fresa de diamante o de carburo de tungsteno. Los materiales que habitualmente se procesan con métodos sustractivos son metales, cerámicas, ceras y resinas. El fresado de bloques totalmente sinterizados se realiza con máquinas CNC robustas para su uso en metales, circonia y composites de resina.^{191,225} Este tipo de fresado implica una elevación de la temperatura tanto en las fresas como en la superficie del material, especialmente en aquellos que presentan baja conductividad térmica como la

circonia; es por ello que estas máquinas normalmente van dotadas de un sistema de refrigeración para prevenir el desgaste prematuro de las fresas por sobrecalentamiento y evitar que se formen microfisuras o deslaminado sobre el material.²³⁰ En el caso de la circonia, la principal desventaja de hacer un fresado de un bloque totalmente sinterizado es el mayor tiempo que se emplea además de mayor riesgo de cambio de fase de tetragonal a monoclinica que pueda desencadenar en microfisuras de superficie y degradación a baja temperatura (LTD).¹⁸⁹ Es por ello que el fresado presinterizado de la circonia es el más habitual.

Según lo recogido en la literatura, el ajuste de una restauración no dependería tanto del menor diámetro de las fresas sino del tipo del material, habiéndose observado mayor ajuste en aquellos materiales fresados presinterizados por las razones anteriormente explicadas. Además, se ha observado que las restauraciones confeccionadas para implantes son más precisas que las que se confeccionan para piezas dentales. Esto puede ser debido a que la geometría de los componentes implantológicos es mucho más precisa que las de las estructuras dentales y por lo tanto simplifica el procesado de las mismas.¹⁹¹

2.4.2 Sistema de adición

Se trata del proceso de crear un material capa a capa obtenido del diseño de un modelo 3D.²³¹ También se emplea una máquina CNC que se mueve en dos ejes del espacio (x, z) y la plataforma donde está la pieza se mueve en el eje y vertical.^{225,232} Cuando se finaliza el diseño CAD, se segmenta en imágenes de multicorte, y cada milímetro del material se corresponde con la deposición de 5-20 capas. Cada capa está compuesta de material en forma de polvo o líquido, y conforme se van depositando se van fusionando hasta crear la forma diseñada. A continuación, se elimina el exceso de material y se recorta la estructura de soporte de la pieza.^{221,232} Este sistema se utiliza para trabajar con materiales como cera, resina, metales y de forma más reciente la circonia.

Las técnicas que generalmente se emplean en el sistema de adición son la estereolitografía (SL), la proyección de luz digital (DLP), el sinterizado selectivo por láser (SLS), fundición selectiva por láser (SLM), sinterizado directo de metal por láser (DMLS) y la impresión 3D.

Estas técnicas tienen la ventaja de poder crear objetos de forma pasiva sin aplicación de fuerzas, de mayor tamaño, reducción del gasto de material hasta en un 40% y permite mayor precisión en los detalles que con la técnica sustractiva.^{233,234} Sin embargo, la principal desventaja es que se pueden crear discrepancias en el modelo final debido a la contracción que se produce durante su procesado, además de su elevado coste.²²¹

Introducción

La estereolitografía (SL) es una técnica desarrollada en los años 80 que se basa en la producción de estructuras de resina fotopolimerizada a partir de la polimerización en una zona concreta de la resina en estado líquido con un haz de luz ultravioleta. Esta técnica tiene un coste elevado y sólo se puede emplear con materiales polimerizables, pero se obtienen estructuras de gran precisión.^{225,235,236}

La proyección de luz digital (DLP) usa una fuente LED de elevada energía. La luz se dirige mediante una máscara creada por un dispositivo digital de microespejos (DMD), que consiste en cientos de miles de microespejos que se mueven de forma independiente y controlan la dirección en el reflejo de la luz sobre la resina en forma de capas y no en una zona concreta como la estereolitografía.²³⁵

Generalmente, ambas técnicas – SL y DLP – se emplean para fabricar *mock-up*, férulas quirúrgicas de resina o restauraciones temporales.²³⁵

Las técnicas SLS/SLM/DMLS se basan en la confección de un modelo 3D por sinterizado de una capa de partículas de polvo del material con un láser de CO₂ a través del diseño CAD realizado previamente. En cada capa, el láser eleva la temperatura al punto de fusión para fusionar las partículas del polvo.²³⁵ La diferencia entre ellas es que SLS se emplea para la confección de estructuras con metales, cerámicas y polímeros y por otro lado SLM y DMLS se emplean únicamente en metales.²³⁷ Con estas técnicas es posible confeccionar coronas e infraestructuras metálicas dentales con un ajuste y propiedades mecánicas similares o superiores a las fabricadas de forma convencional.^{229,238} Sin embargo, en la confección de aditamentos implantológicos metálicos, la técnica sustractiva por fresado da unos resultados muy superiores a los obtenidos con SLS.²²⁹

La impresión 3D se basa en la extrusión del material por una boquilla y, o bien solidifica inmediatamente o bien se inyecta un pegamento o aglutinante en polvo para solidificarlo. Otra variante es la extrusión del material y posterior curado de cada capa con luz ultravioleta. Debido a la gran versatilidad que presenta, se pueden emplear un amplio abanico de materiales con esta técnica como cera, resina, cerámica o circonia y crear modelos dentales, *mock-up* o férulas de desprogramación mandibular.^{235,236} Algunos sistemas permiten el uso de estructuras multicolor. El empleo de estas técnicas para fabricar composites dentales o restauraciones cerámicas como la circonia se encuentra todavía en fase experimental, pero supondrá una mejora en la confección de restauraciones dentales e implantológicas en el futuro próximo.²³⁹

2.5 TRATAMIENTOS DE SUPERFICIE EN LOS MATERIALES IMPLANTOLÓGICOS Y DE RESTAURACIÓN IMPLANTOLÓGICA

El futuro de las investigaciones en el ámbito de los biomateriales pasa por una doble vertiente. Por un lado, la modificación de superficies de materiales ya conocidos y por otro lado la búsqueda de nuevos materiales que vengán a mejorar los actuales.

En los últimos años las investigaciones se han centrado en mejorar los materiales existentes – especialmente las cerámicas monolíticas – y también en desarrollar nuevos materiales cerámicos que proporcionen buenas propiedades mecánicas y al mismo tiempo imiten las propiedades ópticas de transmisión de luz de los dientes.

Es importante que la ingeniería de biomateriales vaya enfocada al diseño de superficies que genere las mejores condiciones para la adsorción proteica y la posterior adhesión celular. En ese sentido, la modificación de superficies puede realizarse a través de la introducción de grupos funcionales en forma de recubrimiento uniforme de la superficie bien para aumentar la hidrofiliidad – con grupos hidroxilo o amino– o bien aumentar la hidrofobicidad – con grupos metilo– y así modular también la adhesión.^{30,31} Los más empleados son carboxilo (-COOH), amino (-NH₂), hidroxilo (-OH) y metilo (-CH₃). Uno de esos tratamientos es el plasma (que puede ser frío, térmico, atmosférico o en vacío).

Una de las aplicaciones del plasma atmosférico es la introducción de elementos y compuestos químicamente activos como son OH, NO, H₂O₂, NH₂ y COOH para limpiar las impurezas (procedentes del ambiente y del procesado) de la superficie del material. Con esta técnica se consigue reducir el carbono superficial hasta en un 40% y aumentar la energía libre de superficie del material.^{84,240,241} En el caso del tratamiento con plasma de oxígeno lo que se pretende es introducir grupos funcionales O₂ altamente energéticos, los cuales oxidan la superficie otorgándole una polaridad más elevada (positiva o negativa) y proporcionando una superficie más hidrófila una vez que entra en contacto con un líquido (saliva, sangre, medio de cultivo).^{83,84,242} De forma similar actúan otros plasmas como el de argón,^{44,243,244} el de helio o el de oxígeno-argón,^{245,246} así como el láser de CO₂.²⁴⁷ Otra aplicación es el plasma atmosférico de grafeno como recubrimiento de superficies de circonia, en las que se ha observado un menor desgaste de las superficies, mejorando el comportamiento tribológico o de desgaste de la circonia.²⁴⁸

Otra técnica destinada a limpiar la superficie es la irradiación con luz UV-C. En esta última, los fotones del UV-C rompen las uniones débiles entre los átomos de circonia y los grupos carboxilo de las cadenas contaminantes de carbono,²⁴⁹ de esta forma los átomos del biomaterial interaccionan con los átomos de oxígeno de las moléculas de agua y pueden ser adsorbidas, aumentando la hidrofiliidad de superficie

Introducción

lo cual mejora las interacciones célula-biomaterial sin modificar ni la topografía ni la rugosidad de superficie.⁵⁷

La técnica de creación de monocapas autoensambladas de oro o de plata (SAMs) también introducen grupos funcionales en una superficie para mejorar sus propiedades en condiciones *in vitro*. Se introducen grupos carboxilo que aportan carga negativa a la superficie y se ha observado que proteínas como la fibronectina y la albúmina presentan una unión holgada con estos grupos y por lo tanto son fácilmente desplazadas para la posterior adhesión celular. No obstante, el efecto del grupo carboxilo es dependiente de su concentración ya que a elevadas densidades produce el efecto contrario.^{91,250} La tendencia en los últimos años es crear combinaciones de grupos funcionales para favorecer las propiedades de superficie y mejorar la biocompatibilidad de los materiales.

Otros tratamientos buscan modificar la topografía de superficie como el grabado ácido o el arenado.^{251,252} Otra técnica adicional consiste en la adición de un recubrimiento de proteínas, como la fibronectina o el fibrinógeno, para facilitar la adhesión celular.^{253,254}

La combinación de la introducción de grupos funcionales junto con el recubrimiento con una capa de proteínas es otra técnica empleada para estimular la absorción proteínica y la posterior adhesión celular. Un ejemplo de ello es la combinación de grupos hidroxilo (carga neutra e hidrofílico) o amino (carga positiva) con fibronectina preadsorbida en la superficie con la que se ha visto una mayor formación de placas de adhesión focal relacionado con una mayor adhesión y esparcimiento celular.²⁵⁵ Por otro lado, la introducción de grupos funcionales hidrófobos (como el metilo) promueve la absorción de proteínas no adhesivas del plasma (como la albumina o el fibrinógeno) las cuales tienen un carácter marcadamente hidrófobo que no son fáciles de desplazar por proteínas adhesivas de la matriz extracelular y que generalmente no dan lugar a una posterior adhesión celular provocando mayor acumulación plaquetaria, formación de cápsula de fibrina sobre la superficie y mermando la biocompatibilidad del material.^{91,255,256}

En lo que se refiere a la circonia, se han realizado diversos tratamientos de superficie cuando se emplea como material de implante dental.²⁵⁷ Además de los tratamientos habituales como el grabado ácido o el arenado, también se le han realizado recubrimientos bioactivos con películas de sílice o dopamina, mejorando las propiedades antimicrobianas de la circonia.^{258,259}

Se ha observado que la dopamina es un componente importante de las estructuras adhesivas de los mejillones. Lee y cols. desarrollaron un estudio *in vitro* basado en la síntesis de una dopamina autopolimerizable para formar finas películas de recubrimiento y se observó que era capaz de adherirse a un amplio rango de materiales orgánicos e inorgánicos.²⁶⁰ En estudios posteriores se ha observado que, al emplear la dopamina como recubrimiento de circonia, mejora las propiedades antimicrobianas y mejora la adherencia de los fibroblastos sobre la superficie.²⁵⁹

Otra forma de modular la adsorción proteica es a través de la polarización eléctrica de una superficie, con la cual es posible conseguir un efecto antibacteriano al cargar la superficie positiva o negativamente.^{261,262}

La oxidación anódica y la técnica de sol-gel son otras técnicas de modificación de superficie. La oxidación anódica es un tratamiento de superficie basado en la oxidación electroquímica que permite modular la rugosidad, la nanoestructura y la composición química de una superficie al sumergirla en un electrolito y someterla a una corriente anódica. Dicho tratamiento da como resultado la formación de una capa de óxido de titanio más densa y espesa y un aumento de grupos hidroxilo que hacen más hidrófila la superficie con respecto a una mecanizada.²⁶³ Diversos estudios clínicos recientes coinciden en que la anodización electroquímica de color rosa en aditamentos de titanio genera una buena respuesta de los tejidos blandos, además de mejorar la estética.²⁶⁴⁻²⁶⁷

Por otro lado, la técnica de sol-gel se basa en la dispersión de partículas sólidas en una fase líquida que posteriormente gelifican. El recubrimiento de circonia con finas películas de óxido de titanio (TiO₂) con esta técnica, es otro tratamiento de superficie con el que se ha observado un aumento del carácter hidrófilo y mayor proliferación celular *in vitro*.²⁶⁸

Por otro lado, se ha observado que el recubrimiento *in vitro* de aditamentos de titanio a través de la deposición física de vapor con nitruro de circonia otorga un efecto antibacteriano a la superficie.²⁶⁹

El desarrollo de nuevos materiales cerámicos generalmente se basa en la mejora de otros ya existentes como la circonia ultra-translúcida (5Y-PSZ)¹⁸¹ o las vitrocerámicas de alúmino-silicato endurecidas con disilicato de litio.²⁷⁰ En los últimos años han surgido los llamados materiales híbridos, confeccionados a partir de la unión de distintos tipos de materiales, como por ejemplo el PICN (*Polymer Infiltrated Ceramic Network*) que se basa en la unión de una matriz cerámica y un polímero infiltrado. La matriz cerámica suele estar compuesta de leucita y circonia y el polímero se basa en una mezcla de resinas de dimetacrilato de uretano y de etilenglicol. Se emplean para la fabricación de aditamentos implantológicos híbridos en los que la base y zona de conexión al implante son de titanio y éste lleva un recubrimiento cerámico que puede ser de PICN o de otros materiales como el disilicato de litio o la circonia.^{271,272}

Dado que los sitios de adhesión celular (adhesiones focales) se dan a escala micrométrica (0,25-10 μm)²⁷³ y la adsorción molecular y proteica se produce a escala nanométrica (<40 nm),⁶² los futuros estudios se deberían centrar en la nanotopografía o incluso la topografía a nivel atómico ya que es la que afecta de forma primaria al comportamiento proteico celular sobre una superficie.^{274,275} Con ello se pone de relieve la necesidad de que la topografía de las restauraciones y aditamentos implantológicos CAD-CAM se diseñe de forma personalizada y la adhesión celular

Introducción

pueda modularse según interese a través de la nano y microtopografía adaptada a la anatomía del paciente.

A través de la búsqueda del mejor tipo de material y tipo de superficie, se busca que los aditamentos implantológicos favorezcan la curación y reorganización de los tejidos alrededor de su superficie y otro lado minimizar o reducir el acúmulo de placa.²⁷⁶ Ello implica crear una interfase con dos tipos de superficie: una superficie a nivel del cuello del implante que presente microrrugosidades con elevada humectabilidad, que favorezca la adsorción proteica, la adhesión de las células a nivel de la interfase epitelio-conjuntiva y que protejan al implante del paso de bacterias; y por otro lado una superficie coronal mucho más pulida y glaseada, más hidrófoba y poco adhesiva que evite la formación de placa bacteriana y permita una higienización más fácil.²⁷⁶⁻²⁷⁹

El lanzamiento de un nuevo material cerámico CAD/CAM requiere analizar sus propiedades. La nueva cerámica de silicato de litio reforzado con circonia (ZLS) no ha sido analizada todavía en relación a la respuesta que genera en los tejidos cuando se usa como material de aditamento implantológico. Por tanto, conociendo la influencia que tiene un material sobre la disposición de los tejidos a su alrededor, y la importancia de ello en la estética y el mantenimiento a largo plazo del implante subyacente, sería interesante evaluar la influencia de ZLS en la organización de los tejidos blandos periimplantarios de forma temprana. Es por ello que surge el planteamiento de este estudio *in vitro*.

Hipòtesis



3. HIPÓTESIS

El silicato de litio reforzado con circonia (ZLS) es un material CAD-CAM de nueva generación. Se plantea su estudio *in vitro* mediante el cultivo de fibroblastos gingivales humanos sobre su superficie y comparación con circonia monolítica (Y-TZP), considerada el *gold standard* como material de aditamento estético implantológico. Dicha comparación plantea las siguientes hipótesis:

1. El comportamiento de las células en contacto con el nuevo material (ZLS), a nivel de conteo celular y características citomorfométricas, es similar al de la circonia (Y-TZP).
2. ZLS es un material no citotóxico, en el que las células cultivadas sobre su superficie presentan unos niveles de viabilidad celular similares a los de aquéllas cultivadas sobre Y-TZP.
3. Los niveles de secreción de colágeno tipo I al medio de cultivo por parte de las células son similares entre ambos materiales (Y-TZP vs. ZLS).

Objetivos



4. OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general de este estudio es comparar el comportamiento *in vitro* de células fibroblásticas gingivales humanas (HGFs) cultivadas sobre discos de silicato de litio reforzado con circonia (ZLS) y circonia parcialmente estabilizada con itrio (Y-TZP).

Objetivos específicos

1. Cuantificar el número de células y analizar las características citomorfométricas y el esparcimiento de las mismas, al cultivarlas sobre la superficie de ambos materiales.
2. Evaluar y comparar el grado de citotoxicidad de ambos materiales.
3. Cuantificar y comparar la influencia de la superficie de ambos materiales sobre la secreción de colágeno tipo I por parte de las células cultivadas.

Material y Método



5. MATERIAL Y MÉTODO

El presente trabajo de investigación se basa en varios estudios *in vitro* desarrollados para realizar un estudio global del comportamiento de dos cerámicas dentales que habitualmente se emplean para la confección de restauraciones por método CAD/CAM. Dichos estudios se basan en la caracterización de su superficie, evaluación de citotoxicidad y su influencia sobre el comportamiento de fibroblastos gingivales. La fase experimental de este estudio se ha llevado a cabo en el Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) y en el Instituto de Ciencias de los Materiales de Sevilla (ICMS), centro adscrito al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

5.1. MATERIAL

5.1.1 Cerámicas de estudio

Se estudiaron dos materiales cerámicos, adquiridos por el Departamento de Estomatología de la Universidad de Sevilla.

Los materiales cerámicos testados en este estudio fueron:

- Circonia parcialmente estabilizada con itrio (Y-TZP).
- Silicato de litio reforzado con circonia (ZLS).

Dichos materiales se comercializan en forma de bloques y discos. Su composición, datos del fabricante y referencias se muestran en la Tabla 2.

Nombre	Tipo Material	Fabricante	Referencia/ n° lote	Presentación comercial
VITA YZ® (Y-TZP)	Circonia parcialmente estabilizada con óxido de itrio	VITA Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemania	YZ T ^{white} / 63320	Discos de 98,4 x 20 mm
Celtra® Duo (ZLS)	Silicato de litio reforzado con circonia	Dentsply- Degudent GmbH, Hanau- Wolfgang, Alemania	HT- A1/18027341	Bloques de tamaño C14

Tabla 2. Características técnicas de los materiales estudiados.

5.1.2 Fabricación de los discos de estudio

Para la realización de este estudio de investigación se fresó un total de 90 discos a partir de los bloques y discos comerciales. Se emplearon dos discos para la caracterización de superficie, ocho discos para el estudio citomorfométrico, 48 discos para el estudio de citotoxicidad y 32 discos para el estudio de secreción de colágeno.

El diseño de los discos se realizó con el software inLab CAM 15.0 (Dentsply Sirona, York, Pensilvania, Estados Unidos) con unas dimensiones finales de 10 mm de diámetro x 2 mm de grosor (figura 21).

El fresado de ambas muestras se realizó en la unidad de fresado InLab MC XL®, (Sirona, Bensheim, Alemania) que presenta una reproductibilidad en el fresado de $\pm 25\mu\text{m}$. El tallado de las piezas se hizo con el siguiente juego de fresas de diamante que oscilan a 42.000 RPM:

- a. Bloques Celtra Duo: fresas Step Bur 12 y 12S, Cylinder Pointed Bur 12 y 12S. Fresado en modo refrigerado con agua.
- b. Discos VITA YZ: fresas Step Bur20, Cylinder Pointed Bur 20, Shaper 25 RZ y Finisher 10. Fresado en seco.

Los bloques de ZLS se comercializan en un estado totalmente sinterizado, no siendo necesario un segundo sinterizado para el desarrollo de este estudio. Por otro lado, los discos de Y-TZP se presentan presinterizados y tras su fresado se sinterizaron completamente en el horno de sinterización VITA ZYRCOMAT 6000 MS (VITA Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemania) con el programa YZ T Universal a una temperatura de 1530°C y una duración de 4 y 40 minutos.

Como discos control se emplearon bases de mini placas de Petri de poliestireno.

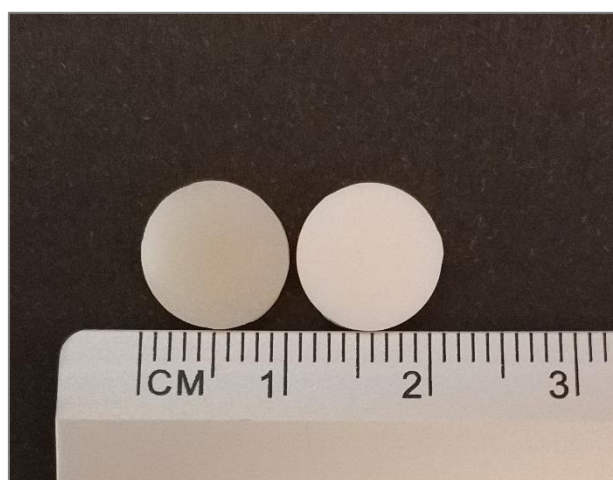


Figura 21. disco de ZLS (izquierda) y disco de Y-TZP (derecha).

5.1.3 Material empleado para el cultivo celular

La criopreservación de los fibroblastos gingivales (HGFs) (Innoprot, Bizkaia, España) se realizó en tanque de nitrógeno líquido MVE XC47/11-6 (Chart Industries, Inc., Ball Ground, Georgia, Estados Unidos) a -196°C (figura 22). Se realizaron alícuotas en criotubos de 2ml (ClearLine, DD Biolab, Barcelona, España), en las que por cada 1 ml de volumen celular en medio completo se le añadió 0,9 ml de 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Fisher Scientific, Hampton, Nuevo Hampshire, Estados Unidos). El DMSO es un solvente hidrosoluble crioprotector, que se acumula en el interior de las células y previene la formación de cristales intracelulares que puedan romper la membrana extracelular o el contenido citoplasmático.



Figura 22. Tanque de nitrógeno líquido para el almacenamiento de células.

Para la descongelación de las células de forma progresiva se empleó un cajón de hielo seco para el transporte de los criotubos hasta un baño termostatzado a 37°C (Ovan, Badalona, Barcelona, España). Para centrifugar las células se emplearon tubos falcon de 15 ml (nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, Alemania) y una centrífuga de sobremesa Allegra X-22R (Beckman Coulter, Indianapolis, Indiana, Estados Unidos).

Para el cultivo celular se emplearon frascos de cultivo ventilados de poliestireno de 75 cm^2 (Biolite, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). El medio de cultivo preparado fue Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Biowest, Nuaille – Francia) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Biowest) y 1% de glutamina-penicilina-estreptomicina (Biowest) por cada 500ml de medio de cultivo.

Material y Método

Para el lavado celular se empleó Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1x (DPBS, Biowest, Nuaille – Francia). Para la tripsinización o levantamiento de la monocapa celular se realizaron alícuotas al 1x de Trypsin-EDTA 10x (Biowest, Nuaille – Francia) (figura 23).



Figura 23. Atemperado en baño termostatzado del criotubo con células, DMEM y DPBS.

Durante la siembra, las células se mantuvieron en un incubador de CO₂ Nuair US Autoflow NU-4750-E (Nuair, Plymouth, Minnesota, Estados Unidos) con las siguientes condiciones: 5% CO₂, 95% aire a 37°C.

Los estudios con células se llevaron a cabo en cabina de seguridad biológica clase II A MSC Advantage (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Este tipo de cabina está parcialmente abierta por delante para manipulación por la parte frontal inferior, con corriente de aire descendente de flujo laminar uniforme y unidireccional (figura 24).



Figura 24. Incubador de CO₂ y cabina de flujo laminar empleados en este estudio.

5.1.4 Material empleado para la visualización de muestras

Para la visualización de muestras se emplearon diferentes microscopios según el estudio realizado. Todos ellos pertenecen a los Servicios de Biología y Microscopía del CITIUS.

- Microscopio invertido de contraste de fase Olympus CKX41SF2 (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokio, Japón) con objetivos 10x, 20x y 40x. Programa de obtención de imágenes analySIS getIT versión 5.1 (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Alemania) .
- Perfilómetro óptico 3D de no contacto empleado Sensofar S-Neox (Sensofar Medical, Terrasa, España)
- Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE-SEM, Field Emission- Scanning Electron Microscopy) FEI TENE0 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).
- Microscopio confocal Zeiss LSM 7 DUO (Carl Zeiss, Jena, Alemania) con una unidad de epifluorescencia Excite 120PC.
- Ordenador HP Z800 para procesamiento de imágenes.

Los modos de trabajo utilizados en los microscopios empleados se describirán con más detalle en el apartado de método.

5.2. MÉTODO

Breve descripción de los estudios realizados

Se llevaron a cabo tres tipos de estudios comparativos *in vitro* con el fin de estudiar la influencia de dichas superficies cerámicas sobre el comportamiento celular temprano a las 24, 48 y 72 horas tras el cultivo sobre los discos. Se evaluaron parámetros a nivel citomorfométrico, conteo celular, esparcimiento, cubrimiento de la superficie y de citotoxicidad de dichos materiales. Así mismo, se llevó a cabo un estudio de secreción de colágeno tipo I (figura 25). Las variables analizadas en cada uno de los estudios se irán describiendo en cada apartado de metodología del estudio.

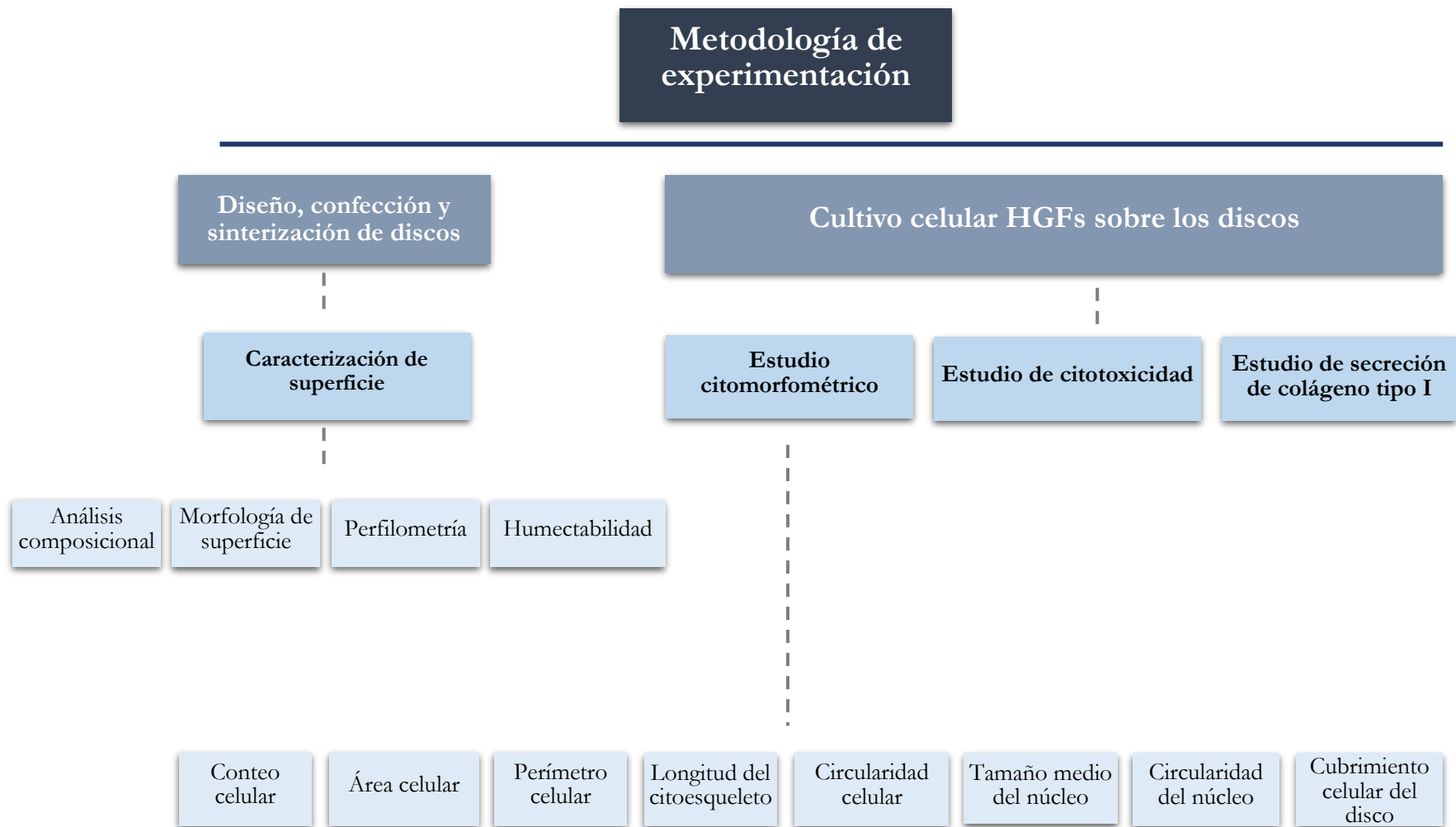


Figura 25. Diagrama de flujo de la metodología llevada a cabo en este estudio.

5.2.1 Estudio de caracterización de superficie

Previamente a la realización de los estudios celulares, se realizó un estudio de caracterización de ambas superficies, basado en el análisis de la composición de superficie, morfología superficial, perfil de rugosidad y humectabilidad de superficie.

5.2.1.1 Análisis de composición de superficie

El análisis de composición de superficie se realizó mediante espectrómetro de dispersión de energía de Rayos X (EDS, *Energy Dispersive Spectrometer*) incluido en el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE-SEM) FEI TENE0 en modo de trabajo alto vacío (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) con cañón de emisión tipo Schottky y detector SDD EDAX (AMETEK, Inc., Estados Unidos) para microanálisis de elementos ligeros (figura 26).



Figura 26. Microscopio electrónico de barrido con espectrofotómetro.

En primer lugar, se procedió a la limpieza de las muestras con etanol y secado por ambas caras de la superficie y se les colocó cinta de carbón adhesiva conductora para su colocación sobre una montura de aluminio en el portamuestras. En la microscopía electrónica de barrido la imagen se genera a partir de los electrones que rebotan sobre la superficie de la muestra. Las superficies cerámicas no tienen propiedades conductoras, por lo que se les aplica una fina capa de algún elemento conductor. Este procedimiento se denomina pulverización catódica o *sputtering* de una superficie. En nuestro estudio se empleó un metalizador Scancoat Six (HHV Ltd, Crawley, Reino Unido) para la deposición de un recubrimiento de oro sobre la superficie de las muestras (figura 27). La energía liberada por la colisión de electrones

Material y Método

sobre la muestra es recogida por el detector de espectroscopia de dispersión del microscopio (EDS). Esta energía está relacionada con la composición elemental de la muestra permitiendo su análisis químico.



Figura 27. Metalizador para el recubrimiento de oro sobre la superficie de la muestra.

Para el procesamiento de las imágenes se empleó el software EDAX TEAM versión 4.4.1 (AMETEK, Inc., Estados Unidos). Se analizaron áreas de $130\ \mu\text{m}$ durante 200 segundos. Los resultados del microanálisis se expresan en porcentaje de contenido en masa (wt%).

5.2.1.2 Morfología de superficie

El análisis FE-SEM de la morfología superficial se realizó también con el microscopio electrónico de barrido (MEB) FEI TENE0 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) en modo de electrón secundario (SE) con el detector *Everhart-Thornley* (ETD) para obtención de información topográfica. Se obtuvieron imágenes a 2 kV de voltaje de aceleración a una magnificación de 200x.

5.2.1.3 Perfilometría

El estudio de rugosidad se realizó mediante perfilómetro óptico 3D de no contacto Sensofar S Neox (Sensofar Medical, Terrasa, España), con técnica de microscopía confocal-interferométrica, el cual se puede observar en la figura 28. El software empleado fue el SensoMAP Premium 7.4. Las mediciones se hicieron de acuerdo con la norma ISO 25178:2012. *Geometric Product Specifications (GPS) – Surface texture: areal.*²⁸⁰

Se empleó un objetivo 20x EPI a una distancia focal de 4,50 mm y una resolución óptica Green de 0,32 μ m. Se realizaron cinco medidas en diferentes localizaciones de forma aleatoria para cada material, con una dimensión preestablecida de 0,87 x 0,66 mm² y con una corrección cut-off de 250 μ m. El parámetro de rugosidad cuantitativa utilizado fue la media aritmética y la desviación estándar de la rugosidad 3D (Sa).

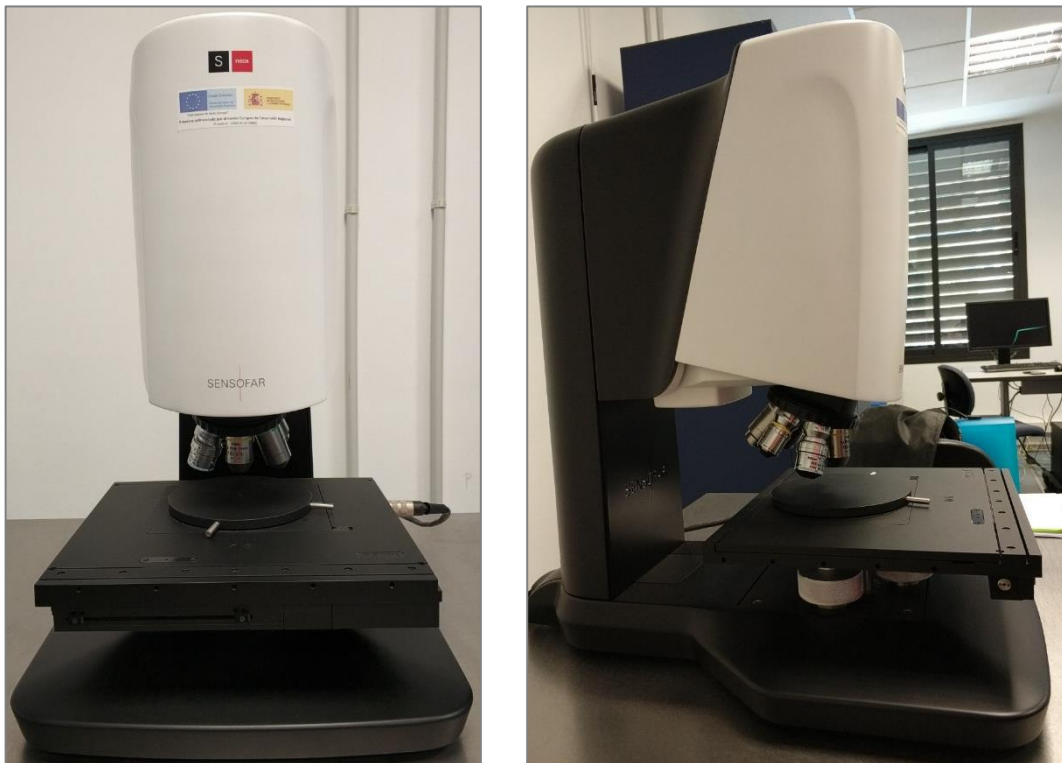


Figura 28. Perfilómetro Sensofar empleado en la caracterización topográfica de los discos.

5.2.1.4 Humectabilidad de superficie

En este estudio se calculó el ángulo de contacto promedio de cada muestra cerámica para conocer la humectabilidad de las mismas y su influencia sobre el comportamiento celular.

La medida se realizó a temperatura ambiente (21°C) con un goniómetro OCA15pro de Dataphysics (DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Alemania), que dispone de microdispensador con jeringa de 100 μl y software SCA 20 versión 2.0. (figura 29).

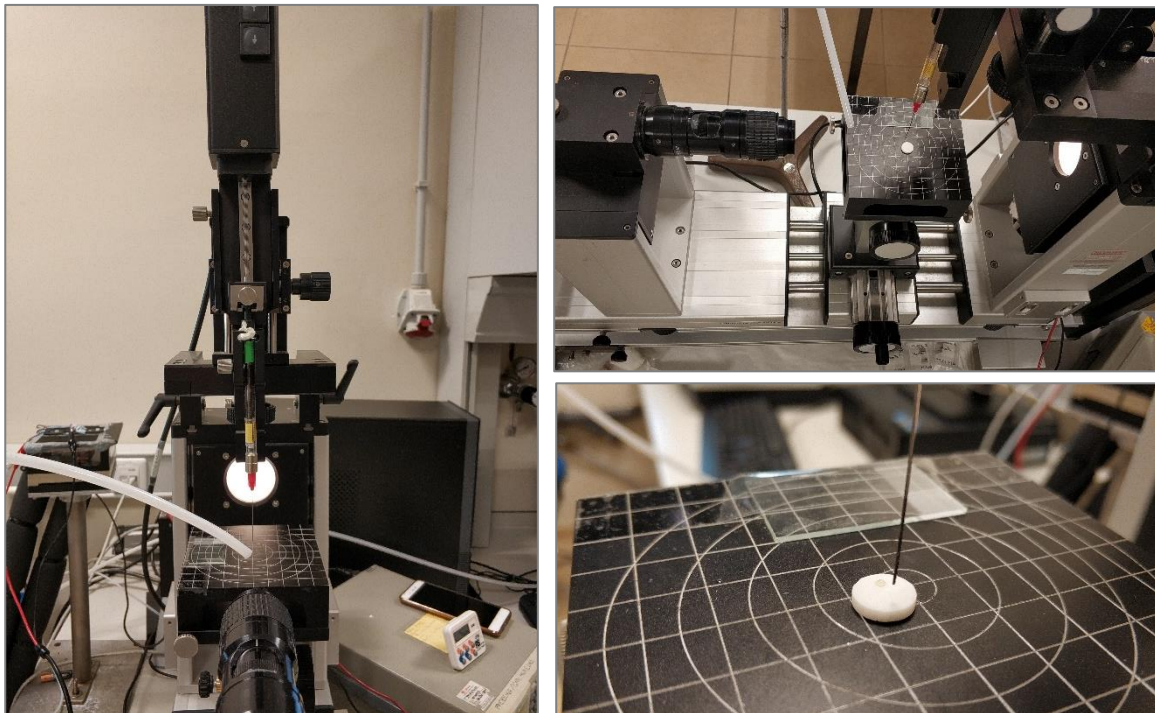


Figura 29. Goniómetro empleado para analizar la humectabilidad de las superficies cerámicas. Detalle de la gota de diyodometano sobre la superficie de Y-TZP (imagen inferior derecha).

El método empleado fue el habitualmente llamado de gota sésil que se basa en el ángulo formado entre la tangente a la gota en la interfase de triple confluencia de sólido/líquido/gas y la superficie horizontal del sólido (figura 30).⁷⁵ En este estudio se emplearon dos líquidos con polaridades conocidas y a la vez diferentes: agua destilada desionizada (líquido polar) y diyodometano (líquido dispersivo no polar) (Tabla 3).

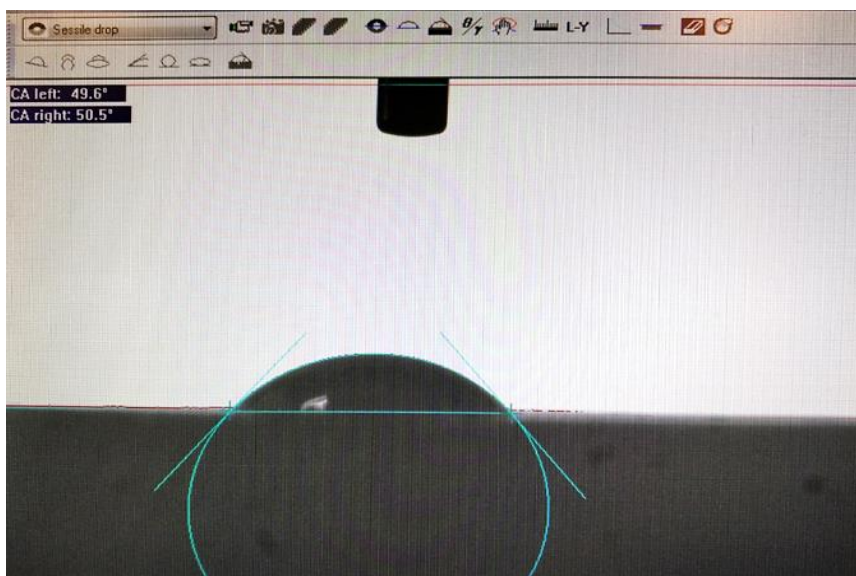


Figura 30. Medición del ángulo derecho e izquierdo que forma la gota sésil con la superficie.

	Componente polar γ_L^p (mN/m)	Componente dispersiva γ_L^d (mN/m)	Tensión superficial γ_L (mN/m)
Agua destilada	51,0	21,8	72,8
Diyodometano	0	50,8	50,8

Tabla 3. Valores de componente polar, dispersiva y tensión superficial de los líquidos empleados.

Las muestras se colocaron sobre el posicionador y se dispensaron tres gotas de 1 μl de agua y a continuación tres gotas de diyodometano. Se esperó cinco segundos antes de cada medición para la estabilización de la gota en la superficie. Se calculó el ángulo de contacto que formaba la zona izquierda y derecha de la gota con respecto a la superficie y en base a esas mediciones se obtuvo el ángulo de contacto promedio para cada material según el líquido empleado utilizando el método de Young-Laplace.²⁸¹ Las medidas se expresaron en forma de media y desviación estándar en base a 6 mediciones por disco y líquido experimental. Se calculó la energía libre de superficie de ambas muestras con el modelo Owens Wendt Rabel Kaebel (OWRK).²⁸²⁻²⁸⁴ La fórmula empleada fue la siguiente:

$$\frac{(\cos \theta + 1) \gamma_{\text{gas/liquid}}}{2\sqrt{\gamma^d_{\text{gas/liquid}}}} = \sqrt{\gamma^d_{\text{gas/solid}}} + \frac{\sqrt{\gamma^p_{\text{gas/liquid}}}}{\sqrt{\gamma^d_{\text{gas/liquid}}}} \sqrt{\gamma^p_{\text{gas/solid}}}$$

En esta ecuación “ θ ” es el ángulo de contacto medio obtenido para cada uno de los líquidos (agua y diyodometano); $\gamma_{\text{gas/liquid}}$ es la energía superficial del líquido;

$\gamma_{\text{gas/solid}}$ es la energía superficial del sólido; los superíndices d y p hacen referencia a los componentes dispersivo y polar respectivamente.

La comparación entre medias se realizó empleando el software IBM SPSS Statistics 24.0 (International Business Machines Corp; Nueva York, Estados Unidos). Se realizó el test Shapiro-Wilk para comprobar la existencia de normalidad en las variables. Se comprobó la homogeneidad de varianzas con el test de Levene. Se calculó la t de student para comparación de la humectabilidad de ambos materiales con un nivel de significación $p < 0,05$. Se calculó la magnitud del efecto de las diferencias estadísticamente significativas a través de d de Cohen. Para la d de Cohen se estableció un tamaño de efecto pequeño para valores $d < 0,5$, efecto mediano para valores entre $0,5$ y $0,8$; y tamaño de efecto grande para valores superiores a $0,8$.

5.2.2 Cultivo celular

El cultivo celular de los fibroblastos se llevó a cabo en cabina de flujo laminar, en la que previamente se realizó limpieza con etanol al 70% de la superficie de trabajo, de las manos del operador y del material que fuera a ser utilizado dentro de la cabina.

Tras la descongelación de las células del criotubo en baño termostatzado durante uno o dos minutos, se diluyeron los 2 ml de volumen celular en 8 ml de medio completo ya dispensado en un falcon de 15 ml y así obtener un volumen total de 10 ml. Posteriormente se procedió a la separación gravimétrica de la masa celular mediante centrífuga a 300 RCF durante cinco minutos. De esta forma es posible desechar el sobrenadante con los restos de DMSO.

A continuación, se resuspendió el pellet celular en 2 ml de medio completo. Previo a la siembra, se realizó recuento celular con azul de Tripán y cámara de recuento celular de Neubauer (Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Alemania) que pueden verse en la figura 31. Se trata de un portaobjetos con una ranura central en la que se coloca el volumen celular a cuantificar. Grabada sobre la superficie de la ranura, hay una cuadrícula que sirve de guía. El conteo se realizó en el microscopio de contraste de fases y a partir de la cifra que se obtuvo, fue posible obtener la densidad celular del volumen total a sembrar. Para el desarrollo de esta parte del estudio, se emplearon células de pases tres al nueve.



Figura 31. Materiales empleados para el recuento celular: azul de tripán, tubo de microcentrífuga y cámara de Neubauer.

Una vez realizada la media del recuento celular, se ajustó la concentración del cultivo a 5×10^5 células/ml en cada uno de los dos frascos T75 empleados, con 9 ml de medio completo cada uno a los que se incorporó 1 ml de volumen celular ya resuspendido y así se obtuvo un volumen total de 10 ml en cada frasco.

Tras cada siembra y posterior reposo en incubador de CO_2 de 2-3 horas, se verificó la adhesión inicial visualizado en microscopio invertido de contraste de fases.

Los cambios de medio de cultivo se realizaron cada 48 horas hasta alcanzar una confluencia del 90%, generalmente al cabo de siete días. Llegado este momento, se procedió al subcultivo o pasaje celular en el que se retiró el medio de cultivo, se lavó con DPBS al 1x, se retiró el DPBS y se procedió a la tripsinización. Este procedimiento se realizó con tripsina al 0,25% (enzima proteolítica que disgrega las proteínas que mantienen unidas las células al frasco de cultivo y se lleva a cabo para realizar subcultivo a otro frasco de cultivo o congelación).

Pasados cinco minutos de la aplicación de la tripsina se procedió a inhibir su actividad con DPBS al 1x para cada frasco T75. A continuación, se recogió el contenido del frasco en un falcon de 15 ml para su centrifuga, resuspensión en medio de cultivo y posterior siembra sobre la superficie de los discos de experimentación. El resto de volumen celular no cultivado se congeló de forma lenta y escalada para evitar la formación de cristales intracelulares que pudieran dañar las células, primero en refrigerador a 4°C , luego en congelador a -20°C y finalmente en ultracongelador a -80°C . Pasadas 24 horas se introdujeron en tanque de nitrógeno líquido a -196°C .

5.2.3 Estudio citomorfométrico y de cubrimiento celular de los discos.

5.2.3.1 Distribución de grupos de estudio

Se cultivaron fibroblastos gingivales humanos (HGFs) sobre la superficie de los discos de ambos tipos de cerámicas para evaluar la influencia de la superficie del disco sobre el comportamiento celular. En este estudio se realizó un análisis morfológico y morfométrico celular mediante inmunofluorescencia directa con fluorocromos en microscopio confocal.

A continuación, se muestra la distribución de los grupos de estudio experimental:

1. Grupo Control: Fibroblastos Humanos Gingivales (HGFs) cultivados en mini placas de Petri de poliestireno.
2. Grupo Y-TZP: HGFs cultivados sobre discos de circonia parcialmente estabilizada con itrio.
3. Grupo ZLS: HGFs cultivados sobre discos de silicato de litio reforzado con circonia.

5.2.3.2 Siembra celular

Se comenzó a sembrar en los discos a partir del tercer subcultivo o pase celular. En primer lugar, se procedió a limpieza de los discos mediante inmersión en etanol absoluto y esterilización con exposición a rayos UV-C (~254 nm) durante 30 minutos por ambas caras dentro de la cabina de flujo laminar. Finalmente se colocaron pegados en su base a una mini placa de Petri estéril antes de realizar el experimento. Se emplearon dos discos de cada material en cada experimento, el cual se repitió cuatro veces.

Los fibroblastos se cultivaron en los discos a una concentración previamente calculada de 1×10^4 células en 40 μ l de volumen de medio de cultivo por cada disco. Tras la comprobación de la correcta adhesión inicial en los discos control con microscopio, se rellenaron las placas de Petri con medio completo de cultivo. Se realizó cuidadosamente con pipeta, rellenando hasta el mismo nivel de la superficie de los discos. Los cultivos se mantuvieron en un incubador durante 24 horas antes de su tinción inmunocitoquímica.

5.2.3.3 Inmunofluorescencia directa

Esta técnica se basa en la tinción inmunocitoquímica empleando un único anticuerpo específico marcado con un fluorocromo (tinción fluorescente) y unido de forma directa a un antígeno. En este estudio se realizó inmunofluorescencia múltiple de forma a identificar diferentes estructuras celulares en una misma muestra en el microscopio confocal.

En nuestro estudio se analizó el núcleo y el citoesqueleto celular en células previamente fijadas. En el caso del núcleo celular, la tinción o fluorocromo empleado fue DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) (Vectashield, Vector Laboratories Inc., California, Estados Unidos) el cual tiene afinidad por las regiones enriquecidas en Adenina y Timina en secuencias del ADN, siendo un buen marcador nuclear. Para la identificación del citoesqueleto se empleó un fluorocromo llamado faloidina, Acti-stain 488 Fluorescent Phalloidin (Cytoskeleton, Inc., Denver, Colorado, Estados Unidos). Se trata de una micotoxina que tiene una elevada afinidad por la actina polimérica (Actina F) del citoesqueleto celular eucariota.

Ambas tinciones tienen la propiedad de emitir luz fluorescente cuando se les excita con láser de argón. Cada fluorocromo tiene un espectro de excitación-emisión, en la tabla 4 se muestran los fluorocromos empleados en este estudio.

Fluorocromo	Longitudes de onda		Color de luz emitida
	Excitación (nm)	Emisión (nm)	
DAPI	360	460	Azul
Faloidina	485	535	Verde

Tabla 4. Fluorocromos empleados en la tinción de las muestras.

5.2.3.4 Metodología de tinción celular

Pasadas 24 horas de cultivo celular en los discos, se procedió a retirar el medio de cultivo y se hicieron dos lavados con 500 µl de DPBS previa a la aplicación de la fijación de la estructura celular con 15 µl de paraformaldehído al 4% en DPBS (AppliChem GmbH, Darmstadt, Alemania) durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se aspiró el producto y se volvieron a hacer lavados con DPBS. Posteriormente se procedió a la permeabilización de la membrana extracelular para permitir el paso de los fluorocromos a través de ella, aplicando 15 µl de Tritón X-100 0,1% en DPBS (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos) durante cinco minutos. A continuación, se procedió a aspirar el Tritón y de nuevo varios lavados con DPBS para continuar con el bloqueo celular con albúmina bovina sérica (BSA) al 1%.

Material y Método

Con este procedimiento se pretende reducir el marcaje inespecífico de otras estructuras celulares. En nuestro estudio se empleó 15 μ l de BSA al 1% (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos) durante 20 minutos.

Posteriormente, se retiró el producto y se procedió a la aplicación de las tinciones comenzando con faloidina reconstituida primero con metanol puro y posteriormente en DPBS para hacer una solución de trabajo. Se incubaron 15 μ l de faloidina/disco durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

Se lavó con DPBS tres veces y luego se incubó 15 μ l/disco de DAPI, el cual viene incorporado en el medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, California, Estados Unidos) (figura 32).

Se eliminó el sobrante con papel de filtro y se colocó encima el cubreobjetos circular Menzel-Gläser de 8 mm de diámetro (Menzel GmbH, Braunschweig, Alemania). A continuación, los discos cerámicos se despegaron de la placa de Petri y se pegaron por pares en un portaobjetos Menzel-Gräser (Menzel GmbH, Braunschweig, Alemania). Por otro lado, se recortaron los bordes de las mini placas de Petri empleadas como control y así obtener discos de poliestireno para su visualización en microscopio confocal. Las muestras fueron conservadas a 4°C en la oscuridad y pasadas 24 horas se sellaron los bordes del cubreobjetos con esmalte de uñas transparente antes de visualizarlas al microscopio.



Figura 32. Fluorocromos faloidina (izquierda) y DAPI (derecha).

5.2.3.5 Microscopía Confocal

Las muestras se observaron con el microscopio confocal Zeiss LSM 7 DUO (Carl Zeiss, Jena, Alemania) con una unidad de epifluorescencia Excite 120PC, el cual se puede observar en la figura 33. De acuerdo con los parámetros recomendados por el fabricante, las imágenes se obtuvieron empleando el filtro de excitación FITC a 488 nm y recogiendo la emisión a 535 nm (para la visualización del citoesqueleto). Para la visualización de los núcleos se empleó el filtro de excitación DAPI a 355nm recogiendo la emisión a 458 nm. Se utilizó un software de análisis de imágenes ZenLite 2012. Se emplearon dos objetivos Plan-Apochromat de 20x/0,8 y 40x/1,30 Oil DIC (*Differential Interference Contrast*). Ninguna muestra se expuso al láser un tiempo mayor a cinco minutos para evitar fotoblanqueamiento o destrucción fotoquímica de fluorocromo por tiempo de exposición excesivo.

Las imágenes se tomaron en cinco regiones de interés (RDI) en cada disco (noroeste, noreste, centro, sudoeste y sudeste) (figura 34). El área ($A = \pi r^2$) de cada RDI es de 6,28 mm², siendo el área total analizada de 31,4 mm²/disco.



Figura 33. Microscopio confocal Zeiss LSM 7 DUO.



Figura 34. Figura esquemática de las cinco RDI en las muestras.

5.2.3.6 Procesamiento de imágenes: ImageJ y Cell Profiler

Se obtuvieron imágenes de 2048x2048 píxeles a 8-bit, las cuales se guardaron en formato .tif para posteriormente analizarlas con el programa ImageJ v1.50e (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Estados Unidos) (figura 35).

Con las imágenes a objetivo 20x se analizó el número de células, con las de 40x se analizó la morfología celular y se midió el eje mayor del citoesqueleto celular.

Se calibró a μm cada una de las imágenes antes de procesarlas. Para el conteo celular, se separaron los canales RGB (rojo, verde y azul) de la imagen original a 20x. Tomando la imagen “blue” se estableció un umbral automático, el cual identificó los núcleos celulares a partir de la creación de una imagen binaria (*Image* \rightarrow *Adjust* \rightarrow *Threshold* \rightarrow *Auto*). Se aplicó el comando *Process* \rightarrow *Binary* \rightarrow *Watershed* para separar los posibles núcleos unidos y que el programa los detectase de forma independiente. Por último, se aplicó el comando *Analyse* \rightarrow *Analyze Particles* en el que el tamaño mínimo de un núcleo a ser detectado se estableció en $5 \mu\text{m}^2$.

- Parámetros celulares analizados con ImageJ
 - Número de células (*Count*)
 - Tamaño medio del núcleo (*Nuclear size*)
 - Circularidad del núcleo (*Circularity*)
 - Longitud media del eje principal del citoesqueleto (*Cytoskeletal length*).

La circularidad es un parámetro adimensional por lo que no tiene unidades de medida. El valor de circularidad del núcleo oscila entre 0 y 1. Valores más próximos a 0 se interpretan como formas alargadas; por otro lado, el valor de 1 se interpreta como un círculo perfecto.²⁸⁵

Se basa en la siguiente fórmula:
$$\text{Circularidad} = 4\pi \frac{\text{área}}{\text{perímetro}}$$

En el caso de la medición de la longitud del citoesqueleto, tras la calibración de la imagen a μm , se realizó una selección lineal del diámetro mayor del citoesqueleto de tres células escogidas aleatoriamente en cada una de las fotos a 40x. La variable *length* aparece representada como la longitud en μm .

- Parámetros celulares analizados con Cell Profiler

Debido a la gran densidad y solapamiento celular en la imagen no se consiguió realizar una segmentación adecuada con el software ImageJ, por lo que la delimitación y segmentación del citoplasma celular se llevó a cabo con el software de código abierto CellProfiler Ver. 3.1.8 (Carpenter Lab, Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, Massachusetts, Estados Unidos). En nuestro caso, para la segmentación de núcleo y citoplasma se emplearon los siguientes módulos del programa:

- IdentifyPrimaryObjects*: identificación de los núcleos celulares.
- IdentifySecondaryObjects*: identificación del citoplasma celular.
- IdentifyTertiaryObjects*: identificación del citoplasma celular con la zona nuclear sustraída de la imagen.
- MeasureObjectSizeShape*: elección de las variables a medir en el elemento seleccionado (en nuestro caso el citoplasma), que fueron: *Area*, *Perimeter* y *FormFactor*. El valor de *FormFactor* se obtiene a partir de la misma fórmula que la circularidad en el ImageJ para así saber cómo de alargados son los fibroblastos cultivados sobre cada una de las muestras.
- MeasureImageAreaOccupied*: muestra el área ocupada por el elemento seleccionado con respecto a la imagen total.
 - Área celular media (*Area*)
 - Perímetro celular medio (*Perimeter*): parámetro obtenido a partir del número de píxeles alrededor de los límites de cada elemento en la imagen, convertido este valor posteriormente a micras.
 - Factor de forma celular (*Form Factor*) también se basa en la misma fórmula que la circularidad, siendo también un parámetro adimensional cuyos valores oscilan entre 0 y 1. Cuanto menor sea este valor, más fusiforme es el fenotipo celular.
 - Área media ocupada por las células en el disco (% *Occupied Area*) en base 5 zonas de medición.

La morfología celular se basó en la visualización de las imágenes SEM.

Los parámetros celulares analizados vienen expresados en valores de media \pm desviación estándar para las imágenes observadas en cada una de las variables.

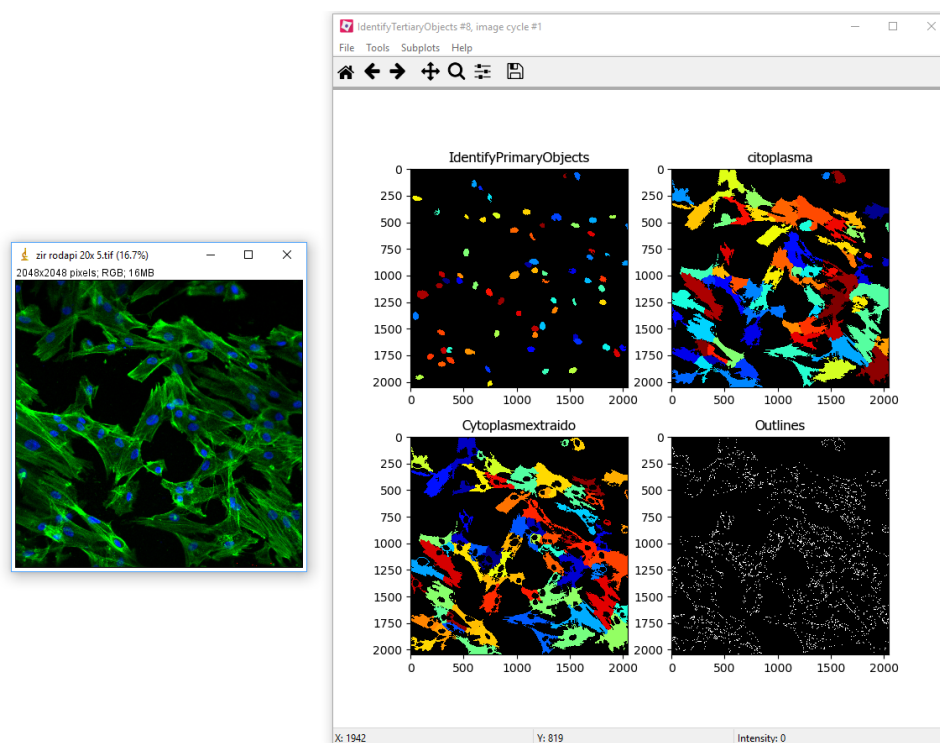


Figura 35. Proceso de segmentación de la imagen para obtener área, perímetro, factor de forma celular y área ocupada por las células en el disco.

5.2.3.7 Análisis estadístico del estudio citomorfométrico y de cubrimiento del disco.

La comparación de los tres grupos para cada una de las variables analizadas se realizó empleando el software IBM SPSS Statistics 24.0 (International Business Machines Corp; Nueva York, Estados Unidos). Se realizó el test Shapiro-Wilk para comprobar la existencia de normalidad en las variables. Se comprobó la homogeneidad de varianzas con el test de Levene. Se empleó la prueba de varianza ANOVA para aquellas variables con normalidad y la prueba de Kruskal-Wallis para aquellas que no siguen una distribución normal. Las comparaciones múltiples se realizaron con la prueba de Bonferroni. Se estableció un nivel de significancia estadística del 5% ($p < 0,05$). Los índices de varianza empleados fueron omega cuadrado (ω^2) y épsilon cuadrado (ϵ^2) para explicar la asociación entre el tipo de material y el parámetro celular analizado en las variables estudiadas con ANOVA y Kruskal-Wallis respectivamente. Se calculó la magnitud del efecto en las comparaciones post hoc estadísticamente significativas a través de la d de cohen en las variables con normalidad y la r de Rosenthal en las variables que no siguen una distribución normal. Para la d de Cohen se estableció un tamaño de efecto pequeño para valores $d < 0,5$, efecto mediano para valores entre 0,5 y 0,8; y tamaño de efecto grande para valores superiores a 0,8. En el caso de la r de Rosenthal se estableció un tamaño de efecto pequeño para valores r a partir de 0,1, efecto mediano para valores a partir de 0,3; y tamaño de efecto grande para valores a partir de 0,5.

5.2.4 Estudio de citotoxicidad del material

La organización internacional para la estandarización ISO (*International Organization for Standardization*) es una federación a nivel mundial en la que organizaciones internacionales y organismos gubernamentales colaboran con los cuerpos de estandarización nacionales para llevar a cabo diferentes comités técnicos de diversas ramas, principalmente estándares internacionales.

El siguiente estudio se realizó de acuerdo con la norma ISO 10993-5:2009 de Evaluación biológica de dispositivos médicos parte 5: test de citotoxicidad *in vitro*.⁹⁷ Es importante que este tipo de estudios se lleve a cabo bajo protocolos estandarizados que permitan la reproductibilidad de los trabajos realizados y, por lo tanto, poder hacer comparaciones objetivas entre distintos estudios realizados.

Existen tres tipos de estudios de citotoxicidad *in vitro*: con extractos, por contacto directo y por contacto indirecto con el material de estudio. En nuestro caso se optó por el análisis por contacto directo, en el que se cultivaron células sobre los discos de experimentación sobre los que posteriormente se realizó el estudio de viabilidad celular sobre el que se establece la posible citotoxicidad del material estudiado.

5.2.4.1 Material empleado

Para la realización de este estudio se emplearon los siguientes materiales:

- Frascos de 175 cm² para el cultivo celular.
- Placas de 48 pocillos Nunclon Delta Surface (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 ml (Deltalab, Rubí, Barcelona).
- Placas de 96 pocillos Biolite (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).
- Tubos de microcentrífuga de 5 ml (Deltalab, Rubí, Barcelona).
- MTT Assay Kit Cell Proliferation ab211091 (Abcam, Cambridge, Reino Unido).
- Medio de cultivo DMEM completo para el crecimiento celular en frascos.
- Medio de cultivo MEM (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos) sin suero fetal bovino ni rojo fenol (para evitar el solapamiento de espectros de absorción del rojo fenol ni proteínas séricas con el MTT).
- L-Glutamina 100x, 200nM (Biowest, Nuaille, Francia).
- Tripsina/EDTA.
- DPBS 1x (Biowest, Nuaille, Francia).
- Muestras de estudio: discos cerámicos de Y-TZP y ZLS.
- Control: células cultivadas sobre placas de 48 pocillos.

- Blanco: medio de cultivo que no contiene disco de muestra. Con el blanco se pretende evaluar la lectura de fondo para sustraerla a la lectura de las muestras.
- Agitador de placas PHMT Thermo-Shaker (Grant Instruments, Shepreth, Cambridge, Reino Unido).
- Lector de placas Synergy HT (Biotek, Winooski, Vermont, Estados Unidos).

5.2.4.2 Preparación de las muestras

Se emplearon cuatro discos de cada uno de los materiales cerámicos para cada uno de los tramos de tiempo analizados (24, 48 y 72 horas). Como controles se emplearon cuatro pocillos de las placas de 48 pocillos para cada uno de los tramos analizados.

Los discos se limpiaron con inmersión en etanol puro y posteriormente se esterilizaron con exposición a rayos UV-C durante 30 minutos por cada lado dentro de la cabina de flujo laminar antes de su colocación en placas de 48 pocillos.

5.2.4.3 Mantenimiento de la línea celular

Los fibroblastos se preservaron en medio de cultivo DMEM completo suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de glutamina-penicilina-estreptomicina por cada 500ml de medio de cultivo. La norma ISO empleada aconseja comenzar el experimento una vez alcanzado el 80% de confluencia celular. Las células fueron usadas entre el 2º y 8º pase celular.

5.2.4.4 Cultivo de las células sobre los discos

Las células cultivadas en los frascos T75 se tripsinizaron con tripsina/EDTA al 1x y la suspensión se centrifugó a 200 g durante tres minutos. A continuación, se resuspendieron en medio MEM (sin suplementos ni rojo fenol) y se ajustó la densidad celular a 1×10^5 células/disco en un volumen previamente calculado de 300 microlitros.

Se utilizaron tubos de centrifuga de 1,5 ml de polipropileno a modo de pocillos contenedores del cultivo celular. Los tubos se cortaron por la punta, insertando los discos por la boca del tubo tal y como se muestra en la figura 36 y a su vez se colocaron dentro de los pocillos de la placa de 48.

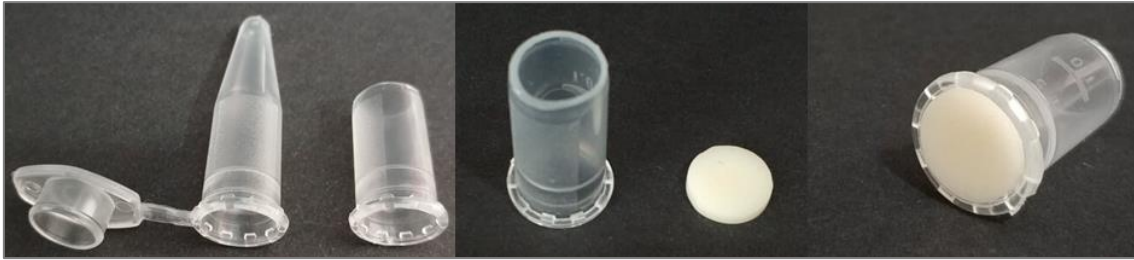


Figura 36. Corte de la punta del tubo de microcentrifuga, se inserta el disco en la boquilla empleándolo a modo de pocillo.

Para el cultivo de los controles, se emplearon tres placas de 48 pocillos de base plana, una por cada tramo de tiempo analizado (24, 28 y 72 horas). Sobre la base de cuatro pocillos de cada una de las placas se cultivaron a modo de control 1×10^5 células en un volumen de 300 microlitros. Se emplearon cuatro pocillos como blancos con medio MEM sin discos de muestra. La distribución de las muestras en la placa se puede observar en la figura 37.

Se incubó durante un periodo de 24 horas en un incubador de CO_2 para permitir la adhesión y esparcimiento celular antes de realizar el ensayo de citotoxicidad.

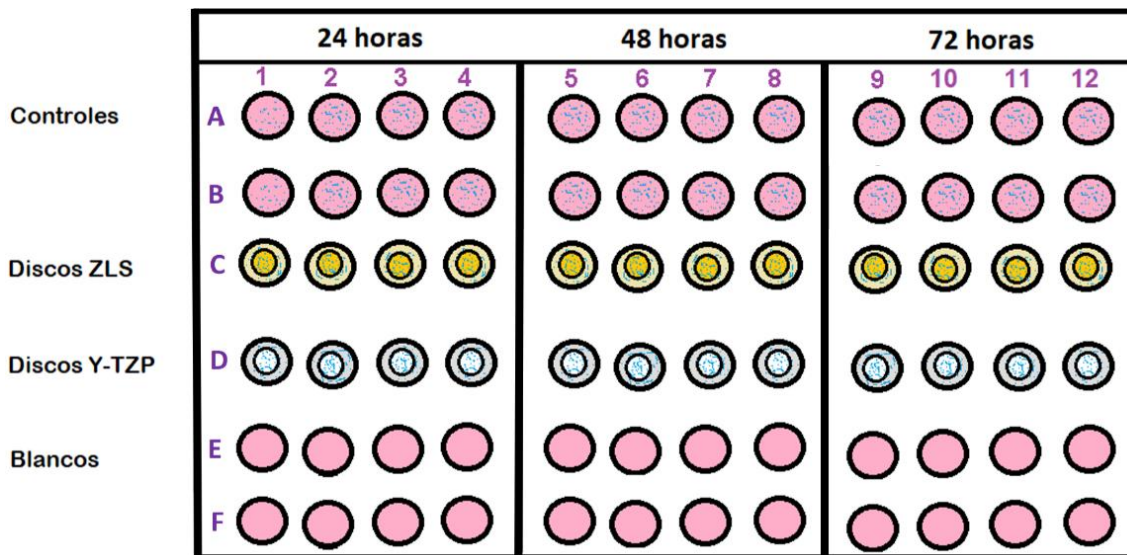


Figura 37. Esquema de la disposición de las muestras, controles y blancos en la placa de 48 pocillos.

Fundamentos de citotoxicidad

El test MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliobromido) es una prueba colorimétrica que permite evaluar la viabilidad de las células, metabólicamente activas, a través del metabolismo mitocondrial. Se basa en la capacidad de reducción del MTT por parte del enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial en formazán insoluble. El precipitado de formazán queda retenido en el interior de las células y se libera al medio a través de su solubilización en alcohol. De esta forma su densidad óptica puede ser leída en un espectrofotómetro. Se trata de una prueba colorimétrica ya que el MTT pasa de color amarillo en su forma de sal soluble a color púrpura en forma de formazán.²⁸⁶

El número de células viables se correlaciona con la intensidad del color y por lo tanto con la integridad de las mitocondrias capaces de reducir el MTT. A mayor intensidad del color púrpura, mayor cantidad de células viables con metabolismo activo.

5.2.4.5 Ensayo de reducción del MTT

El primer ensayo MTT se realizó a las 24 horas, tras el periodo de incubación. El resto de las placas se fueron evaluando de forma secuencial. En primer lugar, se comprobó que el cultivo celular estaba en condiciones adecuadas al observar los controles al microscopio invertido. Se prepararon los dos reactivos del kit: el MTT y el disolvente del MTT, ambos almacenados a -20°C . Ambos se atemperaron y se prepararon alícuotas de 5 ml de MTT y alícuotas de 15 ml del disolvente (figura 38).



Figura 38. Placas de 48 y 96 pocillos (izda.), reactivos usados en el ensayo de citotoxicidad (dcha.).

A continuación, se aspiró el medio y se añadió un volumen de 100 μl del MTT y 100 μl de MEM en cada uno de los pocillos de la placa. Posteriormente se dejó durante tres minutos en el agitador orbital a 360 RPM para la mezcla de ambos compuestos. Luego se conservó en oscuridad en incubador de CO_2 durante tres horas para la reacción de reducción del MTT y para ello se envolvieron las placas en papel de aluminio. Pasado este tiempo ya se había formado el precipitado de cristales de formazán (púrpura) como se comprobó al observar los controles en el microscopio invertido. Se procedió a añadir 300 μl de disolvente de MTT en cada pocillo. De nuevo se envolvió la placa en papel de aluminio y se procedió a la agitación en mesa orbital durante 15 minutos. El volumen final en cada pocillo fue de 500 microlitros. Se recogió un volumen de 250 μl de cada pocillo y se añadió a cada uno de los pocillos de una placa de 96, en la que la disposición de los discos, controles y blancos fue similar para evitar errores. Por último, se procedió a la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro del lector de placas a 590 nm.

El espectrofotómetro es un aparato que, a través de una lámpara flash de xenón y un monocromador, mide la cantidad de luz transmitida a través de los pocillos de la muestra (figura 39). El monocromador presenta un rango de 200 a 999 nm (con incrementos de 1 nm). La lectura de la absorbancia se realiza en unidades de densidad óptica (OD) en rango de 0 a 4 OD. La densidad óptica es la medida de la relación entre la luz transmitida o reflejada y la luz incidente sobre una muestra.²⁸⁷ A mayor absorbancia, mayor es la concentración de formazán producido por las células metabólicamente activas y por lo tanto mayor es la viabilidad celular.

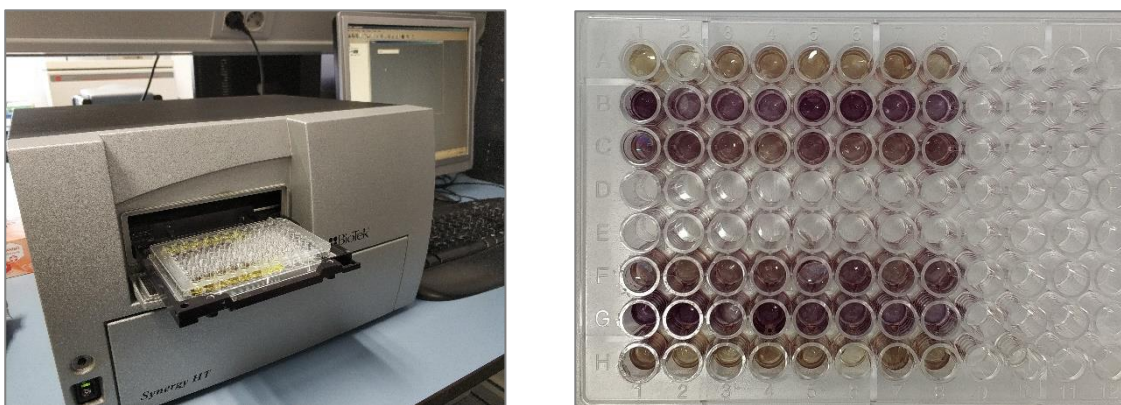


Figura 39. Lector de placas empleado en el estudio de la viabilidad celular (izda.). Gradación en la intensidad del color del reactivo de acuerdo con la viabilidad celular (dcha.).

A continuación, se muestra un esquema representativo de los pasos realizados en este estudio (figura 40).

Material y Método

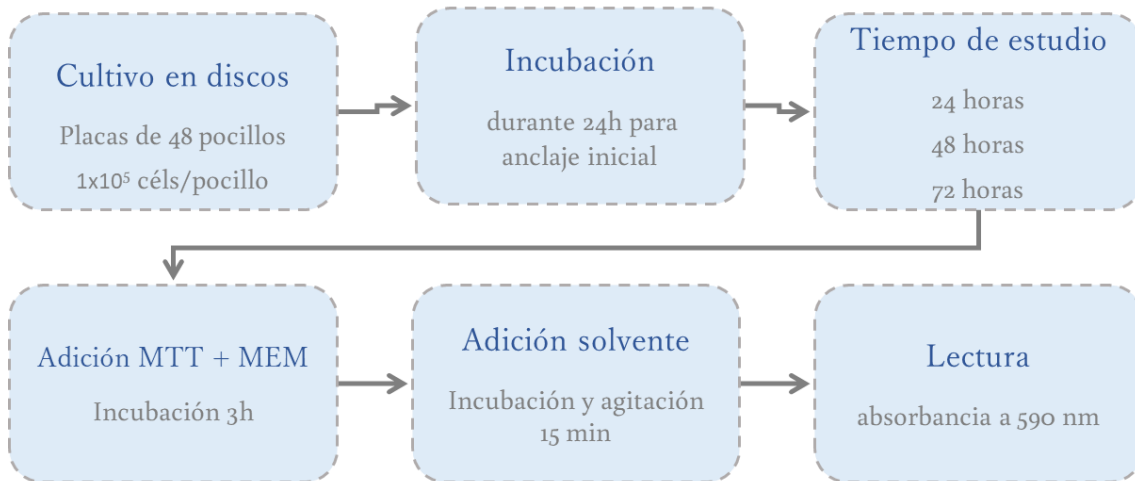


Figura 40. Esquema del protocolo llevado a cabo para la medición de citotoxicidad de los discos.

5.2.4.6 Recopilación y procesamiento de los datos

El programa asociado al espectrofotómetro es el Gen5 1,11 (Biotek, Winooski, Vermont, Estados Unidos), en el que se aplicaron los siguientes comandos: Read a plate → Procedure-Synergy (Com1) → Plate type: 96 → Add step → Read; Detection method → Absorbance; Wavelengths → 590 nm; Full plate → selección de los pocillos con muestra (A1-H8) → OK

Los resultados fueron exportados a un archivo excel, a continuación, se plasmaron los datos en una tabla de excel en el que se obtuvo la media de los valores de densidad óptica para así poder obtener los valores de viabilidad celular y poder interpretar la citotoxicidad de los materiales. Por otro lado, fue necesario sustraer la absorbancia obtenida en los blancos al resto de valores de absorbancia media obtenidos en las muestras y controles para obtener valores normalizados de absorbancia.

Para obtener los resultados de viabilidad celular en forma de porcentaje, es necesario dividir la absorbancia promedio normalizada de cada muestra entre la absorbancia promedio normalizada del control y multiplicarlo por 100. Lo anteriormente explicado se resume en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Viabilidad} = \frac{\text{Promedio del Tratamiento} - \text{Promedio del Blanco}}{\text{Promedio del Control Negativo} - \text{Promedio del Blanco}} \times 100$$

Al control se le otorgó un valor de viabilidad del 100%, obteniendo la tasa de viabilidad de las muestras estudiadas a partir de la absorbancia del control. Los valores obtenidos reflejan el porcentaje de los fibroblastos viables en cada una de las muestras en relación a los fibroblastos cultivados en el control. De acuerdo con la norma ISO empleada, si las muestras obtienen una tasa de viabilidad < 70%, tendrá

un potencial citotóxico.⁹⁷ Cuanto menor es el valor de porcentaje de viabilidad, mayor es el potencial citotóxico del material estudiado.

Los datos se presentaron en forma de valores de media \pm desviación estándar del experimento que se llevó a cabo por duplicado.

5.2.4.7 Análisis estadístico

La comparación de los tres grupos para cada una de las variables analizadas se realizó empleando el software IBM SPSS Statistics 24.0 (International Business Machines Corp; New York, Estados Unidos). Se realizó el test Shapiro-Wilk para comprobar la existencia de normalidad en las variables. Se comprobó la homogeneidad de varianzas con el test de Levene. Se empleó la prueba de varianza ANOVA para la comparación de medias entre los grupos. Las comparaciones múltiples se realizaron con la prueba de Bonferroni en los casos de igualdad de varianzas y con la prueba de Games-Howell en el caso de heterocedasticidad. Se estableció un nivel de significancia estadística del 5% ($p < 0,05$). El índice de varianza empleado fue omega cuadrado (ω^2) para explicar la asociación entre el tipo de material y el parámetro celular analizado en las variables estudiadas con ANOVA. Se calculó la magnitud del efecto en las comparaciones post hoc estadísticamente significativas a través de la d de cohen. Se estableció un tamaño de efecto pequeño para valores $d < 0,5$, efecto mediano para valores entre 0,5 y 0,8; y tamaño de efecto grande para valores superiores a 0,8.

5.2.5 Estudio de secreción de colágeno tipo I

La medición de la actividad celular se realizó a través de la cuantificación de la secreción de colágeno tipo I secretado al medio por parte de los fibroblastos a través de un kit de ensayo tipo ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*).

Se llevó a cabo la técnica ELISA en sándwich de doble anticuerpo a través de la cual se detecta la unión de un antígeno (colágeno liberado al medio de cultivo) a dos anticuerpos primarios: un anticuerpo monoclonal de captación y un anticuerpo policlonal de detección. Esta técnica tiene una elevada sensibilidad y una adecuada amplificación de la señal a detectar.

Los pocillos de la placa del kit vienen recubiertos en su base con un primer anticuerpo de captación. En los pocillos se aplica la muestra en la que se encuentra el antígeno que será captada por dicho anticuerpo. A continuación, se lava el exceso de antígeno no retenido, se aplica una segunda solución con el anticuerpo primario de detección unido a un complejo de biotina que también se une al antígeno y lo marca. Se hace un lavado para eliminar los anticuerpos no adheridos y se aplica un anticuerpo secundario.

Material y Método

Es muy importante que el anticuerpo secundario sea específico únicamente para el anticuerpo primario de detección y no para el anticuerpo de captación y es por ello por lo que generalmente se elige al anticuerpo de captación y al primario de distintas especies. Además, es importante que ambos anticuerpos primarios tengan afinidad por epítopes diferentes del antígeno y no se solapen. En nuestro caso, el anticuerpo de captación es de origen de ratón y el anticuerpo de detección es de origen de conejo. El patrón es la proteína completa de colágeno de origen humano a partir de la cual se harán diluciones con una concentración exacta y conocida de la proteína para así poder calcular la concentración de colágeno en las muestras de estudio.

A la unión anticuerpo de captación-antígeno-anticuerpo de detección, se le añade un anticuerpo secundario unido a una enzima, que es la unión de Avidina-HRP. La Avidina es un anticuerpo secundario que va marcado con una enzima peroxidasa del rábano HRP (*Horseradish Peroxidase*).

A continuación, se lava nuevamente para eliminar los anticuerpos secundarios no unidos al anticuerpo primario de detección. Se hace un último lavado antes de comenzar la fase de detección en la que se aplica una solución de sustrato enzimático cromogénico 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina (TMB). Este sustrato contiene peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual se oxida en contacto con la peroxidasa, formando un precipitado de color azul, que cambia a amarillo bajo la acción de un ácido sulfúrico para detener la reacción y así medir el cambio de color mediante espectrofotometría. La medida de absorbancia de este cambio colorimétrico se interpreta en forma de concentración de colágeno tipo I. A mayor densidad óptica en la lectura, mayor será la concentración detectada. A continuación, se muestra un diagrama de la técnica ELISA empleada en este estudio (figura 41).

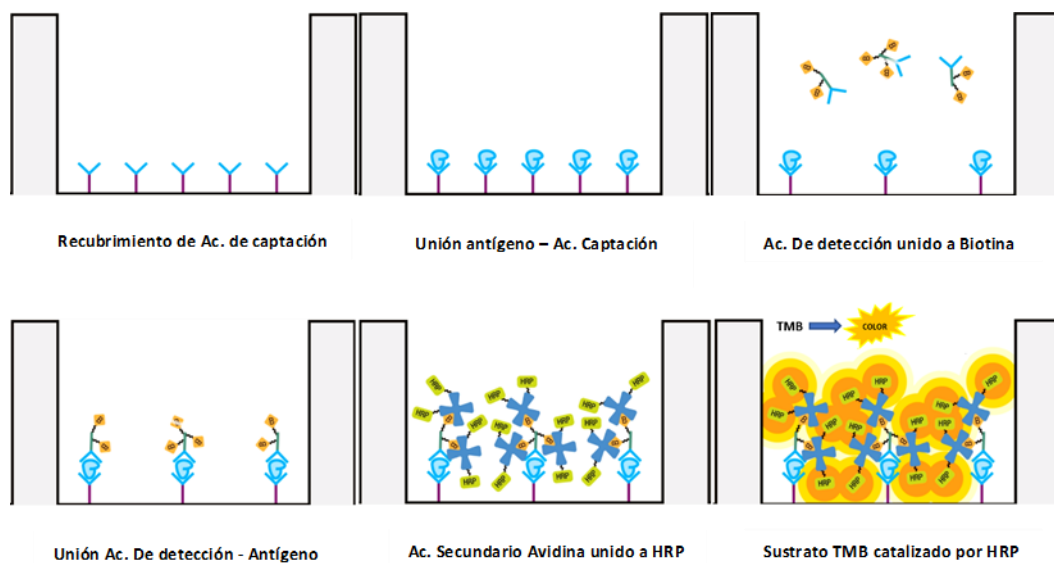


Figura 41. Secuencia de pasos en la técnica ELISA en sándwich.²⁸⁸

5.2.5.1 Material empleado

Para la realización de este estudio se emplearon los siguientes materiales:

- Frascos de 175 cm² para el cultivo celular.
- Tubos de microcentrifuga de 1,5 ml y 5 ml.
- Placas de 48 pocillos.
- Placas de 96 pocillos.
- Human Collagen Type I (COL1) ELISA Kit MyBioSource (San Diego, California, Estados Unidos) (figura 42).
- Medio de cultivo DMEM completo para el crecimiento celular en frascos.
- Medio de cultivo MEM sin suero fetal bovino (para evitar errores en la captación del colágeno por la presencia de proteínas del suero).
- L-Glutamina 100x, 200nM.
- DPBS al 1x.
- Muestras de estudio: discos cerámicos de Y-TZP y ZLS.
- Control: medio de cultivo MEM en pocillos de placas de 48.
- Blanco: pocillos con reactivos del color.
- Pipeta multicanal Gilson Inc. (Middleton, Wisconsin, Estados Unidos).
- Microcentrifuga Microfuge® 18 (Beckman Coulter, Indianapolis, Indiana, Estados Unidos).
- Lector de placas Synergy HT (Biotek, Winooski, Vermont, Estados Unidos).

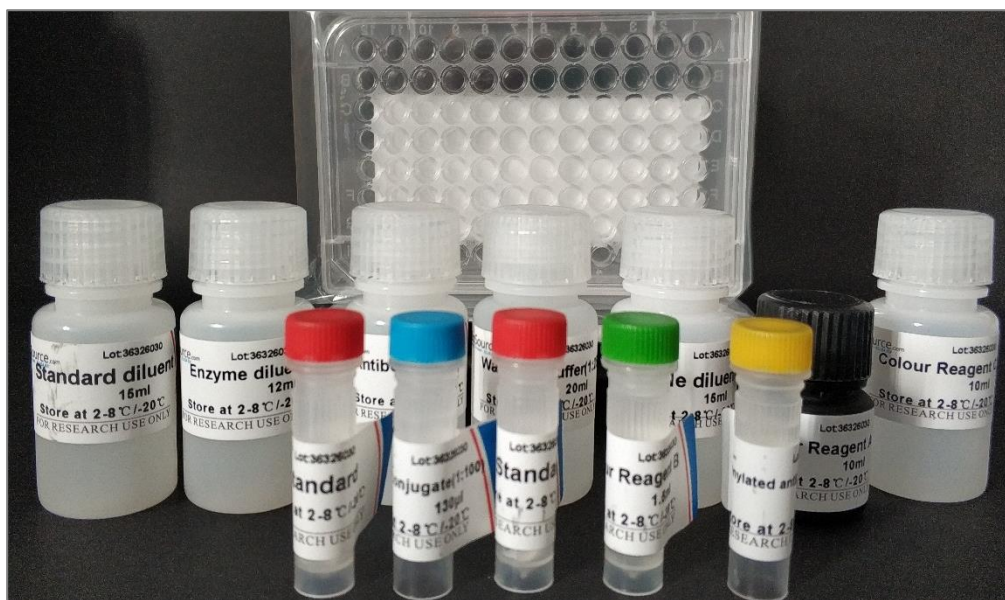


Figura 42. Kit ELISA para la detección de colágeno humano tipo I liberado al medio de cultivo.

5.2.5.2 Preparación de las muestras

Se emplearon cuatro discos de cada uno de los materiales cerámicos para cada uno de los tramos de tiempo analizados (24 y 72 horas). Como controles negativos, se emplearon cuatro pocillos de las placas de 48 pocillos para cada uno de los tramos analizados. El estudio se llevó a cabo por duplicado.

Los discos se limpiaron con inmersión en etanol puro y posteriormente se esterilizaron con exposición a rayos UV-C durante 30 minutos por ambos lados dentro de la cabina de flujo laminar antes de su colocación en placas de 48 pocillos (figura 43).

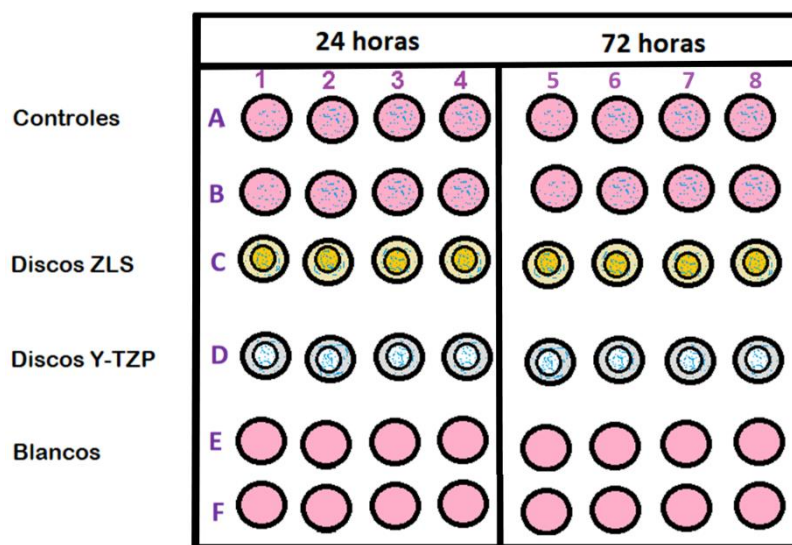


Figura 43. Esquema de la disposición de las muestras, controles y blancos en la placa de 48 pocillos.

5.2.5.3 Mantenimiento y siembra de la línea celular

Los fibroblastos se preservaron en medio de cultivo DMEM completo suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de glutamina-penicilina-estreptomicina por cada 500ml de medio de cultivo. Se emplearon células con pases del dos al cuatro para preservar la expresión del colágeno. Una vez alcanzado el 90% de confluencia celular, se tripsinizaron y cultivaron a una densidad 3×10^5 células/ml. Para que ningún componente del suero interfiriese con la captura del colágeno y evitar errores en la técnica ELISA, los fibroblastos se cultivaron en medio MEM sin suero fetal bovino. Se mantuvieron en incubador de CO_2 durante 24 horas para favorecer el asentamiento y esparcimiento celular antes de comenzar a cuantificar la secreción de colágeno en los tramos de tiempo establecidos.

5.2.5.4 Ensayo de técnica ELISA en sándwich

Pasado el tiempo de incubación, para cada tramo de tiempo estudiado –24 y 72 horas– se recogió el medio de cultivo en tubos de microcentrífuga, se centrifugó a 2000 RPM durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante. A continuación, se almacenaron las muestras a -20°C hasta su utilización.

Se atemperaron los reactivos del kit 20 minutos antes de su uso. En primer lugar, se diluyó la solución de lavado con agua bidestilada a una proporción 1:25. A continuación, se prepararon dos secuencias de patrones estándar para poder determinar la concentración de colágeno en las muestras.

Posteriormente, se añadió 1 ml de diluyente al patrón del colágeno humano COL1 para así obtener la primera dilución que es una solución stock de 40ng/ml. Se emplearon seis tubos de microcentrífuga para hacer diluciones seriadas a partir de la solución stock. En cada uno de los seis tubos se colocaron 300 µl del diluyente del estándar de la muestra y del tubo 1 de stock se pipetearon 300 µl al tubo 2, se mezcló bien y nuevamente se pipetearon 300 µl del tubo 2 al tubo 3, así sucesivamente hasta obtener la dilución 7 (figura 44). Se hizo un control negativo en el que únicamente se pipetearon 300 µl de diluyente del patrón de colágeno, quedando el volumen final de los tubos de la siguiente forma (Tabla 5):

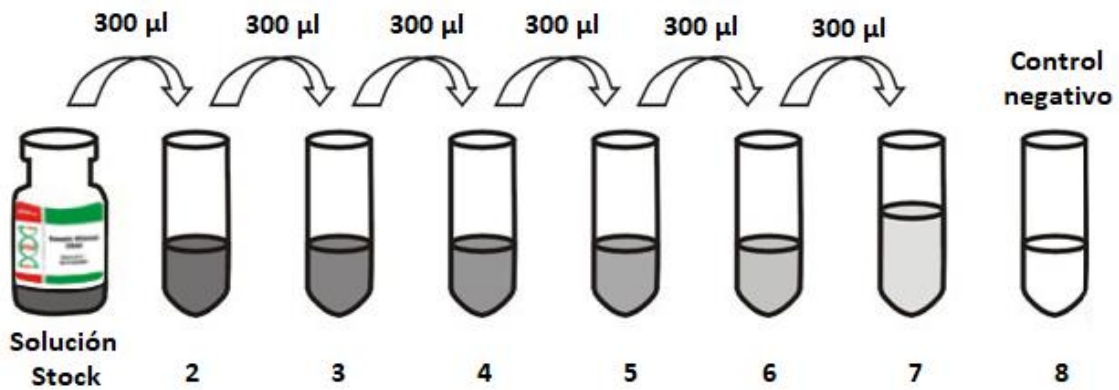


Figura 44. Esquema de la preparación de los patrones de colágeno y del control para test ELISA.

Diluciones	Concentración COL1		Volumen final (μ l)
	(ng/ml)	%	
Sol. stock	40	100	700
Dilución 2	20	50	300
Dilución 3	10	25	300
Dilución 4	5	12,5	300
Dilución 5	2,5	6,25	300
Dilución 6	1,25	3,125	300
Dilución 7	0,625	1,562	600
Control	--	--	300

Tabla 5. Concentración y volumen final de las diluciones seriadas para test ELISA.

Tras la preparación de los patrones de colágeno, se hizo la dilución previa del concentrado de anticuerpo de detección COL1 biotilado y del anticuerpo secundario unido a la enzima peroxidasa (complejo Avidina-HRP) para así obtener en ambos un volumen final 1:100. Además, se prepararon los reactivos del color para obtener un sustrato cromogénico (TMB).

Se atemperó la placa de 96 conservada a -20°C , así como las muestras congeladas de cultivo celular recogidas a las 24 y 72 horas. Dicha placa presenta pocillos recubiertos en su base por el anticuerpo de captación. Tras la adición de cada uno de los reactivos que se comentarán a continuación, se colocó la placa durante 1 minuto en el agitador térmico PHMT Thermo-Shaker (Grant Instruments, Shepreth, Cambridge, Reino Unido) para asegurar una mezcla adecuada de los mismos.

Se añadieron 100 μ l/pocillo de cada una de las siete diluciones de los patrones del colágeno, 100 μ l/pocillo del control negativo y 100 μ l/pocillo de la muestra. Los patrones y el control negativo se distribuyeron en dos columnas de la placa, de forma duplicada. Por otro lado, las muestras se añadieron por duplicado por cada tipo de disco estudiado y se dejaron en el incubador de CO_2 durante 90 minutos.

A continuación, se realizaron dos lavados con 350 μ l líquido tampón en cada pocillo, durante 30 segundos, y posteriormente se agitó suavemente la placa para dejarla lo más seca posible y se retiró el exceso de líquido con papel absorbente.

Posteriormente se añadieron 100 μ l de anticuerpo de detección biotilado en cada pocillo, dejando incubar durante 60 minutos.

Se lavó nuevamente tres veces la placa y se añadieron 100 μ l de anticuerpo secundario excepto en los pocillos con blanco y se incubó durante 30 minutos.

Por último, se lavó cinco veces la placa antes de añadir el sustrato cromogénico TMB. Se añadió con pipeta multicanal Gilson (Gilson Inc., Middleton, Wisconsin, Estados Unidos) 100 μ l/pocillo y se incubó durante 30 minutos hasta percibir un gradiente de color azul en los patrones de colágeno. A continuación, se cubrió la placa con papel de aluminio para proteger al reactivo de la luz. Pasado el tiempo de reacción del sustrato, se añadieron—también con pipeta multicanal y en el mismo orden en el que se añadió el TMB – 100 μ l de ácido sulfúrico 1M en cada pocillo para detener la reacción. El gradiente de color azul pasó a ser de color amarillo.

El ensayo ELISA se lleva a cabo midiendo y comparando la lectura de absorbancia de los pocillos que contienen las muestras con los pocillos que contienen los patrones de colágeno con un lector de placas, en el que la absorbancia fue leída a 450 nm. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de colágeno detectada en la muestra. Los pocillos con menor concentración de colágeno tendrán menor intensidad de color que los que tienen mayor concentración de colágeno (figura 45).

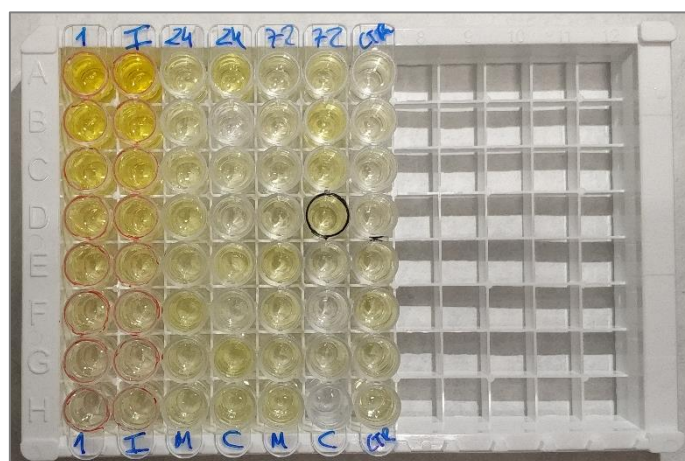


Figura 45. Distribución de pocillos en la placa de ELISA. Las dos primeras columnas son los patrones, siendo el resto de columnas los pocillos con muestras a las 24 y 72 horas y la última columna de pocillos control.

5.2.5.5 Recopilación y procesamiento de datos

El programa asociado al espectrofotómetro es el Gen5 1.11, en el que se aplicaron los siguientes comandos: Read a plate \rightarrow Procedure-Synergy (Com1) \rightarrow Plate type: 96 \rightarrow Add step \rightarrow Read; Detection method \rightarrow Absorbance; Wavelengths \rightarrow 450 nm; Full plate \rightarrow selección de los pocillos con muestra (A1-H8) \rightarrow OK

Los resultados fueron exportados a un archivo excel, a continuación, se plasmaron los datos en una tabla de excel en el que se obtuvo la media de los valores de densidad óptica. Previamente fue necesario sustraer la absorbancia obtenida en los blancos al resto de valores de absorbancia media obtenidos en las muestras y controles para obtener valores normalizados de absorbancia. A partir de los datos de absorbancia de los patrones del colágeno se elaboró una curva patrón estándar con las concentraciones previamente conocidas y los valores de absorbancia obtenidos. Se trazó una recta y la ecuación de la misma para así obtener la concentración de colágeno en las muestras.

El coeficiente de determinación R^2 indica la fiabilidad de la curva patrón conforme su valor se aproxime más a 1.

5.2.5.6 Análisis estadístico

La comparación de los tres grupos para cada una de las variables analizadas se realizó empleando el software IBM SPSS Statistics 24.0 (International Business Machines Corp; New York, Estados Unidos). Se realizó el test Shapiro-Wilk para comprobar la existencia de normalidad en las variables. Se comprobó la homogeneidad de varianzas con el test de Levene. Se empleó la prueba de varianza ANOVA para la comparación de medias entre los grupos. Las comparaciones múltiples se realizaron con la prueba de Bonferroni en los casos de igualdad de varianzas y con la prueba de Games-Howell en el caso de heterocedasticidad. Se estableció un nivel de significancia estadística del 5% ($p < 0,05$). El índice de varianza empleado fue omega cuadrado (ω^2) para explicar la asociación entre el tipo de material y el parámetro celular analizado en las variables estudiadas con ANOVA. Se calculó la magnitud del efecto en las comparaciones post hoc estadísticamente significativas a través de la d de cohen. Se estableció un tamaño de efecto pequeño para valores $d < 0,5$, efecto mediano para valores entre 0,5 y 0,8; y tamaño de efecto grande para valores superiores a 0,8.

Resultados



6. RESULTADOS

Los resultados obtenidos proceden de cuatro grupos de estudios. Por un lado, los estudios realizados para la caracterización de superficie de las muestras, y por otro, el grupo de estudios de citomorfometría, viabilidad y secreción de colágeno.

6.1 CARACTERIZACIÓN DE SUPERFICIE

6.1.1 Análisis de composición de superficie

Los resultados obtenidos del análisis EDS de ZLS y Y-TZP (figuras 46 y 47) muestran picos de cristalización elevados de silicio y oxígeno para el primero y de circonia e itrio para el segundo. Los elementos detectados en ambos son el oxígeno y aluminio. En el caso de ZLS, el litio no se detectó debido a que es un elemento ligero con bajo peso atómico ($Z=3$; $A=6,94$ u).

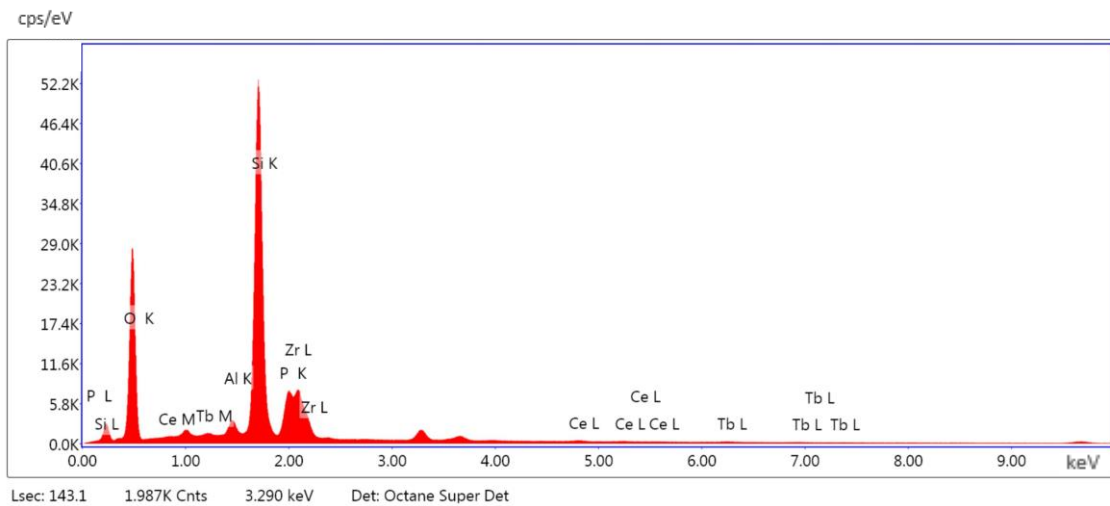


Figura 46. Análisis de espectroscopia de dispersión de energía de Celtra Duo (ZLS).

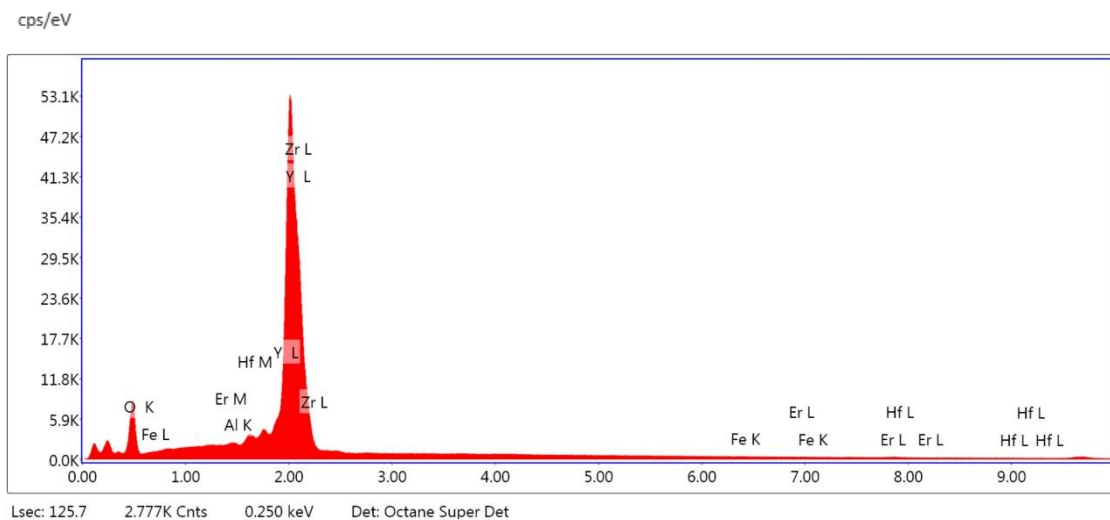


Figura 47. Análisis de espectroscopia de dispersión de energía de circonia (Y-TZP).

Resultados

En la tabla 6 se muestra el porcentaje de contenido en masa (wt%) de los compuestos químicos detectados en cada uno de los materiales. Ambos presentan alúmina en un porcentaje reducido.

	CELTRA DUO (ZLS) (wt.%)		VITA YZ (Y-TZP) (wt.%)
Al ₂ O ₃	2,85	Al ₂ O ₃	0,08
Si O ₂	71,01	Zr O ₂	88,66
P ₂ O ₅	7,44	Y ₂ O ₃	10,41
Zr O ₂	16,72	Fe ₂ O ₃	0,16
Ce ₂ O ₃	1,10	Er ₂ O ₃	0,26
Tb ₂ O ₃	0,88	Hf ₂ O ₃	0,43

Tabla 6. Contenido en masa (%) de ZLS y Y-TZP.

6.1.2 Topografía de superficie

Las imágenes SEM de las muestras se pueden observar en la figura 48. Se observaron topografías diferentes entre ambas superficies. En las imágenes ZLS se puede observar una estructura arenosa, no homogénea, marcadamente irregular con una estructura tipo cráter con distribución aleatoria. En la muestra Y-TZP se observa un patrón en surcos concéntricos propios del mecanizado del bloque. Ambas superficies presentan irregularidades y defectos en la superficie, propios del fresado y sinterizado de los discos.

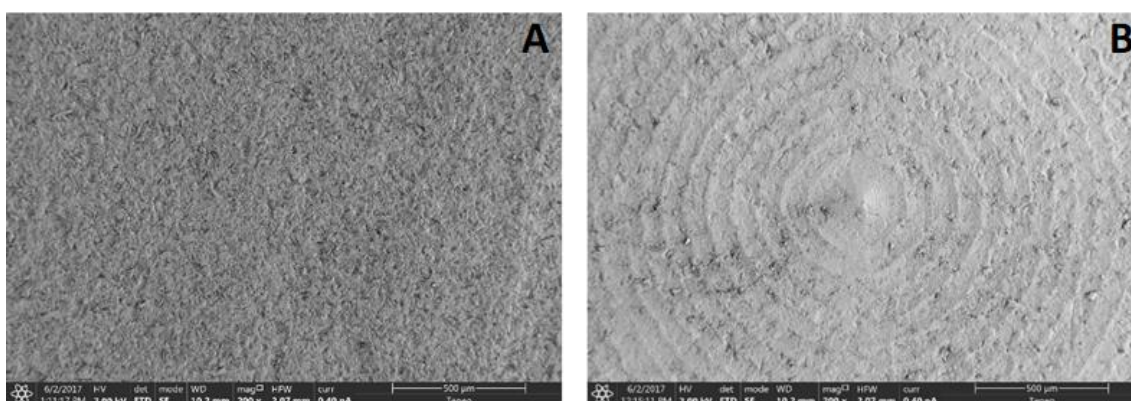


Figura 48. Imágenes SEM a magnificación 200x de ZLS (A) y Y-TZP (B).

6.1.3 Perfilometría

La rugosidad media S_a obtenida a partir de los cinco valores obtenidos en cada material es de $2,84 \pm 1,14 \mu\text{m}$ para ZLS y de $0,80 \pm 0,08 \mu\text{m}$ para Y-TZP.

Las zonas de medición sobre las muestras y las imágenes obtenidas del perfil de rugosidad en dos y tres dimensiones para ambos materiales pueden observarse en las figuras 49 y 50.

Los picos y valles que presentan ambas superficies se encuentran alrededor de $3-4 \mu\text{m}$, sin embargo, la distribución topográfica es distinta. El perfil de ZLS presenta una disposición en picos y valles distribuidos de forma aleatoria y la de Y-TZP en forma de microsurcos con un patrón definido de una anchura de aproximadamente $100 \mu\text{m}$ entre pico y pico, siendo la altura de cada pico de $2-3 \mu\text{m}$.

Resultados

Company: Sensofar Demo
User: Administrator
Version: 6.2
24/05/2017 11:15:33

SENSOFAR.
METROLOGY

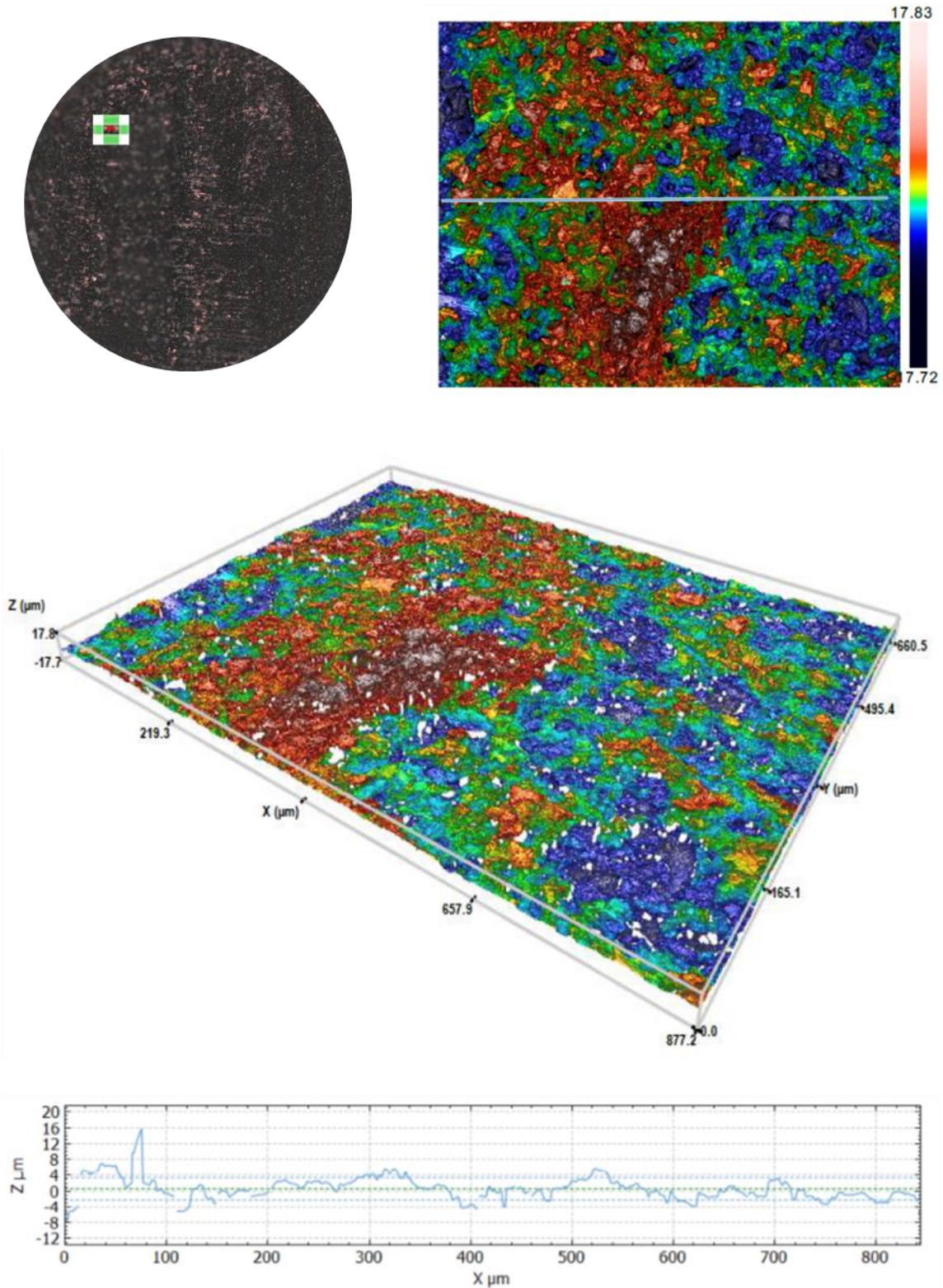


Figura 49. Perfilometría en 2D y 3D de Celtra Duo (ZLS). Imagen del perfil.

Company: Sensofar Demo
User: Administrator
Version: 6.2
24/05/2017 12:57:15

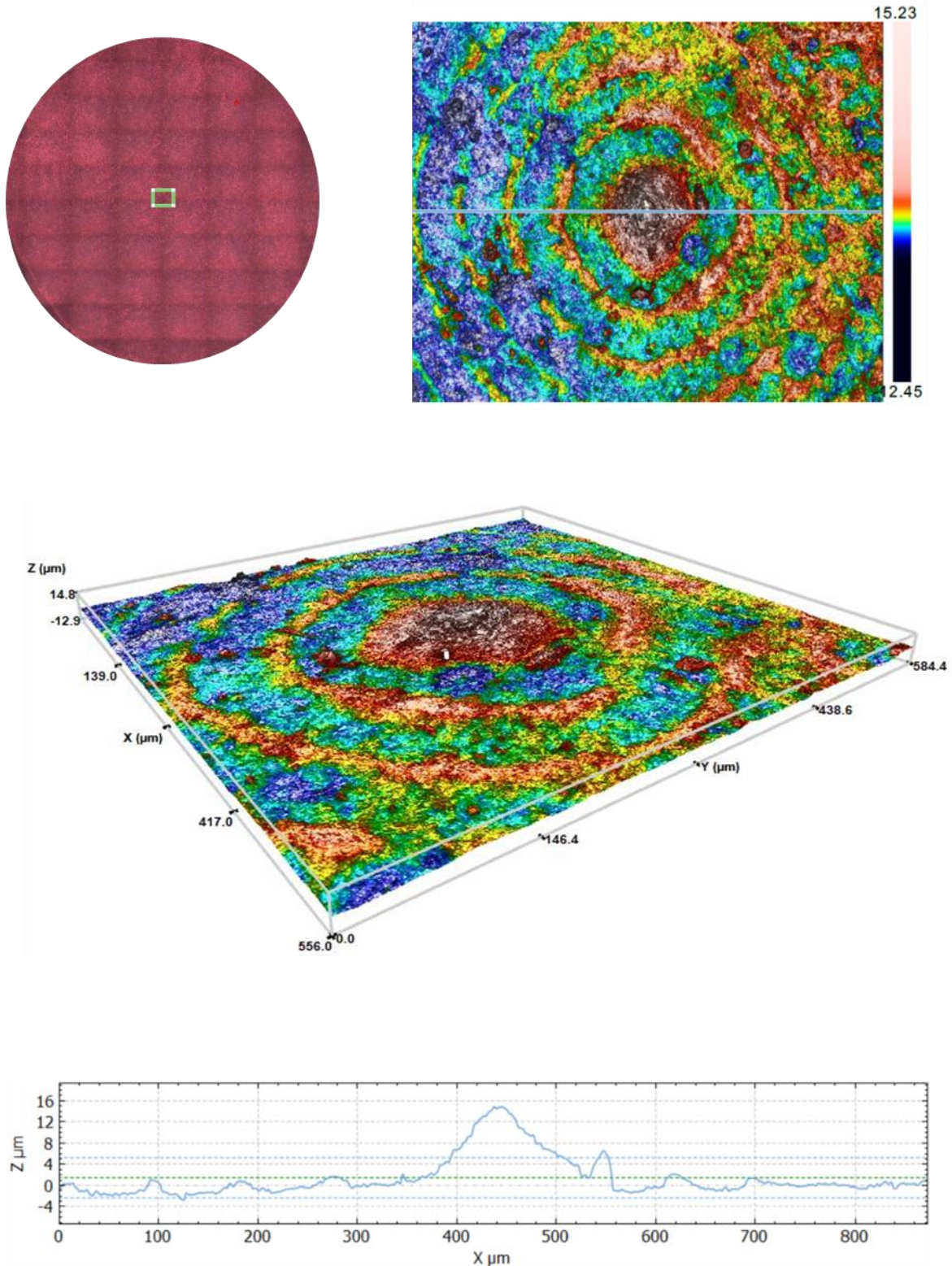


Figura 50. Perfilometría en 2D y 3D de VITA YZ (Y-TZP). Imagen del perfil.

6.1.4 Humectabilidad

Los valores medios de ángulo de contacto para agua destilada y diyodometano se pueden observar en la tabla 7 y figura 51.

Muestra	Ángulo de contacto (°)			
	Agua	p	Diyodometano	p
Y-TZP	68,35±4,72	<0,001	73,9±1,27	0,001
ZLS	51,48 ±2,11		76,8±0,81	

Tabla 7. Valores de ángulo de contacto obtenidos en ambas muestras.

Los valores medios de las componentes polar, dispersiva y energía superficial se pueden observar en la tabla 8 y representados en la figura 52. Pueden observarse imágenes de gotas sésiles sobre cada una de las superficies en las figuras 53 y 54.

Muestra	Comp. dispersivo (mN/m)	p	Comp. polar (mN/m)	p	Energía superficial (mN/m)	p
Y-TZP	20,72±0,69	<0,001	16,13±3,41	<0,001	36,85±2,74	<0,001
ZLS	19,11±0,43		29,29±1,54		48,41±1,61	

Tabla 8. Valores de las componentes polar, dispersiva y energía libre de superficie.

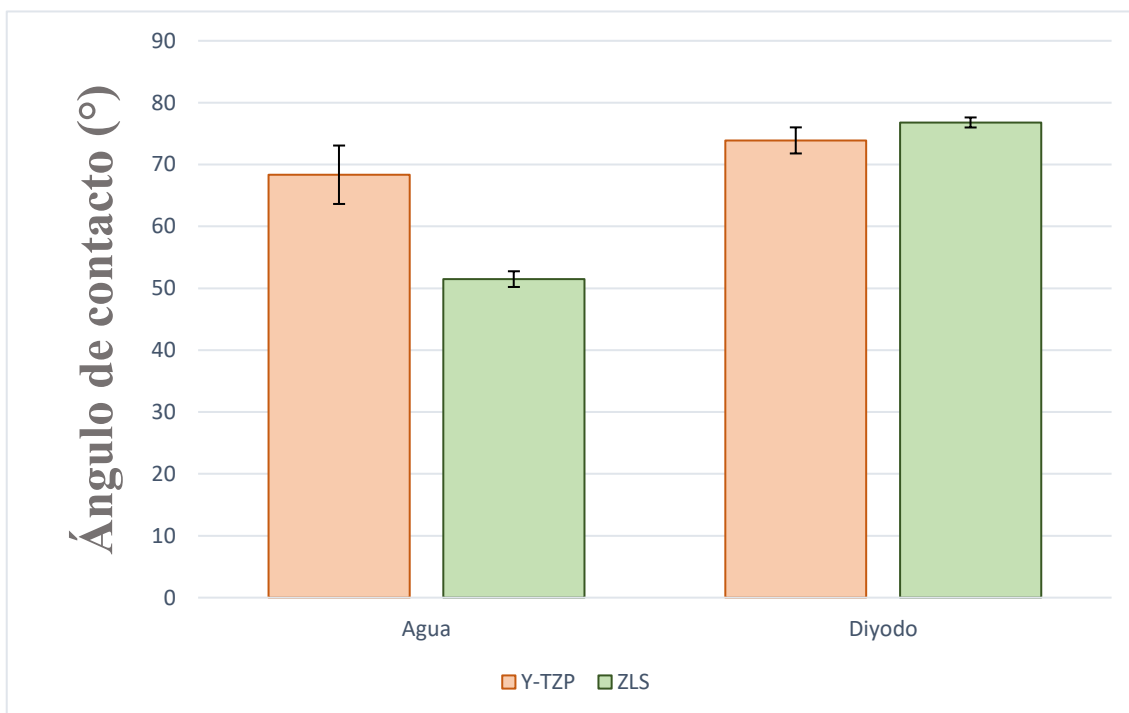


Figura 51. Gráfico comparativo de los ángulos de contacto en ambas muestras.

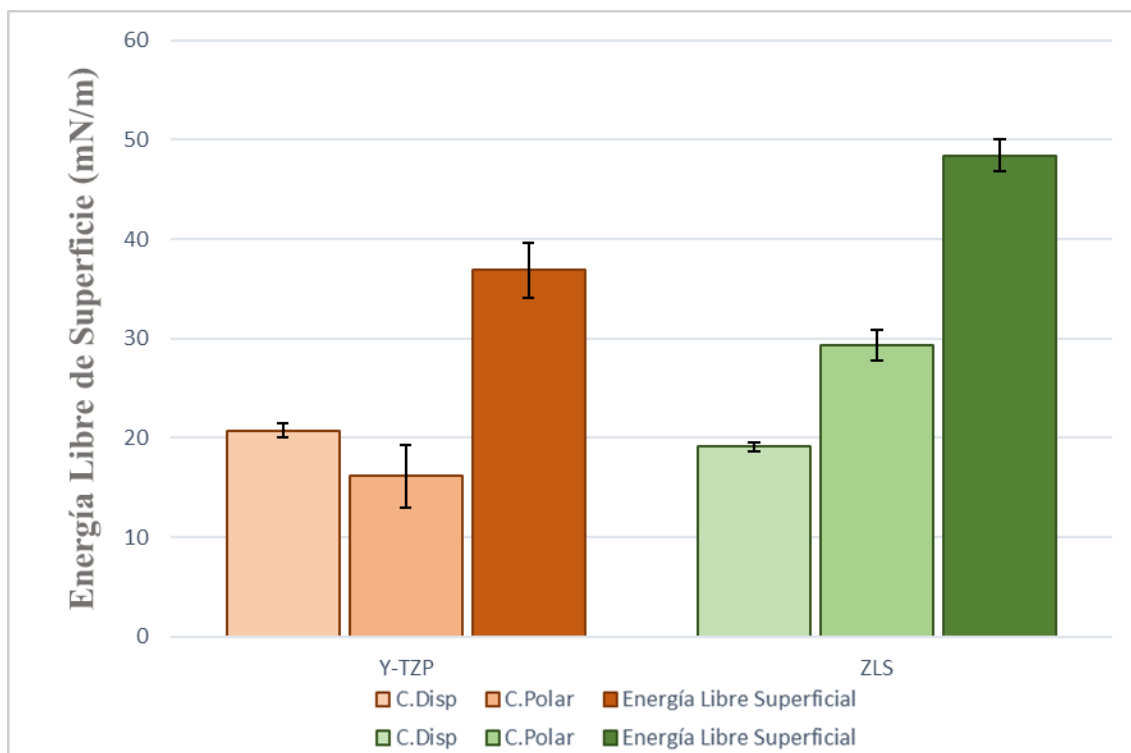


Figura 52. Gráfico comparativo de las componentes polar, dispersiva y energía libre de superficie



Figura 53. Gota sésil de agua (izquierda) y diyodometano (derecha) sobre la superficie de Y-TZP.

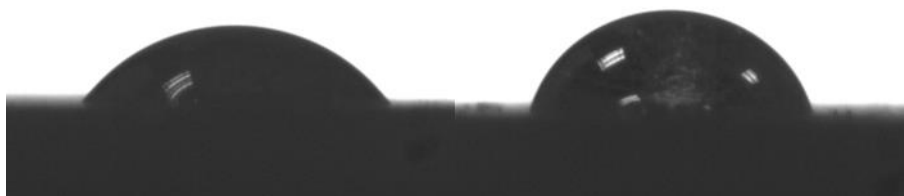


Figura 54. Gota sésil de agua (izquierda) y diyodometano (derecha) sobre la superficie de ZLS.

Resultados

La distribución normal de los datos permitió la comparación de las medias de cada grupo a través de la prueba t de student y se calculó la magnitud del efecto de las diferencias estadísticamente significativas a través de d de Cohen. En este caso, siendo grupos de estudio con muestra pequeña ($n=6$), el tamaño del efecto proporciona una información más precisa que el valor p de significación estadística.

El ángulo de contacto en agua fue superior en Y-TZP ($68,35^{\circ}\pm 4,72$) que en ZLS ($51,48^{\circ}\pm 2,11$). De acuerdo con la prueba t-student, esta diferencia fue estadísticamente significativa ($t_{10} = 7,985$; $p < 0,001$) y presentó un tamaño de efecto grande ($d=4,61$).

El ángulo de contacto en diyodometano fue superior en ZLS ($76,8^{\circ}\pm 0,81$) con respecto a Y-TZP ($73,9^{\circ}\pm 1,27$). De acuerdo con la prueba t-student, esta diferencia fue estadísticamente significativa ($t_{10} = -4,829$; $p=0,001$) y presentó un tamaño de efecto pequeño ($d=0,27$).

La componente dispersiva de la energía superficial fue superior en Y-TZP ($20,72\pm 0,69$ mN/m) respecto a ZLS ($19,11\pm 0,43$ mN/m). De acuerdo con la prueba t-student, esta diferencia fue estadísticamente significativa ($t_{10} = 4,798$, $p < 0,001$) y presentó un tamaño de efecto grande ($d= 2,77$).

La componente polar de la energía superficial fue superior en ZLS ($29,29\pm 1,54$ mN/m) con respecto a Y-TZP ($16,13\pm 3,41$ mN/m). De acuerdo con la prueba t-student, esta diferencia fue estadísticamente significativa ($t_{10} = 8,595$, $p < 0,001$) y presentó un tamaño de efecto grande ($d= 4,962$).

La energía libre de superficie fue superior sobre la superficie ZLS ($48,41\pm 1,61$ mN/m) con respecto a Y-TZP ($36,85\pm 2,74$ mN/m). De acuerdo con la prueba t-student, esta diferencia fue estadísticamente significativa ($t_{10} = 8,883$, $p < 0,001$) y presentó un tamaño de efecto grande ($d=5,129$).

6.2 ESTUDIO CITOMORFOMÉTRICO Y DE CUBRIMIENTO CELULAR DE LOS DISCOS.

Se cuantificó el número de células, seis variables citomorfométricas y el área ocupada por las células en el disco a partir de las imágenes obtenidas a 20x y 40x. En la figura 55 se puede observar el seguimiento del crecimiento de los fibroblastos al microscopio invertido. En las tablas 9 y 10 se puede observar la media aritmética y desviación estándar para cada una de las variables analizadas. En el grupo control se obtuvo un resultado superior en todas las variables analizadas con respecto a las cerámicas de estudio. Los valores obtenidos en Y-TZP fueron superiores a los obtenidos en ZLS. En cuando al Factor de Forma, ZLS obtuvo el valor medio más alto con respecto al control y a Y-TZP, interpretándose como células de forma más redondeada; por otro lado, los valores próximos a 0 en los grupos control e Y-TZP se interpretan como células con fenotipo fusiforme (figuras 56-63).

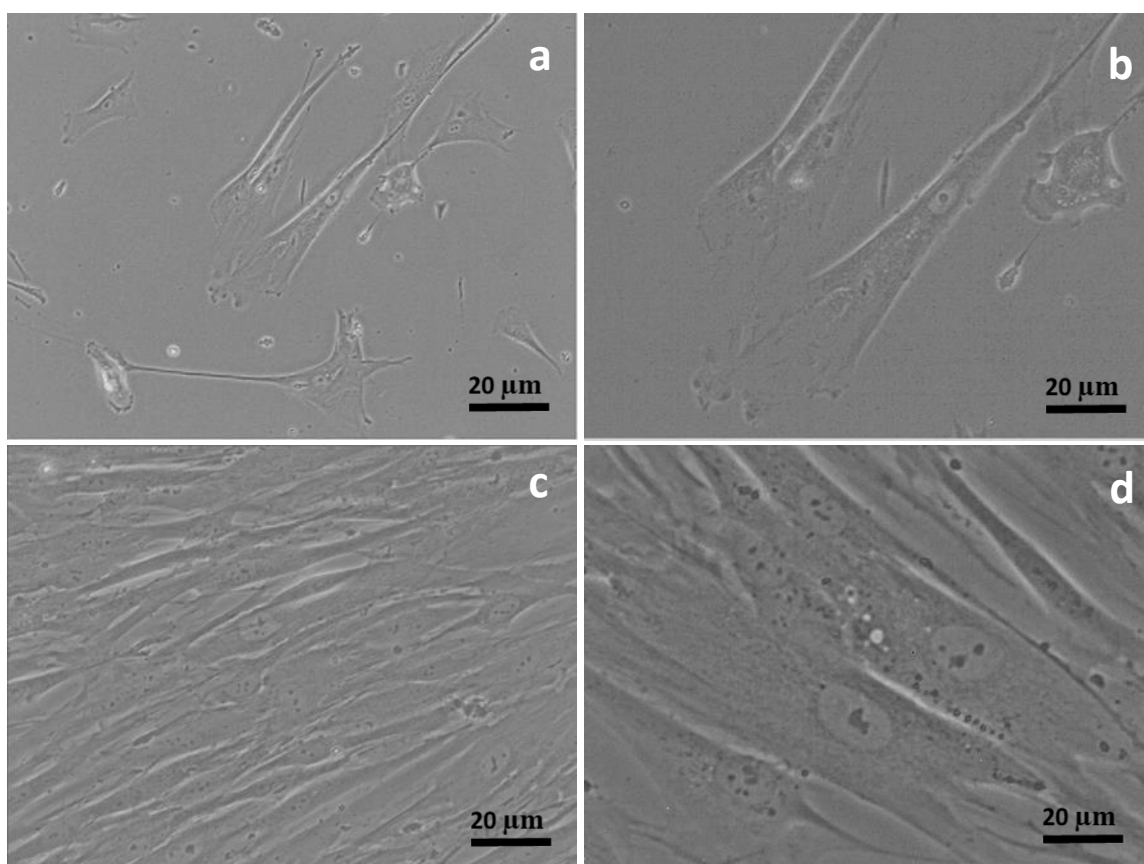


Figura 55. Cultivo de fibroblastos tras cuatro días del subcultivo a magnificación 10x (a) y 20x (b) y cultivo en confluencia a los siete días a magnificación 20x (c) y 40x (d).

Resultados

Parámetro citomorfométrico	Grupos	Media \pm Desv. Estándar
Conteo celular (n° células/RDI*)	Control	73,33 \pm 39,22
	ZLS	34,55 \pm 17,52
	Y-TZP	68,90 \pm 49,02
Área celular media (μm^2)	Control	735,43 \pm 283,55
	ZLS	153,18 \pm 46,76
	Y-TZP	693,96 \pm 285,63
Perímetro celular medio (μm)	Control	410,62 \pm 98,03
	ZLS	132,31 \pm 24,13
	Y-TZP	344,47 \pm 154,20
Long. axis mayor citoesq. (μm)	Control	97,57 \pm 22,24
	ZLS	35,66 \pm 16,44
	Y-TZP	63,34 \pm 31,64
Factor de Forma (FF)	Control	0,06 \pm 0,02
	ZLS	0,1 \pm 0,02
	Y-TZP	0,09 \pm 0,03
Tamaño medio del núcleo (μm^2)	Control	170,39 \pm 30,17
	ZLS	87,89 \pm 46,61
	Y-TZP	122,61 \pm 62,42
Circularidad del núcleo	Control	0,80 \pm 0,05
	ZLS	0,58 \pm 0,09
	Y-TZP	0,60 \pm 0,07

Tabla 9. Parámetros celulares analizados. * Área RDI = 6,28 mm².

Cubrimiento celular del disco	Grupos	Media \pm Desv. Estándar
Área media ocupada (%)	Control	24,73 \pm 14,48
	ZLS	15,27 \pm 2,48
	Y-TZP	22,39 \pm 10,55

Tabla 10. Cubrimiento celular de los discos

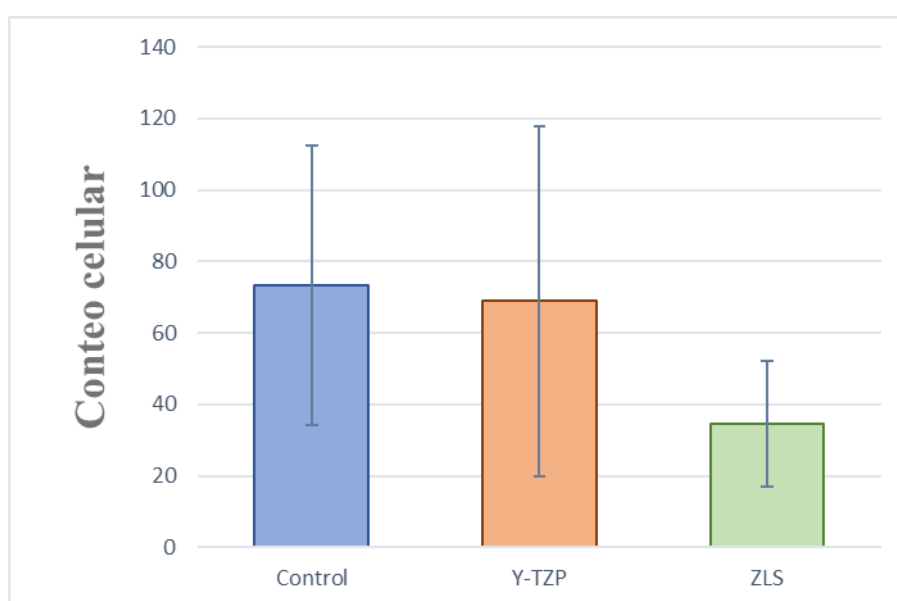


Figura 56. Conteo celular medio en los grupos.

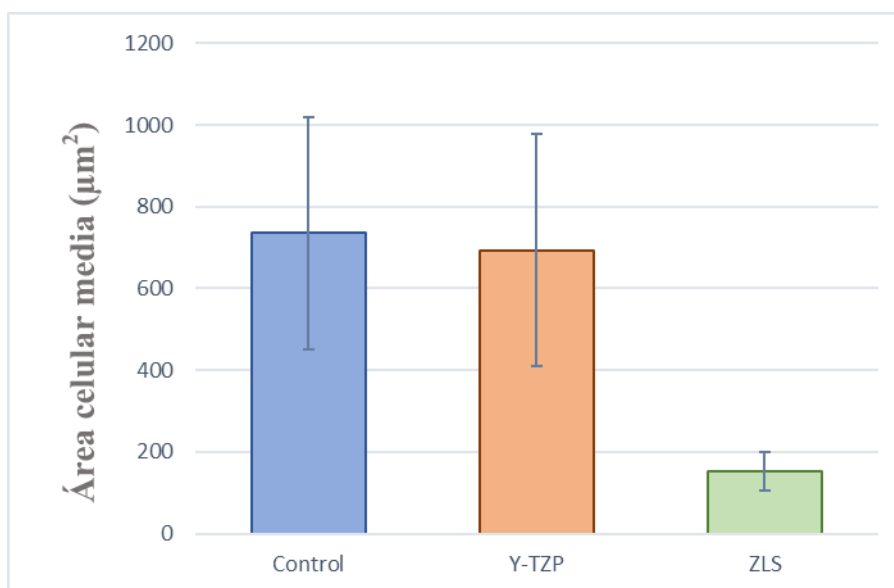


Figura 57. Área celular media en los grupos.

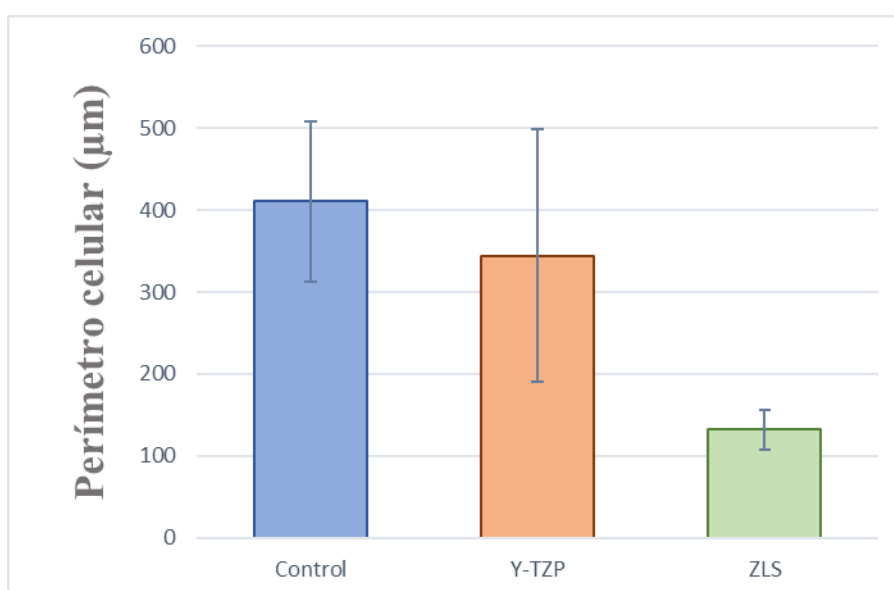


Figura 58. Perímetro celular medio en los grupos.

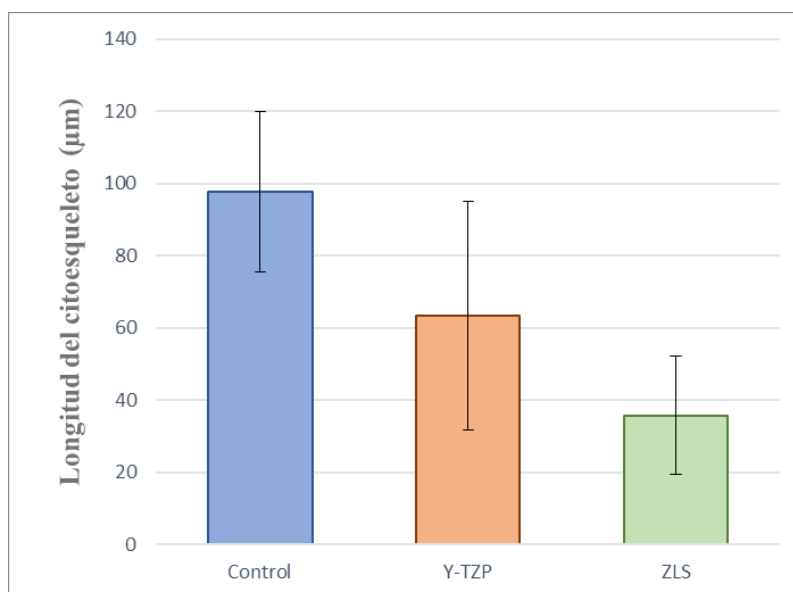


Figura 59. Longitud media del axis mayor del citoesqueleto celular.

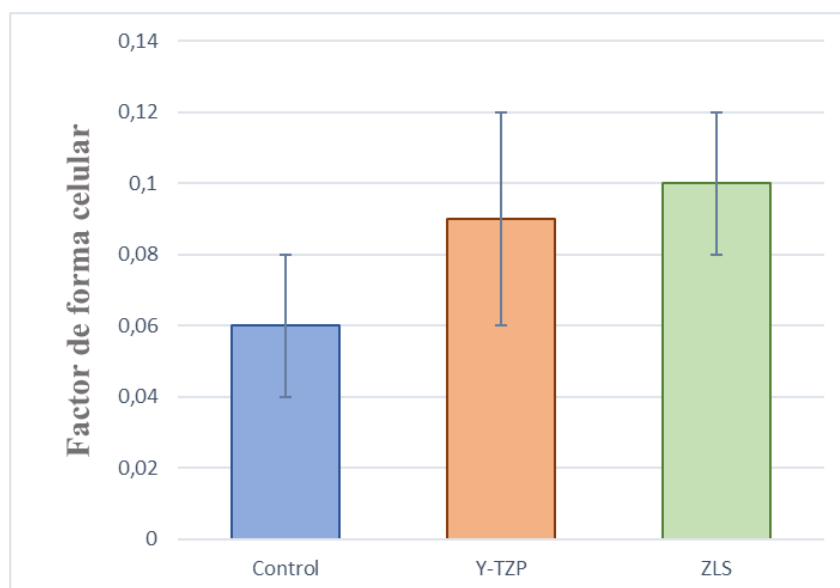


Figura 60. Factor de forma celular.

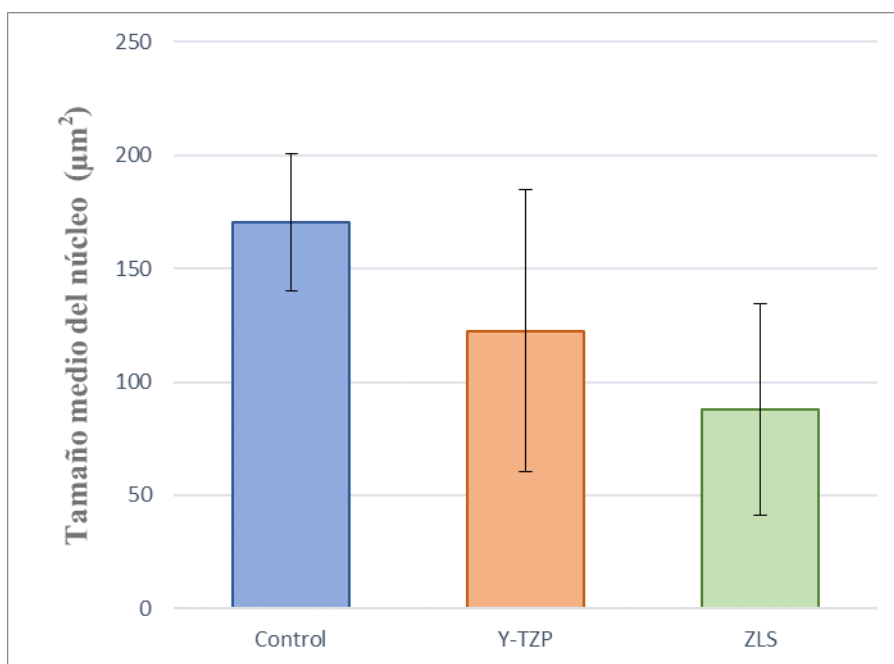


Figura 61. Tamaño medio del núcleo en los grupos.

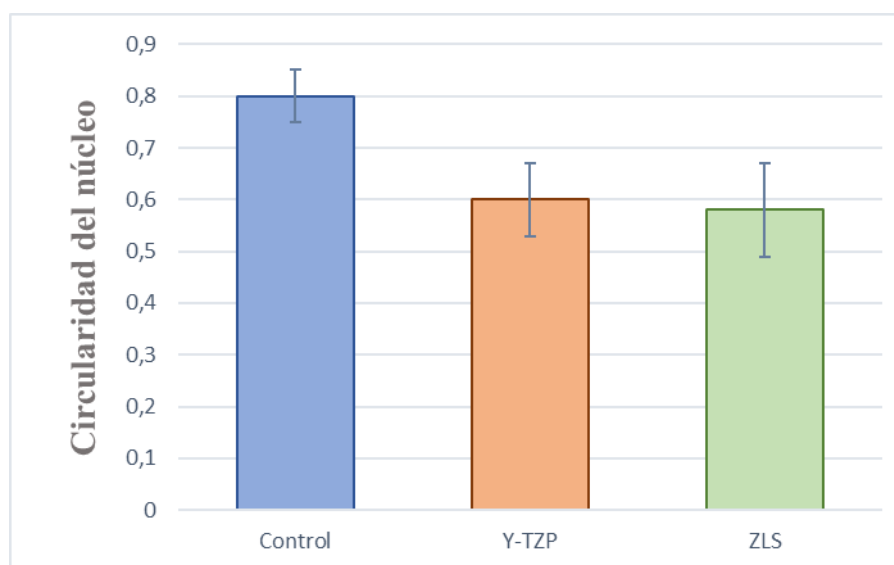


Figura 62. Circularidad media de los núcleos.

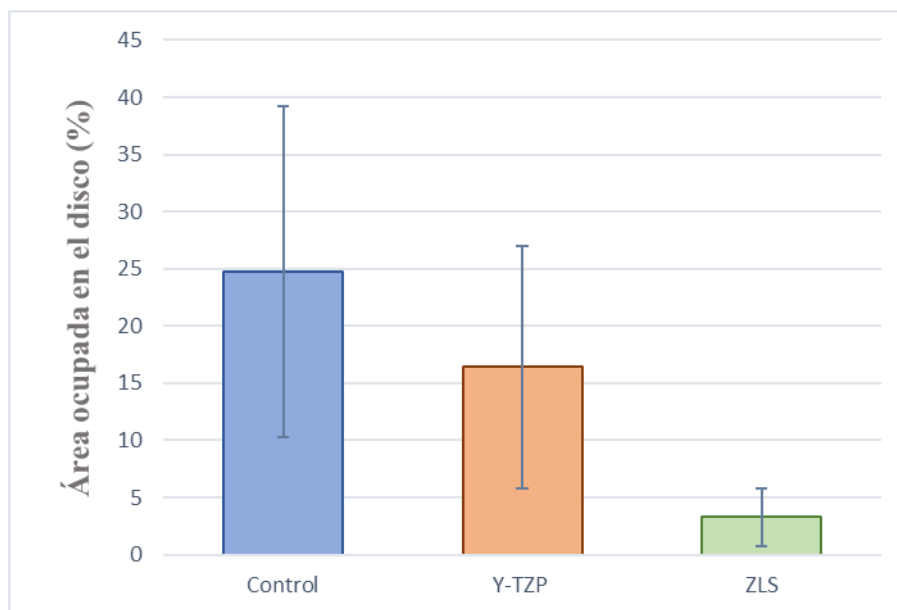


Figura 63. Área media ocupada en los discos

Resultados

Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk en la que no se observó una distribución normal para siete de las ocho variables analizadas, siendo la variable [Tamaño del núcleo] la que presentó una distribución normal ($p=0,242$). En el caso de esta variable, se comprobó la homogeneidad de varianza con el test de Levene, se compararon las medias con ANOVA de un factor y se analizaron las diferencias entre grupos con test de Bonferroni (tabla 11). Se empleó la d de Cohen para cuantificar el tamaño del efecto. El índice de varianza omega cuadrado (ω^2) fue empleado para reflejar el porcentaje de variabilidad total en la variable analizada atribuible al tipo de material analizado.

Para el resto de las variables sin distribución normal, tras comprobar la homogeneidad de varianzas, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis y test de Bonferroni para analizar las diferencias entre grupos y la r de Rosenthal para cuantificar el tamaño del efecto (Tablas 12 y 13). El índice de varianza épsilon cuadrado (ϵ^2) fue empleado para reflejar el porcentaje de variabilidad total en la variable analizada atribuible al tipo de material analizado.

Tal y como se puede observar en las tablas 11 y 12, los diferentes materiales empleados mostraron una influencia estadísticamente significativa sobre todas las variables celulares analizadas ($p<0,05$).

Parámetro celular analizado	Estadístico F	p
Tamaño medio del núcleo	8,929	0,01

Tabla 11. Resultados del análisis de varianza de un factor (ANOVA).

Parámetro celular analizado	Estadístico H	p
Conteo celular	8,088	0,018
Área celular media	30,633	<0,001
Perímetro celular medio	31,631	<0,001
Longitud axis mayor del citoesqueleto	76,443	<0,001
Factor de Forma celular	12,003	0,002
Circularidad del núcleo	28,090	<0,001
Área media ocupada por las células	27,810	<0,001

Tabla 12. Resultados del estadístico de contraste Kruskal-Wallis.

Las comparaciones entre grupos se realizaron con la prueba de Bonferroni tal y como se observa en la tabla 13.

Variable dependiente	Grupo (I)	Grupo (J)	p
	Control	ZLS	0,021*
Conteo celular	Control	Y-TZP	1,000
	Y-TZP	ZLS	0,039*
	Control	ZLS	<0,001*
Área celular media	Control	Y-TZP	1,000
	Y-TZP	ZLS	<0,001*
	Control	ZLS	<0,001*
Perímetro celular medio	Control	Y-TZP	0,477
	Y-TZP	ZLS	<0,001*
	Control	ZLS	<0,001*
Long. axis mayor citoesq.	Control	Y-TZP	<0,001*
	Y-TZP	ZLS	<0,001*
	Control	ZLS	0,002*
Factor de Forma	Control	Y-TZP	0,033*
	Y-TZP	ZLS	0,958
	Control	ZLS	<0,001*
Tamaño medio del núcleo	Control	Y-TZP	0,024*
	Y-TZP	ZLS	0,117
	Control	ZLS	<0,001*
Circularidad del núcleo	Control	Y-TZP	<0,001*
	Y-TZP	ZLS	0,529
	Control	ZLS	<0,001*
Área media ocupada	Control	Y-TZP	0,398
	Y-TZP	ZLS	<0,001*

Tabla 13. Comparaciones múltiples de los grupos. Test de Bonferroni.

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

Resultados

En todos los parámetros celulares analizados se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (tabla 13).

En cuanto al número de células contabilizadas sobre la superficie, existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto al material empleado ($H(2)=8,088$ $p=0,018$). Un 18% de la varianza total en el área celular es atribuible al tipo de material empleado ($\epsilon^2 = 0,18$).

El número medio de células contabilizadas sobre la superficie del disco control ($73,33\pm 39,22$) fue superior con respecto a la superficie de Y-TZP ($68,90\pm 49,02$) y de ZLS ($34,55\pm 17,52$).

Las posteriores comparaciones múltiples evidencian diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control-ZLS ($p = 0,021$) $r = -0,55$ (efecto grande) y los grupos Y-TZP y ZLS ($p = 0,039$), $r = -0,37$ (efecto mediano).

Existen diferencias significativas en cuanto al área celular media en función del material sobre el que se cultivaron ($H(2) = 30,633$ $p < 0,001$). Aproximadamente un 63% de la varianza total en el área celular atribuible al tipo de material empleado ($\epsilon^2 = 0,63$).

El área media celular fue superior en las células cultivadas sobre discos control ($735,43\pm 283,55$) con respecto a Y-TZP ($693,96\pm 285,63$) y a ZLS ($153,18\pm 46,76$).

Las posteriores comparaciones múltiples evidencian diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control-ZLS ($p < 0,001$), $r = -0,85$ (efecto grande) y los grupos Y-TZP con ZLS ($p < 0,001$) $r = -0,84$ (efecto grande). En ambos casos el área celular media es significativamente inferior en fibroblastos cultivados sobre ZLS, no habiendo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos control e Y-TZP.

En el parámetro perímetro celular medio también se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($H(2) = 31,631$ $p < 0,001$). Aproximadamente un 65% de la varianza total en el perímetro celular se atribuye al tipo de material empleado ($\epsilon^2 = 0,65$).

El perímetro celular medio fue superior en las células cultivadas sobre discos control ($410,62\pm 98,03$) con respecto a Y-TZP ($344,47\pm 154,20$) y a ZLS ($132,31\pm 24,13$).

Las posteriores comparaciones múltiples evidencian diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control-ZLS ($p < 0,001$) $r = -0,85$ (efecto grande) y los grupos Y-TZP con ZLS ($p < 0,001$) $r = -0,82$ (efecto grande). En ambos casos el perímetro celular medio es significativamente inferior en fibroblastos cultivados sobre ZLS, no habiendo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos control e Y-TZP.

La longitud del citoesqueleto mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($H(2) = 76,443$ $p < 0,001$). Aproximadamente un 57% de la varianza total en la longitud del citoesqueleto se atribuye al tipo de material empleado ($\epsilon^2 = 0,57$).

La longitud media del citoesqueleto fue superior en las células cultivadas sobre el disco control ($97,57 \pm 22,24$) con respecto a Y-TZP ($63,34 \pm 31,64$) y a ZLS ($35,66 \pm 16,44$).

Las posteriores comparaciones múltiples evidencian diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos, siendo en ellos la significancia de $p < 0,001$. Entre control y ZLS se observó un efecto grande ($r = -0,83$), entre control e Y-TZP se observó un efecto grande ($r = -0,58$) y entre ZLS e Y-TZP se observó un efecto mediano ($r = -0,46$).

La forma celular también mostró diferencias estadísticamente significativas según el material de la muestra ($H(2) = 12,003$ $p = 0,002$ siendo aproximadamente un 25% de la varianza total en la forma celular atribuible al tipo de material empleado ($\epsilon^2 = 0,25$).

El valor de Factor de Forma fue superior (forma más circular) en las células cultivadas sobre discos ZLS ($0,10 \pm 0,02$) con respecto a Y-TZP ($0,09 \pm 0,03$) y al control ($0,06 \pm 0,02$).

En el parámetro Factor de Forma se pudieron observar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ZLS-control ($p = 0,002$) $r = -0,64$ (efecto grande) y entre los grupos Y-TZP con el control ($p = 0,033$) $r = -0,40$ (efecto mediano), siendo mayor la circularidad de las células cultivadas sobre ZLS e Y-TZP que con respecto a las cultivadas sobre el grupo control, siendo éstas últimas más alargadas (valor más próximo a 0).

El tamaño medio del núcleo mostró diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos ($F(2, 48) = 8,929$ $p = 0,001$). Aproximadamente un 25 % de la varianza total en el tamaño medio del núcleo es debido al tipo de material empleado ($\omega^2 = 0,25$).

El tamaño medio del núcleo fue superior en el grupo control ($170,39 \pm 30,17$), seguido del grupo Y-TZP ($122,61 \pm 62,42$) y de ZLS ($87,89 \pm 46,61$).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y ZLS ($p < 0,001$) $d = 2,10$ (efecto grande) y entre grupo control e Y-TZP ($p = 0,024$) $d = 0,97$ (efecto grande), no habiendo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Y-TZP y ZLS.

La variable circularidad del núcleo también reveló diferencias estadísticamente significativas según el material empleado ($H(2) = 28,090$ $p < 0,001$), siendo aproximadamente un 62 % de la varianza total en la forma celular atribuible al tipo de material empleado ($\epsilon^2 = 0,62$).

La circularidad del núcleo fue superior en el grupo control ($0,80 \pm 0,05$) con respecto a Y-TZP ($0,60 \pm 0,07$) y ZLS ($0,58 \pm 0,09$).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y ZLS ($p < 0,001$) $r = -0,83$ (efecto grande) y entre grupo control e Y-TZP ($p < 0,001$) $r = 0,81$ (efecto grande) no habiendo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Y-TZP y ZLS.

El área ocupada por las células sobre los discos también reveló diferencias estadísticamente significativas en función del material sobre el que se cultivaron ($H(2) = 27,810$ $p < 0,001$). Aproximadamente un 57% de la varianza total en el área ocupada se atribuye al tipo de material empleado ($\epsilon^2 = 0,57$).

El área media ocupada por las células fue superior sobre los discos control ($24,73 \pm 14,48$) con respecto a Y-TZP ($22,39 \pm 10,55$) y a ZLS ($15,27 \pm 2,48$).

Las posteriores comparaciones múltiples evidencian diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control-ZLS ($p = < 0,001$) $r = -0,85$ (efecto grande) y los grupos Y-TZP con ZLS ($P < 0,001$) $r = -0,71$ (efecto grande). En ambos casos, el área ocupada por los fibroblastos es significativamente inferior en fibroblastos cultivados sobre ZLS, no habiendo diferencia significativa entre el grupo control e Y-TZP.

6.3 VALORACIÓN CUALITATIVA DEL EFECTO DE LOS MATERIALES DE ESTUDIO A NIVEL MORFOLÓGICO Y DE ANCLAJE CELULAR

La morfología celular observada a las 24 horas sobre las superficies cerámicas y el control de poliestireno se muestran en las figuras 64, 65 y 66. Las células se tiñeron con DAPI para la tinción del núcleo y faloidina para la tinción del citoesqueleto, fueron observadas al microscopio confocal a una magnificación de 20x y 40x empleando el láser de argón a una frecuencia de 488 nm. Dichas fotografías se tomaron sobre cinco zonas de cada uno de los discos de forma aleatoria, siendo estas imágenes representativas de todos los campos analizados.

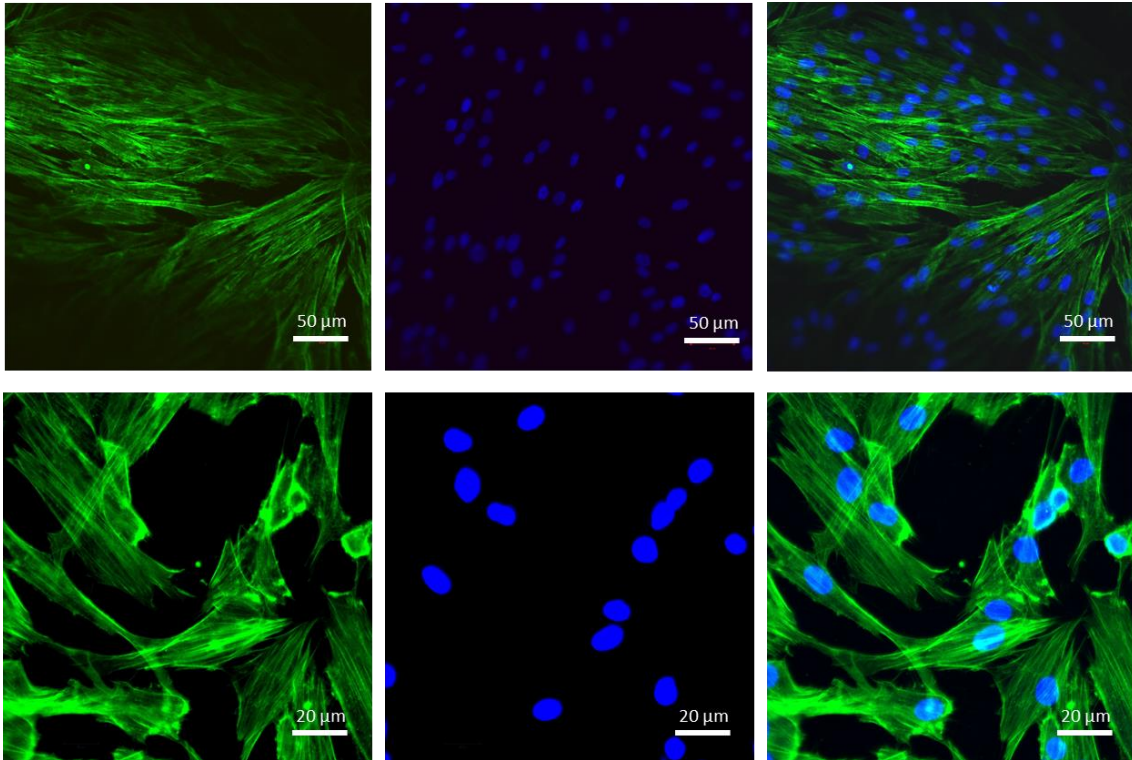


Figura 64. Imágenes al microscopio confocal de los fibroblastos sobre la superficie control de poliestireno a magnificación 20x (fila superior) y 40x (fila inferior).

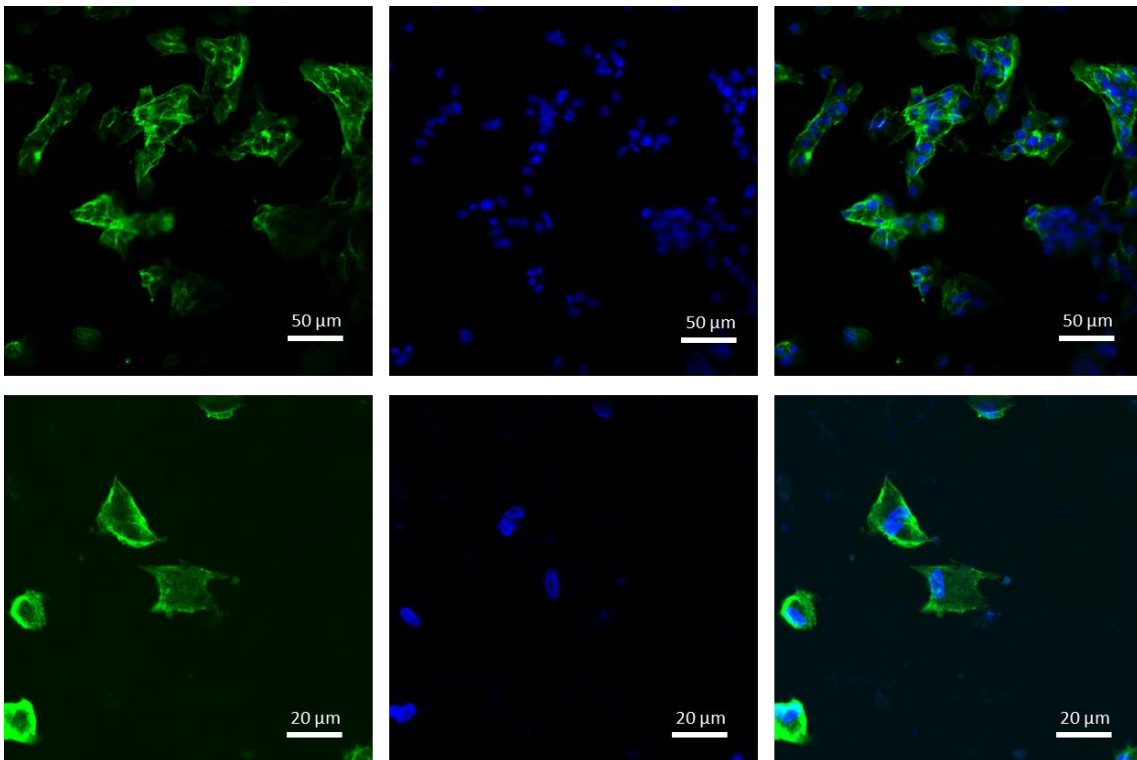


Figura 65. Imágenes al microscopio confocal de los fibroblastos sobre la superficie ZLS a magnificación 20x (fila superior) y 40x (fila inferior).

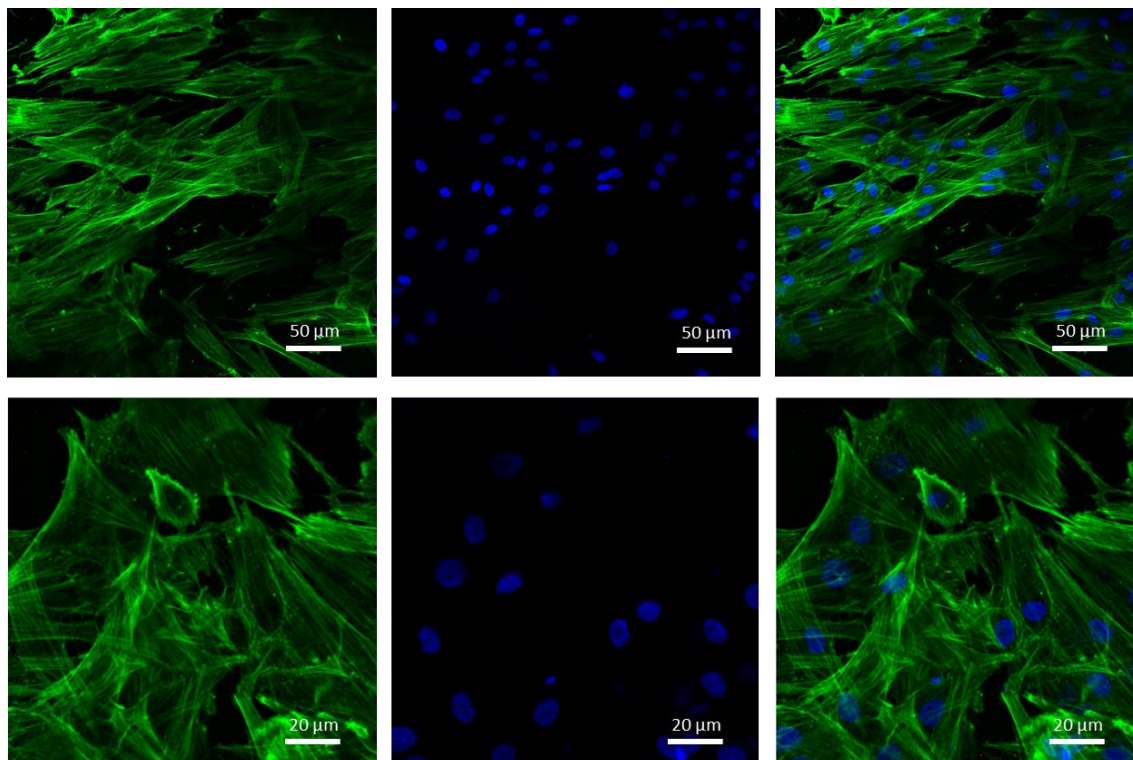


Figura 66. Imágenes al microscopio confocal de los fibroblastos sobre la superficie Y-TZP a magnificación 20x (fila superior) y 40x (fila inferior).

Pasadas 24 horas del cultivo se pudo observar que la distribución celular difirió según el material empleado.

En los discos control se pueden observar células de gran tamaño, con aspecto fusiforme, ampliamente expandidas y distribuidas en forma de haces paralelos entre ellos. Puede observarse una elevada densidad de filamentos de actina largos y rectos tanto en la periferia como intracelulares.

Las células cultivadas en los discos de ZLS se disponen en agregados, de menor tamaño, con una forma más redondeada y poco expandidas. Presentan mayor tinción de las fibras de estrés en la periferia siendo mucho menor la densidad de estas fibras en la zona intracelular, apenas imperceptibles.

En los discos de Y-TZP se observan también haces celulares, pero con menor densidad y de distribución menos uniforme que en el caso del control. Las células aparecen expandidas, de aspecto fusiforme. Se observa una elevada densidad de fibras de estrés tanto en la periferia como en el interior celular, siendo sin embargo menor en densidad y longitud que en el grupo control.

Estas imágenes coinciden con el análisis cuantitativo, en el que se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en todas las variables celulares estudiadas, siendo menores - a excepción de los parámetros de circularidad y factor de forma- los valores obtenidos en la superficie ZLS.

6.4 ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD DEL MATERIAL

Se evaluó la tasa de viabilidad celular por contacto directo de las células con el disco. El tiempo previo de incubación fue de 24 horas y se sembraron 1×10^5 células/disco. Se midió la tasa de viabilidad celular con el reactivo MTT a las 24, 48 y 72 horas calculando el porcentaje de células viables a partir de la lectura de absorbancias a 590 nm y así obtener el grado de citotoxicidad de los materiales estudiados.

En la figura 67 se puede observar la formación de cristales de formazán en el interior de las células cultivadas sobre una superficie control de poliestireno, pudiéndose ver una primera fase de cristales en forma de gránulos intracelulares que van aumentando de tamaño con el paso del tiempo. En una fase más tardía, los gránulos se proyectan hacia el espacio extracelular dando lugar a cristales en forma de aguja. Se trata de cristales excitados de formazán, que se forman ante el exceso de producción.

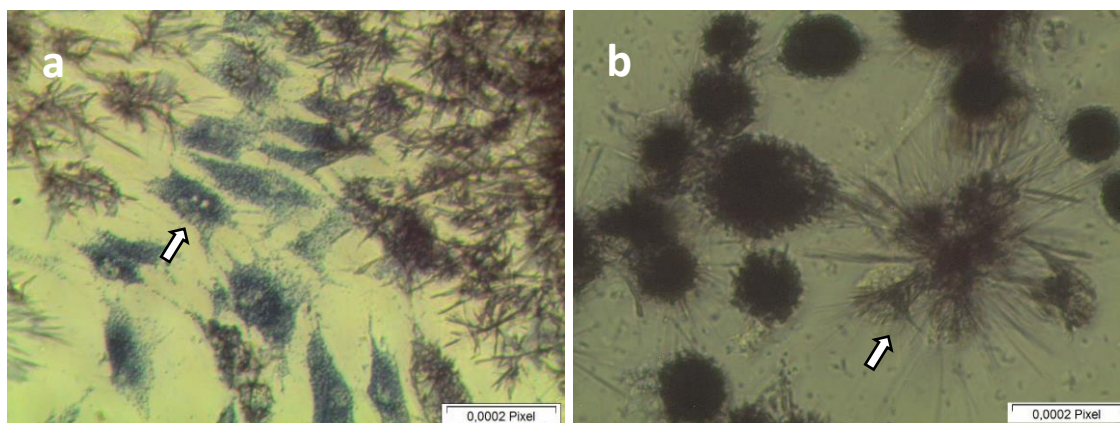


Figura 67. Reducción del MTT, (a): células con cristales de formazán en forma de gránulos (flecha) y (b): cristales en forma de aguja.

En la tabla 14 se puede observar la media aritmética y la desviación estándar para cada variable analizada. Al grupo control se le otorgó el valor de 100% de viabilidad y a partir de este dato se calculó el resto de los valores de viabilidad de las muestras estudiadas. La tasa de viabilidad fue superior sobre la superficie Y-TZP con respecto a ZLS a las 24 horas, alcanzando valores similares en ambos grupos a las 48 y 72 horas. La mayor citotoxicidad se observó en el grupo ZLS a las 24 horas (figura 68).

Resultados

Tasa de viabilidad (%)	Grupos	Media \pm Desv. Estándar
24 horas	Control	100
	ZLS	42,20 \pm 2,74
	Y-TZP	54,74 \pm 3,90
48 horas	Control	100
	ZLS	60,51 \pm 2,69
	Y-TZP	62,04 \pm 3,26
72 horas	Control	100
	ZLS	89,98 \pm 4,97
	Y-TZP	92,19 \pm 3,69

Tabla 14. Valores medios y desviación estándar de las tasas de viabilidad en los tramos de tiempo analizados en base al control (24, 48 y 72h).

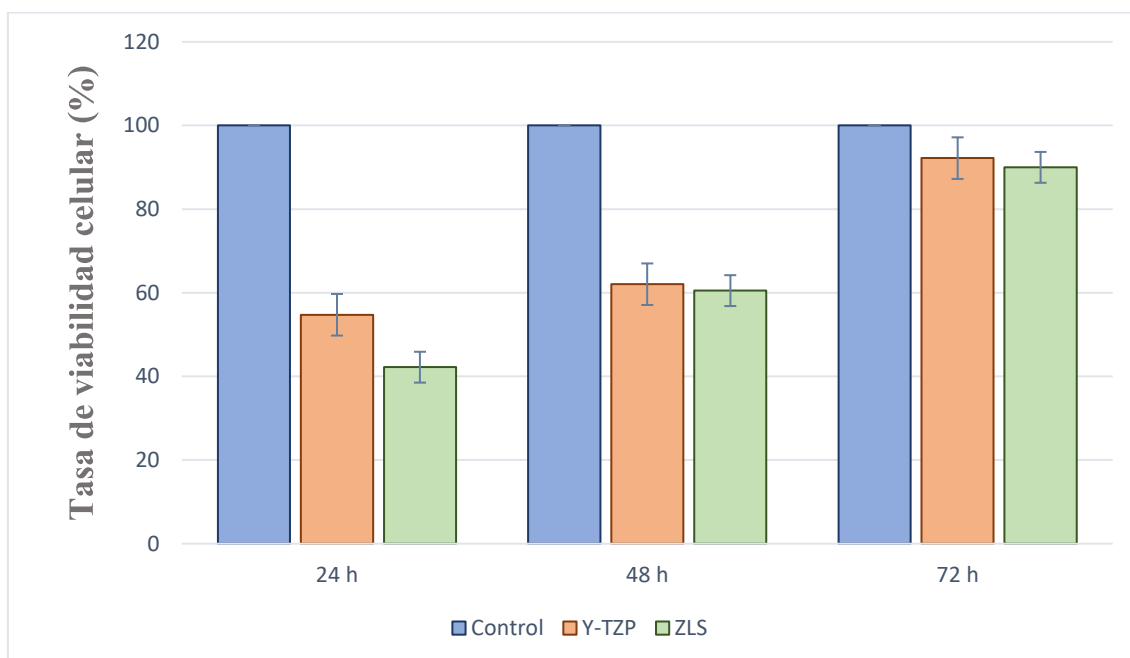


Figura 68. Valores medios de viabilidad celular por tramos de tiempo expresados como porcentajes relativos al control.

Se observó una distribución normal de las variables estudiadas y se aplicó el test ANOVA para la comparación de medias. Las diferencias entre los grupos se realizaron con las pruebas de Bonferroni y Games-Howell y la *d* de Cohen para cuantificar el tamaño del efecto. Se empleó el índice de varianza omega cuadrado (ω^2) para cuantificar qué porcentaje de variabilidad total en la variable viabilidad celular fue otorgable al material empleado.

En las tablas 15-18 se pueden observar los resultados del análisis de varianza y las comparaciones entre los grupos, en los que se observó diferencia estadísticamente significativa en la viabilidad celular a las 24 horas entre ambos materiales de estudio Y-TZP y ZLS ($p < 0,05$) (tabla 16).

Tasa de viabilidad (%)	Estadístico F	p
24 horas	973,73	<0,001
48 horas	669,63	<0,001
72 horas	17,33	<0,001

Tabla 15. Resultados del análisis de varianza de un factor (ANOVA).

Variable dependiente	Grupo (I)	Grupo (J)	p
	Control	ZLS	<0,001*
Viabilidad 24 horas	Control	Y-TZP	<0,001*
	Y-TZP	ZLS	<0,001*

Tabla 16. Comparaciones múltiples de los grupos. Test de Games-Howell.

Variable dependiente	Grupo (I)	Grupo (J)	p
	Control	ZLS	<0,001*
Viabilidad 48 horas	Control	Y-TZP	<0,001*
	Y-TZP	ZLS	0,674

Tabla 17. Comparaciones múltiples de los grupos. Test de Bonferroni.

Variable dependiente	Grupo (I)	Grupo (J)	p
	Control	ZLS	0,002*
Viabilidad 72 horas	Control	Y-TZP	0,001*
	Y-TZP	ZLS	0,583

Tabla 18. Comparaciones múltiples de los grupos. Test de Games-Howell.

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

Resultados

Todos los grupos de estudio presentaron diferencias estadísticamente significativas con el grupo control en los tres tramos de tiempo analizados. Sólo se observó diferencia entre los grupos Y-TZP y ZLS en el tramo de 24 horas, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos a las 48 ni 72 horas.

En las tres variables analizadas existen diferencias entre los grupos ($p < 0,001$) siendo común en todos ellos la diferencia estadísticamente significativa del grupo control con respecto a los dos grupos de estudio.

La tasa de viabilidad a las 24 horas mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F(2, 46) = 973,73$ $p < 0,001$). Aproximadamente un 98 % de la varianza total en el tamaño medio del núcleo es debido al tipo de material empleado ($\omega^2 = 0,98$).

La viabilidad fue superior en el grupo control (100%), seguido del grupo Y-TZP ($54,74 \pm 3,90$) y de ZLS ($42,20 \pm 2,74$).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos: control e Y-TZP ($p < 0,001$) $d = 16,39$ (efecto grande); entre grupo control y ZLS ($p < 0,001$) $d = 29,73$ (efecto grande) y entre ZLS e Y-TZP ($p < 0,001$) $d = 3,71$ (efecto grande).

La tasa de viabilidad a las 48 horas mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F(2, 46) = 669,63$ $p < 0,001$). Aproximadamente un 98 % de la varianza total en el tamaño medio del núcleo es debido al tipo de material empleado ($\omega^2 = 0,98$).

La viabilidad fue superior en el grupo control (100%), seguido del grupo Y-TZP ($62,04 \pm 3,26$) y de ZLS ($60,51 \pm 2,69$).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control e Y-TZP ($p < 0,001$) $d = 16,44$ (efecto grande) y entre grupo control y ZLS ($p < 0,001$) $d = 20,71$ (efecto grande). No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Y-TZP y ZLS ($p = 0,674$).

La tasa de viabilidad a las 72 horas mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F(2, 46) = 17,33$ $p < 0,001$). Aproximadamente un 57 % de la varianza total en el tamaño medio del núcleo es debido al tipo de material empleado ($\omega^2 = 0,57$).

La viabilidad fue superior en el grupo control (100%), seguido del grupo Y-TZP ($92,19 \pm 3,69$) y de ZLS ($89,98 \pm 4,97$).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control e Y-TZP ($p = 0,001$) $d = 2,98$ (efecto grande) y entre grupo control y ZLS ($p = 0,002$) $d = 2,84$ (efecto grande). No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Y-TZP y ZLS ($p = 0,583$).

6.5 ESTUDIO DE SECRECIÓN DE COLÁGENO TIPO I

Se cuantificó la secreción de colágeno tipo I liberado al medio a las 24 y 72 horas sin cambios de medio de cultivo. Se realizaron varias pruebas en cuanto a la densidad celular a sembrar para obtener lectura de la proteína producida, ya que se trata de una técnica muy sensible con resultados del orden de nanogramos. Se determinó una densidad de 3×10^5 células/disco en un volumen de cultivo de 500 μ l. La lectura de los patrones permitió obtener una curva estándar (figura 69) a partir de la cual, se pudieron extrapolar las densidades ópticas obtenidas en las muestras y así obtener la concentración de colágeno.

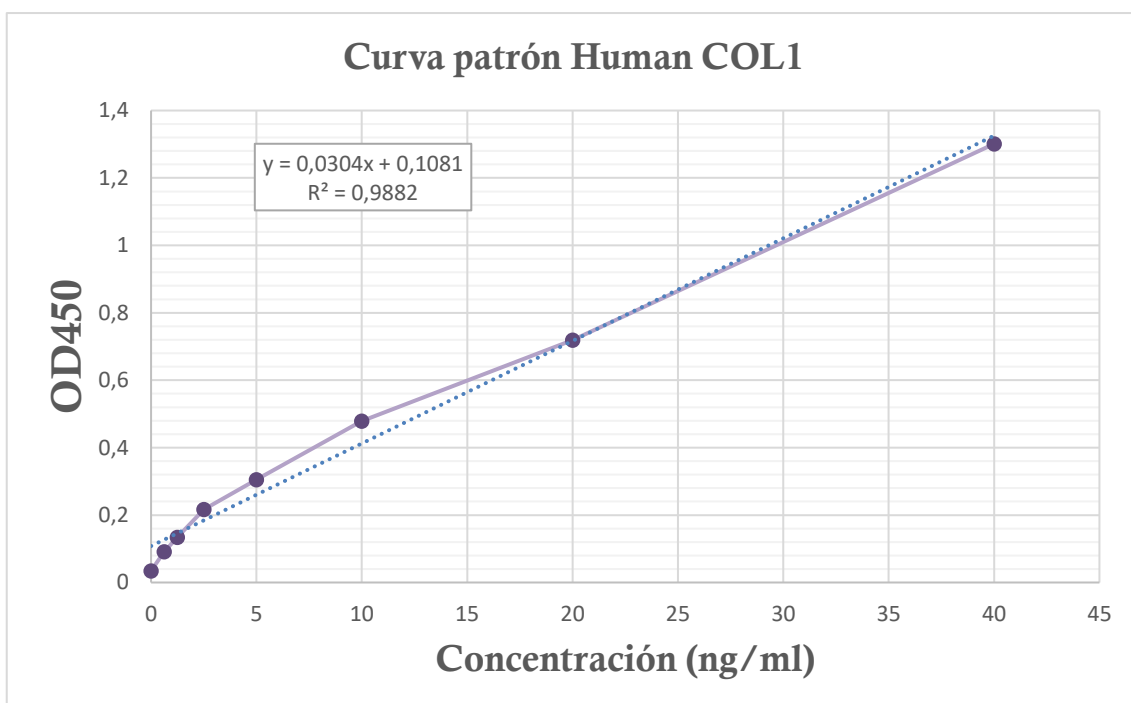


Figura 69. Curva estándar obtenida a partir de la lectura de los patrones. Ecuación de la recta para obtener las concentraciones de las muestras y coeficiente de determinación R^2 que indica la idoneidad de la curva patrón por ser su valor cercano a 1.

Resultados

En la tabla 19 se puede observar la media aritmética y la desviación estándar para cada tramo de tiempo analizado.

La tasa de secreción de colágeno al medio fue superior por parte de las células cultivadas en la superficie de Y-TZP con respecto a los otros dos materiales, siendo el control en el que se observó menor secreción. A las 72 horas, la secreción de colágeno se vio reducida en todos los grupos, siendo de nuevo la mayor secreción en Y-TZP (figura 70).

Secreción de colágeno tipo I (ng/ml)	Grupos	Media \pm Desv. Estándar
24 horas	Control	1,63 \pm 0,22
	ZLS	3,77 \pm 0,30
	Y-TZP	3,89 \pm 0,14
72 horas	Control	0,21 \pm 0,03
	ZLS	0,6 \pm 0,08
	Y-TZP	1,50 \pm 0,08

Tabla 19. Valores medios y desviación estándar de las tasas de secreción de colágeno.

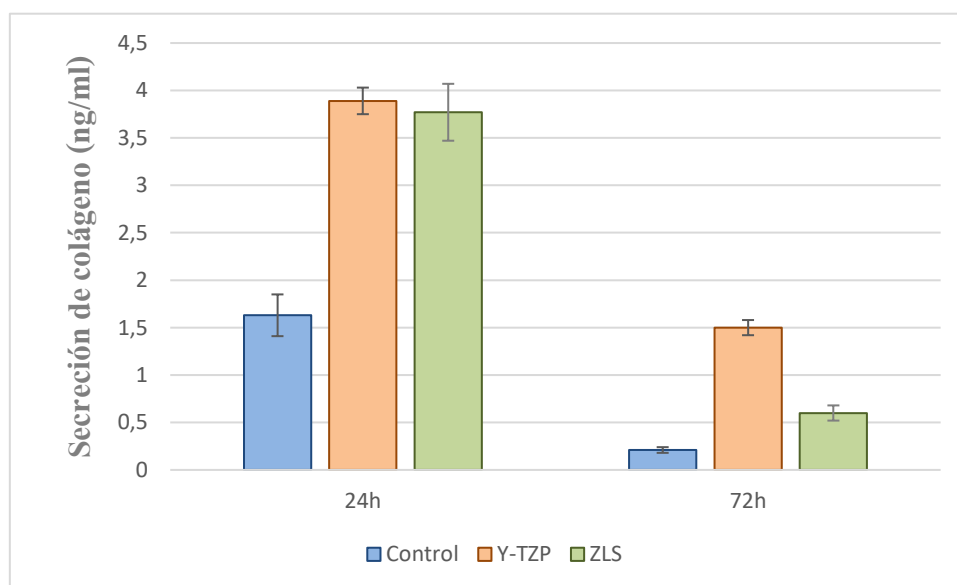


Figura 70. Secreción de colágeno tipo I a las 24 y 72 horas de cultivo celular.

Se observó una distribución normal de las variables estudiadas y se aplicó el test ANOVA para la comparación de medias. La valoración de las diferencias entre los grupos se realizó con las pruebas de Bonferroni y Games-Howell y la *d* de Cohen para cuantificar el tamaño del efecto. Se empleó el índice de varianza omega cuadrado (ω^2) para cuantificar qué porcentaje de variabilidad total en la variable viabilidad celular fue otorgable al material empleado.

En las tablas 20-22 se pueden observar los resultados del análisis de varianza y las comparaciones entre los grupos. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos materiales de estudio a las 72 horas ($p < 0,05$) (tabla 22).

Secreción de colágeno tipo I (ng/ml)	Estadístico F	p
24 horas	117,27	<0,001
72 horas	311,79	<0,001

Tabla 20. Resultados del análisis de varianza de un factor (ANOVA).

Variable dependiente	Grupo (I)	Grupo (J)	p
	Control	ZLS	<0,001*
Colágeno 24 horas	Control	Y-TZP	<0,001*
	Y-TZP	ZLS	0,766

Tabla 21. Comparaciones múltiples de los grupos. Test de Bonferroni.

Variable dependiente	Grupo (I)	Grupo (J)	p
	Control	ZLS	0,003*
Colágeno 72 horas	Control	Y-TZP	<0,001*
	Y-TZP	ZLS	<0,001*

Tabla 22. Comparaciones múltiples de los grupos. Test de Bonferroni.

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

Resultados

Todos los grupos de estudio presentaron diferencias estadísticamente significativas con el grupo control en los dos tramos de tiempo analizados. Se observó diferencia entre los grupos Y-TZP y ZLS en el tramo de 72 horas, no habiendo diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos a las 24 horas.

En los dos tramos de tiempo existen diferencias entre los grupos ($p < 0,001$) siendo común en todos ellos la diferencia estadísticamente significativa del grupo control con respecto a los dos grupos de estudio.

La secreción de colágeno a las 24 horas mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F(2, 30) = 117,27$ $p < 0,001$). Aproximadamente un 95 % de la varianza total en la secreción es debido al tipo de material empleado ($\omega^2 = 0,95$).

La secreción de colágeno fue superior en el grupo Y-TZP ($3,89 \pm 0,14$), seguido del grupo ZLS ($3,77 \pm 0,30$) y del control ($1,63 \pm 0,22$).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control e Y-TZP ($p < 0,001$) $d = 11,91$ (efecto grande) y entre grupo control y ZLS ($p < 0,001$) $d = 7,96$ (efecto grande). No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Y-TZP y ZLS ($p = 0,766$).

La secreción de colágeno a las 72 horas mostró diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos ($F(2, 30) = 311,79$ $p < 0,001$). Aproximadamente un 98 % de la varianza total en la secreción es debido al tipo de material empleado ($\omega^2 = 0,98$).

La secreción de colágeno fue superior en el grupo Y-TZP ($1,50 \pm 0,08$), seguido del grupo ZLS ($0,6 \pm 0,08$) y del grupo control ($0,21 \pm 0,03$).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos: la mayor diferencia se observó entre control e Y-TZP ($p < 0,001$) $d = 19,16$ (efecto grande); seguido de Y-TZP y ZLS ($p < 0,001$) $d = 10,16$ (efecto grande) y de control y ZLS ($p = 0,003$) $d = 5,78$ (efecto grande).

Discusión



7. DISCUSIÓN

El material con el que se confecciona un aditamento implantológico es un factor importante que influye en la respuesta de los tejidos que están a su alrededor y que puede ser determinante en el pronóstico a largo plazo de la salud de los mismos. En los últimos años se han comercializado distintos tipos de materiales orientados a mejorar las propiedades mecánicas y estéticas de los materiales habitualmente empleados como son el titanio y la circonia. El silicato de litio reforzado con circonia es un material de nueva generación concebido para suplir las deficiencias estéticas de la circonia, pero pocos estudios se han llevado a cabo acerca del tipo de respuesta que este material genera en los tejidos circundantes.

El propósito de este estudio es evaluar y comparar la respuesta celular temprana de HGFs cultivados sobre superficies de Y-TZP y ZLS a nivel citomorfométrico, proliferativo, citotóxico y de secreción de colágeno tipo I. Es imprescindible analizar las características fisicoquímicas de los materiales de estudio antes de analizar el comportamiento fibroblástico, es por ello por lo que además se realizó un estudio de caracterización de ambas superficies a nivel de composición, topografía, perfilometría y humectabilidad.

En esta tesis se llevaron a cabo varios estudios *in vitro* para analizar el comportamiento celular por contacto directo con los materiales bajo unas condiciones de trabajo controladas. Se han evaluado diferentes variables citomorfométricas para valorar de forma cuantitativa y cualitativa la respuesta fibroblástica sobre tres superficies diferentes. Los estudios *in vitro* suelen presentar mayor sensibilidad a ensayos de citotoxicidad que los estudios *in vivo*. Además, permiten estudiar el metabolismo celular de forma individualizada como por ejemplo la secreción de colágeno en un cultivo homogéneo.²⁸⁹

Se rechazó la hipótesis nula de igualdad de influencia de ambas superficies sobre el comportamiento celular. Se observó mayor número de células con mejores parámetros citomorfométricos y mayor cubrimiento del disco Y-TZP. Ambos materiales mostraron una moderada citotoxicidad en las primeras 24 horas de contacto directo, siendo en ZLS la que se observó menor viabilidad celular ($p < 0,001$). La citotoxicidad se fue reduciendo con el paso de las horas sin encontrar diferencias estadísticamente significativas a partir de las 48 horas, alcanzando niveles biológicamente aceptables ($>70\%$ viabilidad) a las 72 horas. Así mismo, la secreción de colágeno no reveló superioridad de una superficie respecto a otra a las 24 horas, aunque Y-TZP fue significativamente superior a las 72 horas ($p < 0,001$).

La respuesta celular que se produce al colocar un aditamento implantológico depende de múltiples variables como la topografía, la composición química de la superficie o el fenotipo de la línea celular cultivada.²⁹⁰

7.1 Tipo de célula empleada en los cultivos

Tras la colocación de un aditamento implantológico se produce el cierre de la herida por parte de la mucosa periimplantaria, la cual tiene un papel fundamental en el sellado de los tejidos blandos a través del establecimiento de un anclaje transmucoso en la zona transgingival de los implantes.²⁹¹

Una parte de la mucosa periimplantaria es el tejido conectivo, el cual está en contacto con la interfase entre el aditamento y el implante. Las células mayoritarias del tejido conectivo son los fibroblastos, los cuales se organizan y contactan con el aditamento a través de contacto focales y es por ello por lo que fueron las células escogidas para realizar este estudio *in vitro*.

En este estudio se emplearon fibroblastos gingivales humanos y se analizó su comportamiento al cultivarlos sobre las diferentes superficies. No obstante, se obtuvieron valores de conteo celular medio con desviaciones estándar muy amplias, hecho reportado por otros autores.²⁹² Este suceso podría ser debido a la utilización de células de pases crecientes y no siempre del mismo número de pase para cada una de las repeticiones del experimento. Todo ello podría dar lugar a una menor proliferación celular cuanto más elevado sea el número de pase, como ya lo demostraron Kent y cols. en su estudio de fibroblastos gingivales.²⁹³

Por otro lado, los queratinocitos son células que también han sido estudiadas dada su relevancia en el complejo de inserción del epitelio de unión. Varios autores han realizado estudios comparativos de comportamiento de queratinocitos y fibroblastos sobre distintas superficies.^{294,295} En uno de los estudios, la viabilidad y capacidad de migración se vio influenciada negativamente en los queratinocitos al sembrarlos sobre superficies de circonia con distinta composición entre ellos, no así en los fibroblastos.²⁹⁴ Grenade y cols. obtuvieron mejores resultados en cuanto a viabilidad, número y cubrimiento celular al cultivar fibroblastos y queratinocitos sobre superficies de titanio y circonia al compararlas con cerámicas de disilicato de litio.^{292,296} Sin embargo, Northdurft y cols. cultivaron células epiteliales y fibroblastos obteniendo distinta respuesta celular entre ambas líneas celulares al cultivarlas sobre superficies de titanio y circonia con diferentes tratamientos de superficie. Ambos tipos de células tuvieron mayor proliferación en superficies rugosas, hallazgo significativo ya que hasta el momento se había reportado mayor proliferación de células epiteliales sobre superficies lisas.^{295,297}

7.2 Importancia del material empleado para la organización de los tejidos blandos periimplantarios

La remodelación de los tejidos alrededor del aditamento implantológico—bien sea en el momento de colocación del implante o en un tiempo posterior de segunda fase quirúrgica—es un procedimiento delicado que suele durar varias semanas.³⁸

Abrahamsson y cols. en 1998 demostraron que el material del aditamento que conecta con el implante es un factor determinante en el lugar de establecimiento del tejido conectivo que constituye el anclaje transmucoso. Además, el desplazamiento apical del tejido epitelial puede suponer una consecuente pérdida ósea en la zona.²⁹⁸

Los estudios realizados hasta la fecha sobre el silicato de litio reforzado con circonia son ensayos *in vitro* acerca de sus propiedades mecánicas a nivel de adaptación marginal,²⁹⁹ resistencia a la fatiga,³⁰⁰ resistencia a la fractura^{152,157,301,302-304} ajuste interno³⁰⁵ o su resistencia al desgaste.^{306,307} Hasta donde tenemos conocimiento, no hay estudios clínicos publicados de comportamiento de ZLS como aditamento implantológico.

Las propiedades mecánicas de la circonia se han comparado con otros materiales como el titanio, disilicato de litio (LS₂) y ZLS. La circonia presenta mejores propiedades que LS₂ y ZLS pero se ve superado por el titanio.³⁰⁸ Sin embargo, la circonia ofrece ventajas a nivel estético con respecto a este último.³⁰⁹

Por otro lado, sí se ha estudiado la repuesta de los tejidos blandos periimplantarios con circonia como material de aditamento implantológico. No obstante, los datos disponibles en la literatura acerca de su uso proporcionan una información contradictoria al compararlo con el titanio. Existen estudios que no evidenciaron diferencias de comportamiento entre ambos,^{297,310-312} otros demostraron la superioridad de la circonia en factores como el infiltrado inflamatorio o la viabilidad celular,^{81,313-315} y sin embargo otros reportaron la superioridad del titanio en lo que se refiere a estos mismo factores.³¹⁶

De acuerdo con un estudio llevado a cabo por Welander y cols., el empleo de materiales como el titanio y la circonia permiten una buena adaptación de la mucosa alrededor del aditamento con el consiguiente mantenimiento de las dimensiones de los tejidos blandos circundantes. Al comparar estos dos materiales con aditamentos de aleación de oro/paladio, observaron retracción epitelial y pérdida ósea en estos últimos; además, la parte de tejido conectivo en contacto con el aditamento presentó mayor cantidad de células inflamatorias leucocitarias y menor cantidad de colágeno y fibroblastos.³¹⁷ La encía circundante en los aditamentos de circonia fue la que presentó una menor cantidad de células inflamatorias, siendo posiblemente debido una menor adherencia microbiana, hecho reportado por otros estudios clínicos e *in vitro*.^{278,318,319}

En el último informe de consenso publicado por la *European Association for Osseointegration* se evaluó la influencia del material del aditamento sobre la salud y estabilidad de los tejidos periimplantarios. Se concluyó que los aditamentos de titanio generan mayor sangrado al sondaje con respecto a la circonia, siendo esta diferencia estadísticamente significativa³¹³. Se desprende del informe el potencial de la circonia de acumular una menor cantidad de placa sobre su superficie.³¹⁴

En una revisión sistemática realizada por Linkevicius y cols. sobre la influencia de los aditamentos de circonia y titanio sobre la mucosa periimplantaria, concluyeron que, a pesar de que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos materiales a nivel de profundidad de sondaje, sangrado al sondaje, nivel de hueso marginal ni recesión de tejidos blandos, la circonia es significativamente más favorable que el titanio en cuanto a la apariencia de los tejidos blandos.³¹¹ Este estudio concuerda con los publicados por Sampatanukul y cols. y Hu y cols. en los que se observó que el anclaje histológico alrededor de aditamentos de titanio y circonia y su tasa de supervivencia fue prácticamente similar no habiendo diferencia estadísticamente significativa entre ambos materiales, siendo mejor la circonia para el mantenimiento del nivel de hueso marginal.^{312,320}

Contrariamente a las anteriores publicaciones, en un estudio reciente se evaluó en ratas el tejido epitelial alrededor de implantes de dos piezas con la parte coronal de circonia o titanio. Se observó que los tejidos de alrededor de la superficie de circonia presentaban una estructura adhesiva inmadura y por lo tanto un sellado tisular insuficiente al compararlos con los de titanio. Estos resultados fueron confirmados con un estudio paralelo *in vitro* en el que se observó una menor expresión de proteínas de adhesión sobre la superficie de circonia.³¹⁶

Por otro lado, existe consenso en cuanto a las ventajas estéticas que proporciona la circonia. En los casos de biotipo fino con grosor de tejido blando menor o igual a 2 mm, los aditamentos de circonia crean mejor estética.³²¹⁻³²⁵ Estos resultados están en concordancia con una revisión sistemática realizada anteriormente sobre el empleo de circonia como material de aditamento³²⁶ y con los resultados clínicos obtenidos por otros autores.³²⁷⁻³³⁰

7.3 Composición y topografía de superficie: factores influyentes en la respuesta celular

La composición del material es un factor muy influyente en la respuesta celular, siendo la circonia y el titanio los materiales donde se ha observado un mejor mantenimiento de la barrera mucoepitelial.³¹⁷.

El disilicato de litio reforzado con circonia (ZLS) se comercializa bajo los nombres de Celtra[®] Duo (Dentsply) y Vita Suprinity[®] (VITA). La composición de ambos materiales varía ligeramente en cuanto a los componentes y su porcentaje de contenido en masa (wt%): Suprinity[®] presenta óxido de potasio (K_2O : 1-4 %wt) mientras que Celtra[®] Duo presenta óxido de terbio (Tb_2O_3 : 1 %wt) lo cual podría influir sobre la respuesta celular, hecho ya reportado por otros autores en el caso de la circonia.²⁹⁴

En nuestro estudio, la composición de Y-TZP fue la esperada al detectarse principalmente óxido de circonio (ZrO_2) y óxido de itrio (Y_2O_3). En el caso de ZLS, el porcentaje en masa de óxido de circonio (16,72 wt%) a través del análisis EDS fue superior a la anunciada por el fabricante (10 wt%).¹⁴² Por otro lado, no se pudo detectar óxido de litio (uno de los compuestos de este material) debido al bajo número atómico del litio ($Z=3$; $A=6,94$ u), hecho reportado por otros autores.^{153,158} El pentóxido de fósforo (P_2O_5) detectado, es un aditivo habitual en la fabricación de cerámicas con matriz vítrea para la cristalización del sistema SiO_2 - Li_2O - Al_2O_3 .³³¹

Como se comentó anteriormente, factores como la topografía o la rugosidad pueden influir sobre la morfología celular, su función o su organización.^{252,332} El silicato de litio reforzado con circonia presenta una estructura mixta en la que la matriz vítrea tiene una distribución atómica aleatoria y dentro de esta matriz se encuentra una fase cristalina constituida por partículas con distribución atómica ordenada.³³³ Se trata por tanto de una superficie heterogénea. Su topografía ha sido analizada por varios autores mediante grabado ácido y análisis FE-SEM. Riquieri y cols. mostraron que presenta partículas de circonia disueltas en la matriz vítrea pero también presenta múltiples cráteres y defectos circulares con burbujas de aire por ausencia de la matriz vítrea en algunas zonas del material.^{153,334}

La circonia es una cerámica principalmente cristalina, no presenta fase vítrea y es químicamente más estable. Es difícilmente hidrolizable y más homogénea a nivel composicional.^{335,336} Sin embargo, después del proceso de sinterizado, presenta una superficie menos homogénea y una mayor rugosidad debido al engrosamiento granular inducido y al estrés residual. Además, sufre una contracción volumétrica con la formación de porosidades sobre su superficie y la transformación del material de fase monoclinica a tetragonal.³³⁷⁻³³⁹

En este estudio, ambas muestras presentaron una superficie irregular con defectos de superficie observados en las imágenes SEM. Sin embargo, la mayor homogeneidad a nivel composicional y el patrón en surcos concéntricos (característicos del maquinado) de Y-TZP podrían ser dos factores que hayan dado lugar a una mejor respuesta de las células cultivadas sobre su superficie.

El comportamiento celular se ve influido por superficies con un patrón en surcos con una periodicidad, guiando el anclaje de los fibroblastos sobre su superficie.^{310,340} Pae y cols. cultivaron fibroblastos en titanio y en dos tipos de

superficie de circonia: una superficie lisa y otra en la que se crearon microsurcos. Tras veinticuatro horas, se observó mayor proliferación celular en la superficie con microsurcos. Los fibroblastos presentaron una morfología aplanada, mejor esparcidos y orientados siguiendo la dirección de los surcos. Aquellos cultivados en superficies lisas presentaron menor proliferación y esparcimiento con dirección aleatoria. De este descubrimiento, propusieron la idea de crear microsurcos en los pilares implantológicos transmucosos ya que, si el anclaje fue mayor en esa zona, el sellado biológico sería mayor, se inhibiría la migración apical del epitelio y la adhesión bacteriana debería ser menor.⁴⁷ No obstante, existen estudios que postulan lo contrario como Pabst y cols. que sugieren que las superficies lisas son las que aumentan la adherencia y viabilidad celular y menor adhesión bacteriana.^{294,339}

En nuestro estudio puede verse la formación de haces de fibroblastos, pero al no haber evaluado el cultivo celular en microscopio de barrido, no es posible afirmar si estos haces seguían la dirección de los surcos concéntricos que caracterizan a la superficie de este material.

En las superficies con topografía heterogénea, los fibroblastos necesitan más tiempo para su estabilización mecánica inicial en la superficie en comparación con los que crecen en superficies más homogéneas.^{279,294,340,341} Los fibroblastos cultivados sobre superficies lisas aparecen más elongados y esparcidos debido a que para estabilizarse mecánicamente necesitan desarrollar una red fuerte de fibras de actina del citoesqueleto, hecho probablemente acontecido en los fibroblastos cultivados sobre la superficie de Y-TZP en el que las células mostraron mayor extensión de los filamentos de actina y fenotipo fusiforme. Por otro lado, aquellos cultivados sobre una superficie rugosa están apoyados sobre las irregularidades topográficas, no necesitando desarrollar una red de filamentos de actina para estabilizarse.^{340,342,343} Este hecho podría explicar la diferente morfología observada en las células adheridas entre las dos superficies de este estudio.

Nothdurft y cols. demostraron que el área celular es menor en aquellas superficies más rugosas. De este hallazgo se dedujo que, al igual que en este estudio, las irregularidades del substrato podrían haber representado una barrera a la extensión de los filamentos de actina del citoesqueleto sobre la superficie.^{295,344}

No existe consenso en cuanto a cuál es la mejor superficie que ha de tener un aditamento implantológico para crear un buen sellado mucoso y que así se evite el paso de bacterias. Algunas publicaciones mencionan la importancia de que esta superficie sea lisa^{81,310,342,345} mientras que otras han demostrado que son preferibles las superficies rugosas, ya sea a través del arenado de la superficie^{32,295} con crecimiento celular aleatorio o bien a través de la creación de un patrón rugoso a escala micro y nanométrica⁴⁷ que favorezcan el anclaje, la dirección de proliferación y el esparcimiento de los fibroblastos en la dirección de los surcos creados.

Se ha demostrado que las características de los patrones nanométricos pueden quedar “imprimidos” en los fibroblastos, ya que el citoesqueleto celular adaptaría su forma a las características del patrón de superficie, fenómeno denominado “nanoimpresión”.³⁴⁶ En este mismo sentido, las células – a través de la mecanotransducción directa – también tienen la capacidad de generar cambios conformacionales en el núcleo, la disposición cromosómica y la expresión genética; todo ello inducido por la topografía de superficie.³⁴⁷

Las investigaciones actuales buscan obtener la mejor superficie combinando el diseño de la topografía a nivel micro y nanométrico con el recubrimiento de la superficie con diferentes proteínas presentes de forma natural en la MEC para mejorar la respuesta celular. Una de estas investigaciones es la llevada a cabo por Ngandu y cols., que realizaron un estudio en el que analizaron si se daba mayor adhesión celular en superficies con características nanométricas y compararlas con otras a las que además se les añadió una capa de recubrimiento homogéneo de fibronectina. Los resultados mostraron que las adhesiones focales de mayor tamaño se correspondieron con este último tipo de superficie.³⁴⁷

La rugosidad es otro factor que influye en la adhesión celular a una superficie. De acuerdo con autores como Fischer y cols. y Kournetas y cols. es necesario replantearse la forma en la que se aplican los parámetros de rugosidad a los estudios *in vitro*. El valor de rugosidad aritmética Ra o tridimensional Sa son factores limitados en topografías complejas y son parámetros que a su vez depende de otros muchos factores como la técnica empleada o las condiciones de experimentación.^{342,348} El problema que plantea el uso de parámetros basados en rangos es que superficies con topografías muy diferentes pueden presentar un valor de Ra o Sa similares. Esto es especialmente importante en aquellas superficies en las que se aplican varios tipos de tratamiento de superficie en los que se crean microrrugosidades y macrorrugosidades que a su vez se suman a la rugosidad global y en consecuencia quedan reflejas de forma poco específica con estos parámetros. Sería adecuado establecer rangos diferenciados de microrrugosidades y macrorrugosidades, y así poder correlacionarlas de forma individual con la adsorción proteica y la adhesión celular.²⁷⁹

Es importante tener en cuenta que comparar los resultados obtenidos en este estudio con otros estudios publicados a nivel de respuesta celular, basándose en el valor de rugosidad, en una cuestión complicada. En nuestro caso, el estudio perfilométrico se llevó a cabo de acuerdo con la norma ISO 25178, no siendo empleada por otros estudios revisados y haciendo por lo tanto más difícil la comparación de resultados.²⁸⁰

La rigidez del sustrato es otro factor altamente relevante en el comportamiento celular, pudiendo llegar a ser más relevante que la composición química o la hidrofiliidad de superficie.^{340,343,349} Es sabido que los fibroblastos presentan la habilidad de percibir y responder a la rigidez del sustrato, teniendo

preferencia por superficies rígidas.^{350,351} Diversos estudios realizados con sustratos de rigidez creciente revelan que, a mayor incremento del módulo de elasticidad del sustrato, mayor era la proliferación, área, longitud, densidad celular y número de adhesiones focales sobre la superficie. Todo ello permite un mayor contacto célula-célula, lo cual estimula la elongación y el desarrollo de fibras del estrés del citoesqueleto, dando lugar a un fenotipo fusiforme.^{67,349-354} En este sentido, los fibroblastos no presentarían una rigidez predefinida, sino que ajustarían su rigidez intracelular, reorganizando la estructura de los filamentos de actina del citoesqueleto, para hacerla coincidir con la del sustrato sobre la que están cultivados.³⁵⁵

Los resultados de nuestro estudio son consistentes con lo anteriormente mencionado. La superficie de Y-TZP presenta un módulo de elasticidad (210 GPa)³⁵⁶ superior al de ZLS (70 GPa)^{148,306} y ello se refleja en las diferencias citomorfométricas observadas, siendo superiores tanto los parámetros citométricos (área, perímetro, longitud del axis mayor del citoesqueleto) como el número y el cubrimiento celular en la superficie de Y-TZP con respecto a ZLS.

7.4 Influencia de la humectabilidad de superficie en el anclaje celular

La humectabilidad de superficie depende de otros factores como la composición química, la topografía, la rugosidad, la rigidez o los grupos funcionales presentes en su superficie. Todos ellos están implicados en las interacciones biológicas en la interfase célula-superficie que va desde la adsorción molecular y proteínica hasta la formación de placa bacteriana.^{75,84}

Cuando la superficie de un material se expone a un medio acuoso como pueda ser el medio de cultivo con suero, el anclaje, esparcimiento y organización del citoesqueleto celular son mayores en aquellas superficies hidrófilas con respecto a las hidrófobas. La correlación entre el ángulo de contacto en agua (θ_w) y la energía libre de superficie de un sólido (SFE) permiten predecir el comportamiento celular sobre una superficie.⁸⁸ Extrapolando al medio *in vivo*, una mayor humectabilidad de superficie genera mejor adsorción proteica y anclaje celular con la superficie⁸³⁻⁸⁶ y esto se traduce en una mejor curación de los tejidos alrededor del aditamento y menor respuesta inflamatoria.³⁵⁷⁻³⁵⁸

La humectabilidad generalmente se mide en base a líquidos con tensión superficial conocida, principalmente el agua ($\tau = 72,8$ mN/m). En diversos estudios se mide la humectabilidad de superficie únicamente con agua destilada,^{292,359} sin embargo, en este estudio se quiso hacer sobre dos líquidos con diferente polaridad para así poder calcular la energía libre de superficie de ambas superficies cerámicas. En nuestro estudio el cálculo se realizó en base a seis mediciones para así mejorar la validez de los resultados en unas superficies con topografía heterogénea.

Es importante que las superficies presenten valores intermedios de θ_w de entre 30° - 60° y de SFE cercanos a 40 mN/m para favorecer la adsorción de las proteínas del suero y la posterior adhesión celular.^{34,88,242}

En nuestro estudio, los valores de ángulo de contacto en agua fueron de $\theta_w \approx 68^\circ$ para Y-TZP y de $\theta_w \approx 51^\circ$ para ZLS. De acuerdo con la clasificación habitual, ambas superficies se consideran hidrófilas al ser el ángulo de contacto menor a 90° .⁷²

La energía libre de superficie de un sólido se constituye por la suma de sus componentes polar y dispersiva.³⁶⁰ Cuanto mayor sea el carácter apolar o dispersivo de una superficie, más difícil es la adhesión de un líquido sobre la misma. De modo contrario sucede con una superficie de mayor carácter polar, la cual refleja las interacciones hidrófilas.⁷⁸

De acuerdo con el umbral definido por Vogler para la adsorción proteica en relación con la humectabilidad de superficie, los valores de SFE son adecuados en ambos materiales ya que son superiores a 30 mN/m (Y-TZP ≈ 37 ; ZLS ≈ 48).³⁶¹ Por lo tanto, ambas superficies se consideran adhesivas con capacidad de favorecer el anclaje celular sobre su superficie. Los ángulos de contacto obtenidos son similares a los publicados por otros estudios para estos materiales.^{292,339}

Se ha observado que el comportamiento de los fibroblastos se ve más influenciado por la componente polar de la energía de superficie que por la componente dispersiva. Esto es debido a que una mayor componente polar da lugar a una mayor energía de interacción.²⁴² Por lo general, las cerámicas empleadas en el ámbito odontológico son materiales hidrófilos.³⁶² No obstante, de acuerdo con los estudios publicados, la energía libre de superficie de las cerámicas presenta generalmente valores muy bajos en el componente polar.³⁶³⁻³⁶⁵

En nuestro estudio, los valores obtenidos en la componente polar son elevados al compararlos con otros estudios publicados, siendo casi el doble el valor de la componente polar de ZLS ($\gamma_L^p \approx 29$) que el de Y-TZP ($\gamma_L^p \approx 16$). Este hecho, tal y como han reportado diversos autores, no se debería a la composición química del material,³⁶⁶ si no quizás a la rugosidad de superficie,^{365,367} sin embargo, en este estudio la superficie con mayor rugosidad (ZLS) también presentó la mayor SFE. Esto podría deberse a la teoría de Wenzel, la cual explica que, ante una superficie hidrófila, la presencia de rugosidades aumentaría su humectabilidad mientras que en una superficie hidrófoba la presencia de rugosidades aumentaría el carácter hidrófobo de la misma, predisponiendo a una mayor acumulación bacteriana.^{75,339,368,369} Este hecho podría haberse producido en nuestro estudio, en el que la mayor rugosidad de ZLS está asociada a un menor ángulo de contacto en agua, mayor componente polar y mayor energía de superficie que en Y-TZP. El ángulo de contacto en diiodometano fue elevado en ambos, mostrando su carácter hidrófobo ante líquidos apolares.

Habitualmente, las superficies estudiadas en el ámbito odontológico no son ideales, sino que son heterogéneas en composición, topografía y presentan cierta

rugosidad en mayor o menor medida.^{75,370} Dos superficies pueden presentar SFE similares, pero ello no significa que no haya diferencias a nivel de los factores anteriormente mencionados.^{363,364}

La composición de un material es un factor que influye en su humectabilidad. La heterogeneidad en la composición química de una superficie ocasiona un mayor ángulo de contacto del líquido con el sustrato o menor humectabilidad, por tanto, la energía podría no distribuirse de manera uniforme por toda su área. De acuerdo con Astasov2018 y cols., la proporción de contenido orgánico e inorgánico de los materiales tiene relación directa con la energía libre de superficie de éstos. Un material con alto contenido inorgánico (cerámico) da lugar a una componente polar elevada y una componente dispersiva reducida.³⁷¹ En nuestro estudio, la componente dispersiva no se vio disminuida con respecto a la polar en el caso de Y-TZP pudiendo ser debido a un alto contenido orgánico en la superficie como la contaminación por carbono ambiental. Cuando una superficie hidrófila se expone al medio en el laboratorio, alcanza su estado energético más bajo, que es a la vez el más estable debido a la inevitable adsorción de moléculas de agua y/o de partículas contaminantes presentes en el ambiente.³⁷² La deposición de partículas contaminantes, como el carbono atmosférico, puede aumentar el ángulo de contacto. Esto se considera envejecimiento de la superficie del material, lo cual aumenta su carácter hidrófobo, reduciendo su humectabilidad.^{72,84,292,359} La cantidad de carbono adsorbida en una superficie dependerá de las propiedades de superficie, de las características ambientales y del tiempo de exposición.⁸⁴ La superficie Y-TZP mostró un ángulo de contacto (AC) más elevado que ZLS, este carácter algo más hidrófobo podría haber favorecido una mayor adsorción de carbono en su superficie.

La topografía de superficie es otro factor relacionado con su humectabilidad. La superficie Y-TZP presentó una topografía en patrón de círculos concéntricos, más homogénea que ZLS. Sin embargo, ambas muestras presentaron surcos, hendiduras y cráteres, dando lugar a superficies heterogéneas con concavidades que pueden influir disminuyendo la humectabilidad y la energía de superficie.³⁷³ En nuestro estudio, la topografía en patrón de Y-TZP favoreció el mayor anclaje celular pero no mostró mejor humectabilidad frente a una superficie más irregular y al mismo tiempo más hidrófila (ZLS). En este sentido, sería necesario analizar en detalle qué características topográficas son responsables de un comportamiento celular específico.⁸⁸ En cualquier caso, no es apropiado comparar superficies de materiales en base a un único factor como el ángulo de contacto o la rugosidad. En la literatura puede observarse este hecho. Nothdurft y cols. evaluaron la humectabilidad sobre superficies de circonia con diferentes tratamientos de superficie. La superficie mecanizada sin tratamiento adicional—similar a la del presente estudio—obtuvo un $\theta_w \approx 78^\circ$ y $R_a \approx 69$ nm.²⁹⁵ Comparando estos resultados con los obtenidos en el presente estudio, puede extraerse que, una superficie puede ser menos rugosa y aun así presentar un mayor AC que no debe atribuirse únicamente a la rugosidad como

único factor causal, sino más bien un conjunto de factores, como se mencionó anteriormente.

Otro factor importante a tener en cuenta es la rigidez de una superficie en relación a su humectabilidad. Como se comentó en el apartado anterior, el anclaje celular se ve favorecido en las superficies rígidas, las cuales presentan generalmente una elevada energía de superficie con valores reducidos de ángulo de contacto y una elevada humectabilidad. En este sentido, superficies con AC muy reducido, pero con muy poca rigidez (como el caso de los hidrogeles), presentan muy poca adhesión celular ya que la célula no tiene capacidad de establecer adhesiones focales estables sobre la superficie.⁸⁸ Con ello se pone nuevamente de manifiesto la importancia de no comparar el comportamiento celular entre sustratos en base a un único factor.

Las superficies con elevada rigidez tienen la capacidad de promover la adsorción de proteínas de la matriz extracelular y así favorecer el anclaje a los receptores celulares como las integrinas. Diversas publicaciones revelan que las superficies con una rigidez elevada facilitan las fuerzas de tracción y tensión inducidas por las células para anclarse y producir un fenotipo extendido.^{67,68,349} Esta tendencia de anclaje celular en materiales más rígidos es consistente con el espectro de energías de superficie más elevadas, para ángulos de contacto entre 0° y 75° y sería por lo tanto esperable una buena adsorción proteínica, anclaje y crecimiento celular en estas condiciones.⁸⁸ Nuestras superficies presentan un elevado módulo de elasticidad con ángulos de contacto menores a 75° y es por ello que cabría esperar una respuesta celular temprana favorable en ambos materiales a nivel de anclaje y diferenciación; además, de acuerdo con los resultados de humectabilidad de superficie se esperaría un mayor anclaje en la superficie de ZLS no habiendo sido así. La mayor rigidez de la superficie Y-TZP, unido a la mayor homogeneidad composicional, topografía en patrón y menor rugosidad podrían haber favorecido y guiado el contacto celular y el mayor anclaje y esparcimiento celular sobre su superficie.

7.5 Influencia de los materiales de estudio en el conteo celular, citomorfometría y cubrimiento del disco

Hasta donde tenemos conocimiento, no se ha publicado ningún estudio comparativo de conteo y citomorfometría en superficies de Y-TZP y ZLS. La circonia se ha comparado a nivel de respuesta celular temprana con múltiples materiales de restauración, como las cerámicas feldespáticas^{214,290} o el titanio.^{295,345} En los estudios *in vitro*, ya es considerado la alternativa al titanio en cuanto a mejor mantenimiento de la estabilidad de los tejidos blandos, ya que presenta mejor biocompatibilidad y estética.^{214,291,294}

Raffaelli y cols. llevaron a cabo un estudio comparativo de circonia y cerámica feldespática. La tasa de crecimiento celular a las 24 horas mostró una diferencia significativa entre grupos, siendo mayor en la circonia.²¹⁴ En otro estudio comparativo de circonia y titanio, la proliferación fibroblástica a las 24 y 72 horas fue significativamente superior en superficies arenadas de circonia frente superficies pulidas y mecanizadas en ambos tipos de materiales. Estos resultados ponen de relieve una vez más el hecho de que la rugosidad no es un factor predictor de la proliferación celular sobre una superficie, ya que la respuesta celular a una superficie es debido a la confluencia de varios factores como la composición, topografía, humectabilidad y rigidez de la superficie.²⁹⁵ En nuestro estudio, se observó mayor número de células sobre la superficie de Y-TZP con respecto a ZLS ($p=0,039$).

Debido a que la forma de la célula es un buen indicador de la influencia que tiene el sustrato sobre las células, se decidió incluir parámetros citomorfométricos basados en mediciones sobre el conjunto celular, núcleo y citoesqueleto.³⁷⁴ Se evaluó el área y circularidad celular y nuclear, el perímetro celular y la longitud del citoesqueleto, así como el cubrimiento del disco por parte de las células.

El esparcimiento celular y la geometría del núcleo están muy relacionados,^{375,376} siendo el valor de circularidad del núcleo más próximo a cero cuando más expandido está el núcleo y por ende la célula. En nuestro estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre Y-TZP y ZLS a nivel de factor de forma o circularidad celular. Tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas de tamaño ni de circularidad de los núcleos, si bien el tamaño medio del núcleo fue ligeramente superior en Y-TZP. Este hallazgo, unido a una mayor área, perímetro y esparcimiento celular sobre Y-TZP, se puede interpretar como una mayor afinidad celular por esta superficie.

La forma de las células se ve afectada por la humectabilidad de la superficie sobre la que se adhieren.³⁵⁹ En este estudio se analizaron dos superficies con carácter hidrofílico, sin embargo, las células cultivadas sobre la superficie con mayor humectabilidad y energía de superficie (ZLS) mostraron poca extensión celular, interpretándose como una menor adhesión a la superficie. Por otro lado, Y-TZP presentó una menor humectabilidad y energía de superficie, pero sin embargo las células cultivadas presentaron mayores dimensiones y esparcimiento. Se presume que otros factores deben de haber influido de forma más determinante como la topografía, rugosidad o citotoxicidad del material.

Otro indicador de respuesta celular a una superficie es el citoesqueleto, que regula las señales percibidas del entorno y coordina el tamaño, forma y función celular.³⁷⁷ Tras el anclaje celular inicial a una superficie, se sucede el esparcimiento por la extensión de los filamentos de actina; posteriormente se da la proliferación y migración celular.^{359,378} La longitud media de la célula observada en este estudio para la superficie Y-TZP ($63,34 \pm 31,64 \mu\text{m}$) está en línea con las dimensiones publicadas en la literatura para un fibroblasto extendido ($50\text{-}100 \mu\text{m}$).³⁷⁹ En el caso de la

superficie ZLS ($35,66 \pm 16,44 \mu\text{m}$), la longitud media se vio drásticamente reducida en relación con lo previamente publicado. Estos resultados coinciden con el estudio morfológico celular realizado, ya que en la superficie de Y-TZP se visualizaron células extendidas, de fenotipo fusiforme, con un citoesqueleto más organizado con haces de filamentos de actina formando fibras de estrés. Las células cultivadas sobre la superficie de ZLS se presentaban agrupadas, con un fenotipo circular y poca extensión de los filamentos de actina. De estos resultados citomorfométricos se puede interpretar que la superficie de ZLS es menos favorable al anclaje y proliferación inicial.

Diversos estudios han demostrado que la morfología celular está asociada con el esparcimiento, adhesión y división celular, siendo las células de morfología más fusiforme y esparcida las que tienen una tasa de división mayor además de una adhesión más favorable.^{47,380} Este razonamiento está en concordancia con los resultados obtenidos en este estudio. Las células cultivadas en la superficie de circonia se presentaron en mayor número, con una morfología más elongada y expandida y de aspecto fusiforme, derivando en un mayor cubrimiento de la superficie del disco.

7.6 Citotoxicidad de los materiales estudiados

Para medir el grado de citotoxicidad de los materiales se realizó un estudio colorimétrico con MTT que mide la actividad mitocondrial de las células en contacto directo con las diferentes superficies. Este tipo de estudio se emplea habitualmente bajo la norma ISO 10993-5.⁹⁷ Con ello se consigue una estandarización metodológica y una comparación numérica objetiva de los resultados obtenidos. No obstante, la norma ISO no define una clasificación en la que se establezcan rangos de valores de tasa o porcentaje de viabilidad celular con los que se pueda hablar del grado de citotoxicidad del material según el tipo de estudio llevado a cabo. Es por tanto complicado la comparación entre estudios *in vitro* a nivel de interpretación de resultados. Es necesario estandarizar los tipos de materiales de acuerdo a su grado de citotoxicidad para una interpretación comparativa y objetiva de los resultados.³⁸¹ Aquellos estudios que no usan normas ISO introducen variables añadidas que complican la comparación de resultados, por ello, las conclusiones derivadas de la comparación con otros estudios publicados aquí descritos deben de interpretarse con cautela.

A pesar de que ZLS se presente como la nueva generación de materiales creados para mejorar las propiedades mecánicas del disilicato de litio (LS_2), existen autores que muestran cautela en lo referente a su posible citotoxicidad ya que LS_2 se ha reportado como citotóxico, o lo que es lo mismo, no sería biológicamente

inerte.^{382,185} La composición de ZLS varía ligeramente con respecto a LS₂, pudiendo acontecer lo mismo en cuanto a la citotoxicidad detectada.¹⁸⁵

La circonia se ha analizado en la literatura como material de aditamento implantológico y se ha comparado principalmente con cerámicas de disilicato de litio y con titanio. Al comparar el LS₂ con la circonia, los resultados son variables especialmente en relación al tipo de célula cultivada sobre las superficies. En algunos estudios se ha considerado al LS₂ como un material citotóxico para fibroblastos gingivales, calificándolo material de segundo grado en lo que se refiere a biocompatibilidad.^{292,294,310,382,383} En otra publicación se observó que, a pesar de que ambos materiales son biocompatibles, las tasas de proliferación y viabilidad de células epiteliales fueron superiores en LS₂, atribuyéndose este resultado a la menor rugosidad del material.³⁸⁴

Al comparar circonia con titanio los resultados también varían son variables. Algunos autores observaron similitud de comportamiento celular entre el titanio y la circonia, considerando a este último una buena alternativa estética en su uso como material de aditamento implantológico;^{32,47,274,292,385,386} Sin embargo, otras publicaciones observaron mayor viabilidad en circonia.^{81,295,310}

Otras publicaciones no han observado citotoxicidad al comparar superficies de disilicato de litio, circonia y titanio ya sea por contacto directo o indirecto con el material. Pandoleon y cols. experimentaron ambas técnicas concluyendo que la mayor viabilidad por contacto directo se dio en la superficie de titanio a las 72 horas, y por método indirecto fue en la superficie de LS₂. Los autores atribuyeron los resultados de viabilidad por contacto directo a la menor rugosidad de superficie del titanio, pero no explicaron las razones de la mayor viabilidad indirecta del disilicato.²⁷⁴ Cabe remarcar además que los valores de viabilidad obtenidos en contacto indirecto fueron superiores a los valores obtenidos por contacto directo, pudiéndose interpretar que el método realizado es otro factor adicional determinante y los resultados no se deberían extrapolar.

En nuestro estudio se evaluó la citotoxicidad por contacto directo con el material a las 24, 48 y 72 horas. El mayor grado de citotoxicidad se produjo en las primeras 24 horas y fue superior en la superficie de ZLS ($p < 0,001$). Una de las posibles razones ha sido comentada por otros autores: en las primeras horas de inmersión del material en medio de cultivo, se produce la liberación de elementos procedentes de su superficie causando citotoxicidad celular en mayor o menor grado. En nuestro experimento los posibles elementos liberados al medio por la superficie de ZLS serían aluminio y silicio, considerados de bajo poder citotóxico.^{387,388} Este hecho ha sido reportado por otros autores en el caso de las cerámicas de disilicato de litio, las cuales comparten gran parte de componentes con ZLS.^{382,387} Por otro lado, los principales elementos liberados al medio por parte de la circonia monolítica son circonia, itrio, silicio y sodio. Sin embargo, el potencial citotóxico de estos elementos

es moderadamente bajo según la literatura revisada. Además, al tratarse de una cerámica policristalina, la corrosión que sufre en su superficie es mínima.^{364,388-390}

A pesar de que la rugosidad fue menor en la superficie de circonia, se observó que la de ZLS obtuvo mayor humectabilidad, mayor componente polar y energía de superficie. Por lo tanto, cabe pensar que existen otros factores que deben de haber influido para que se haya obtenido mejores resultados a nivel de proliferación, valores citomorfométricos y viabilidad celular temprana en las primeras 24 horas de contacto sobre la superficie de Y-TZP. Entre estas posibles variables se encuentran la composición química, la topografía de superficie, la microestructura o el nivel de impurezas en la superficie.

En nuestro estudio de citotoxicidad, todos los grupos presentaron diferencias estadísticamente significativas con el grupo control en los tres tramos de tiempo analizados. Pasadas las primeras 24 horas, la viabilidad fue aumentando en ambos tipos de materiales por encima de los valores esperables para un material biocompatible (>70% viabilidad), no encontrándose diferencias estadísticamente significativas a las 48 horas ($p=0,674$) ni a las 72 horas ($p=0,583$).

En 2017 Dal Piva y cols. llevaron a cabo un estudio comparativo de citotoxicidad entre Vita Suprinity® y VitaYZ® comparando superficies pulidas y glaseadas. En su estudio, al igual que en el nuestro, la superficie de Y-TZP presentó mayor energía libre de superficie que ZLS (para ambos tipos de tratamiento de superficie). Así mismo, de acuerdo con los autores se observó citotoxicidad severa (<50% viabilidad) en ambas superficies pulidas a las 24 horas. No obstante, la viabilidad celular sólo se vio influenciada en el contacto inicial con el material—primeras 24 horas—, disminuyendo la citotoxicidad (>70% viabilidad) al cabo de una semana. La viabilidad celular fue superior en la circonia para ambos tipos de tratamiento.

Ese mismo año Atay y cols. establecieron un rango de citotoxicidades para la comparación de viabilidad celular en fibroblastos cultivados sobre superficies de ZLS e Y-TZP, entre otros materiales cerámicos. Consideraron una superficie ligeramente citotóxica si presentaba valores de entre 60-90% de viabilidad; moderadamente citotóxica con valores de entre 30-59% y severamente citotóxica si el valor de viabilidad era inferior al 30%. La viabilidad celular a las 24 y 72 horas fue superior al 90% en ambos materiales y, por lo tanto, no se calificaron como citotóxicos. La tasa de viabilidad celular a las 24 horas no mostró una diferencia estadísticamente significativa entre ambos materiales.³⁹¹

De acuerdo con la clasificación de Atay, nuestras superficies se calificarían como moderadamente citotóxicas en las primeras 24 horas. A las 48 horas, ambos presentaron ligera citotoxicidad, no considerándose a Y-TZP como citotóxico a partir de las 72 horas. Estos resultados son similares a los publicados por otros autores.^{47,81,292} En el estudio de Atay y cols., la medición de citotoxicidad no fue por

contacto directo con la superficie, sino por extractos del medio de cultivo, lo cual debería ser tenido en cuenta en la comparación de resultados.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio de viabilidad celular, no se podría afirmar que la circonia ni el silicato de litio reforzado con circonia son materiales totalmente inertes.²⁷⁴ Sin embargo, se encuentran dentro del rango de citocompatibilidad para ser usados en clínica, tal y como afirman otros autores.^{276,391-393}

7.7 Influencia del tipo de material en la secreción de colágeno tipo I

Tras la inserción de un aditamento implantológico, la herida debe cerrarse a través de la migración de los fibroblastos y la posterior formación de una matriz de colágeno.²⁹⁴ Para que un material cerámico se integre con éxito en los tejidos blandos, las células tienen que colonizar la superficie de forma uniforme y este proceso implica la remodelación (síntesis y degradación) de elementos de la matriz extracelular en la superficie del material.³¹⁰ En este sentido, el colágeno juega un papel importante en la adhesión celular a una superficie.³⁹⁴

Los fibroblastos remodelan continuamente la conformación de su MEC al estar adheridos a una superficie. Esta remodelación es a través de la síntesis y proteólisis de sus componentes. En nuestro estudio, para evaluar la correcta función de los fibroblastos, se evaluó la secreción del colágeno al medio de cultivo. A las 24 horas no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambas superficies. La secreción de colágeno a las 72 horas fue superior en Y-TZP ($p < 0,001$) pero disminuyó drásticamente de forma general en todos los grupos con respecto al tramo de 24 horas. Este hecho podría deberse a lo comentado por otros autores: pasadas las primeras horas de contacto con la superficie (cuando se alcanza la confluencia celular), se detiene la proliferación por inhibición por contacto y también se reduce drásticamente la secreción de colágeno.^{81,310}

No existe consenso en cuanto a cuál es la superficie más favorable para la deposición y secreción de colágeno. Algunos autores consideran que las superficies rugosas favorecerían el mayor anclaje del colágeno debido a que éste tendría mayor entrecruzamiento de sus fibras, así como mejor resistencia a las fuerzas laterales.^{32,395} Sin embargo, otros autores han observado que se da mayor secreción en superficies lisas. En 2014 Teté y cols. compararon la secreción de colágeno tipo I por fibroblastos gingivales a las 24 y 72 horas sobre diferentes materiales cerámicos pulidos y sin pulir, usando superficies de poliestireno como control. A las 24 horas no observaron diferencia estadísticamente significativa entre superficies de circonia pulida o no, y cerámicas feldespáticas glaseadas, sin embargo, la secreción en el disilicato de litio fue significativamente inferior. A las 72 horas se detectó un descenso en la secreción de colágeno en todas las superficies, siendo estadísticamente significativo en las

superficies pulidas de circonia y LS₂. La superficie de poliestireno fue en la que tuvo menos secreción de colágeno en ambos tramos de tiempo. Los autores atribuyeron este hecho a que en superficies de poliestireno se obtiene la máxima proliferación celular, pero a expensas de la secreción y ensamblaje de componentes de la MEC.^{310,396,397} En condiciones *in vivo* las células muestran una mínima tasa de proliferación mientras que al mismo tiempo son muy activas en secreción de la matriz de colágeno. Los autores concluyeron que se produjo una mayor secreción de colágeno tipo I en las primeras 24 horas para optimizar la adhesión celular al substrato y después estimular su posterior proliferación. Ello explicaría por qué la secreción de colágeno desciende drásticamente a partir de las 72 horas una vez que las células están adheridas.³¹⁰

Los bajos niveles de secreción observados en nuestros resultados se deben a dos razones. En primer lugar, la secreción es distinta según el tipo de fibroblasto. Los fibroblastos gingivales presentan menor expresión de colágeno y una organización distinta de la MEC con respecto a los fibroblastos del ligamento periodontal ya que presentan menor expresión de la integrina $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 10\beta 1$.^{2,14,398,399} En segundo lugar, el colágeno cuantificado es el proteolizado al medio de cultivo por las células y tal y como se ha comentado, la síntesis de colágeno en condiciones *in vitro* se realiza a expensas de la adhesión celular temprana a la superficie.

La humectabilidad y la rigidez de superficie también afectan a la síntesis del colágeno.⁴⁰⁰ Se ha observado que las células producen más colágeno en superficies hidrófilas y que, en contacto con este tipo de superficies, la proteína adopta una conformación más extendida que cuando está en contacto con superficies hidrófobas en las que sufre plegamientos y forma agregados.⁴⁰¹ Este hecho pudiera estar relacionado con la mayor expresión de integrina $\alpha 1\beta 1$.⁹⁰ En nuestro estudio, no hubo diferencia en la secreción de colágeno a las 24 horas, pero a las 72 horas se produjo una mayor secreción en Y-TZP. Esta superficie es hidrófila y más rígida que ZLS, pudiendo ser dos posibles razones de la mayor secreción.

Pocos estudios han evaluado la secreción de colágeno sobre la superficie de materiales cerámicos a través de técnicas de inmunoabsorción por enzimas. La mayoría de las publicaciones cuantifican la expresión del mRNA del colágeno junto con otras proteínas de adhesión celular a través de ensayos de PCR. Al ser distinto el método empleado, es importante ser cauto en la comparación de resultados con este tipo de estudios.

Pae y cols. no encontraron diferencias significativas en la expresión de diferentes proteínas como integrina β -1, fibronectina, laminina y colágeno tipo I y III al comparar dos tipos de superficies de circonia (pulido y con rugosidades) y titanio como grupo control.⁴⁷ Por otro lado, Cho y cols. compararon la secreción de colágeno tipo I, integrinas $\alpha 2$ y $\beta 1$ en superficies de titanio y circonia pulidas o arenadas. La mayor secreción de colágeno y de integrinas se observó sobre las superficies pulidas de circonia a las 24 y 72 horas, pero se vio reducida drásticamente

en todos los grupos a partir de las 24 horas. Se observó mayor secreción de integrinas en superficies lisas donde se dio mayor anclaje y proliferación de los fibroblastos. Los autores concluyeron que el colágeno tipo I es una proteína que se produce de forma correcta en las primeras 24 horas y que indica un buen anclaje de los fibroblastos gingivales al disco. Esta mayor secreción se asoció a un mayor esparcimiento de los fibroblastos sobre dicha superficie.³⁴⁵ Estos resultados coinciden con los obtenidos por Yamano y cols., los cuales midieron el grado de expresión de colágeno I y III en superficies lisas y rugosas de circonia y titanio. En este caso la mayor expresión de colágeno tipo I se dio a las 48 horas en superficies de circonia pulida, donde las células proliferaron a mayor velocidad, pero eran las menos esparcidas por la superficie. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en la secreción de colágeno tipo III. Los autores concluyeron que la expresión proteica y la topografía estarían relacionadas en el caso de las integrinas, ya que se observó que las células cultivadas en superficies más rugosas presentaron menor proliferación, pero mayor diferenciación celular así como una disminución en la expresión de las integrinas.⁸¹

Son necesarios más estudios que analicen una posible relación entre la topografía, la rugosidad y la secreción de colágeno tipo I y III. En el caso de los estudios *in vitro*, factores como el porcentaje de suero fetal empleado, el pH o la composición del medio son variables añadidas que pueden influir en el grado de secreción de colágeno.² La composición química, topografía, humectabilidad, rigidez y citotoxicidad del material influyen en la adhesión celular inicial a una superficie. Es por tanto un análisis complejo en el que cada parámetro debería estudiarse de forma independiente bajo una norma ISO para que así se desarrollen estudios *in vitro* reproducibles y con posibilidad de comparación objetiva de resultados.^{292,342,348,402}

7.8 Limitaciones del estudio

Los estudios *in vitro* suponen la limitación de no poder extrapolar los resultados al ámbito clínico ya que las condiciones en las que se llevan a cabo son controladas y no se tienen en cuenta otros factores inherentes a la fisiología celular en condiciones *in vivo*, así como las condiciones del propio paciente. La toxicidad de un material es un ejemplo de lo anteriormente mencionado, ya que cuando un material se pone en contacto con el organismo, la cadena de eventos que se producen hasta generar o no algún tipo de respuesta, suele implicar procesos “barrera” como la toxicocinética y toxicodinámica que no se producen en condiciones *in vitro*, en los que se estimula la respuesta por contacto de forma directa o indirecta, pero sin mecanismos de procesamiento de respuesta intermedios.

La secreción de colágeno por parte de los fibroblastos, tal y como se comentó anteriormente, varía según las condiciones de experimentación. En condiciones *in*

in vitro, la secreción de colágeno se ve disminuida ya que la adhesión celular es a expensas de su producción en la matriz extracelular, mientras que en condiciones *in vivo*, las células muestran una mínima tasa de proliferación y al mismo tiempo son muy activas en secreción de la matriz de colágeno. Es por ello que esto supone una limitación en la extrapolación de resultados que debe ser tomada en cuenta.

Por otro lado, el desarrollo de los estudios *in vitro* es de gran importancia para crear evidencia científica y aplicar los conocimientos adquiridos sobre el diseño y desarrollo de los estudios *in vivo* llevados a cabo posteriormente.

El circonio es considerado el *gold standard* como material de aditamento implantológico estético, sin embargo, existen otros materiales habitualmente empleados como aditamento como es el titanio o el polímero termoplástico (PEEK) que no han sido analizados en este trabajo experimental, suponiendo esto una limitación en nuestro trabajo experimental ya que no permite comparaciones directas con materiales no estudiados y que se utilizan en la práctica diaria.

El tipo de materiales que se han analizado, habitualmente se someten a distintos tratamientos de superficie para mejorar sus propiedades y así obtener la mejor respuesta celular posible. Este tipo de tratamientos, al estar en constante investigación, no están estandarizados y suponen una variable adicional a analizar. En nuestro estudio se decidió hacer el análisis del material sin tratamiento de superficie para así eliminar una variable adicional que impidiese comparaciones futuras.

Los resultados obtenidos en este estudio *in vitro* revelan diferencias significativas entre ambos materiales para las diferentes variables celulares analizadas; no obstante, no existe suficiente evidencia para demostrar que Y-TZP es más beneficioso que ZLS, especialmente a medio-largo plazo, ya que se ha observado que la viabilidad celular es similar a partir de las 48 horas y no existe hasta la fecha evidencia científica del comportamiento clínico de ZLS alrededor de los tejidos blandos.

Esta tesis doctoral puede contribuir a un mejor entendimiento del comportamiento celular en contacto con estos materiales, el cual determinará el pronóstico a largo plazo del mantenimiento de los tejidos blandos alrededor de los aditamentos.

7.9 Perspectivas futuras

Sería importante que, al continuar en esta línea de investigación, se valorasen las siguientes cuestiones:

- Ampliar la caracterización de superficie empleando la espectroscopía de pérdida de energía de electrones (EELS) que permita cuantificar de forma precisa la presencia de elementos ligeros que no se pudieron cuantificar en este estudio como es el caso del litio.
- Evaluar con microscopio electrónico de barrido la influencia de la topografía de superficie sobre las variables citomorfométricas analizadas.
- Analizar la humectabilidad de las superficies estudiadas en el que el líquido polar sea el medio de cultivo enriquecido con suero fetal que se vaya a emplear en la investigación.
- Analizar la micro y nanotopografía de superficie ya que las zonas de adsorción molecular se dan a escala nanométrica y las adhesiones focales celulares a escala micrométrica.
- Estudiar el comportamiento de absorción de aquellas proteínas que se adhieren sobre las superficies analizadas con diferentes tratamientos de superficie y por lo tanto diferente humectabilidad. Analizar el grado de adhesión bacteriana bajo las mismas condiciones.
- Replicar el presente estudio ampliando el número de materiales analizados, entre ellos el titanio.
- Llevar a cabo un estudio *in vitro* basado en un modelo organotípico en tres dimensiones con el que poder reproducir los distintos tejidos adheridos a la superficie de un aditamento y analizar las interacciones a nivel proteínico y celular.
- Desarrollar un estudio clínico paralelo que permita conocer el comportamiento de los materiales analizados a nivel de mantenimiento de tejidos, supervivencia y formación de placa bacteriana.

Conclusiones



8. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, con las limitaciones del presente estudio *in vitro* y en respuesta a los objetivos, se han obtenido las siguientes conclusiones:

Conclusión general

Los fibroblastos gingivales humanos (HGFs) cultivados sobre discos de circonia parcialmente estabilizada con itrio (Y-TZP) mostraron mejor comportamiento *in vitro* que aquellos cultivados sobre discos de silicato de litio reforzado con circonia (ZLS). (Conclusión referida al objetivo general)

Conclusiones específicas

1. Los fibroblastos cultivados sobre superficies de circonia estabilizada con itrio (Y-TZP) fueron más numerosos ($p=0,039$), con parámetros citomorfométricos superiores en cuanto a área celular ($p<0,001$), perímetro ($p<0,001$), longitud del citoesqueleto ($p<0,001$) y mayor esparcimiento sobre la superficie ($p<0,001$) que aquellos cultivados sobre silicato de litio reforzado con circonia (ZLS). (Conclusión referida al objetivo específico n° 1).
2. Ambos materiales mostraron una moderada citotoxicidad en las primeras 24 horas de contacto directo, siendo en ZLS donde se observó menor viabilidad celular ($p<0,001$). En el tramo de 48 horas se observó una disminución de la citotoxicidad sin encontrar diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,674$). La viabilidad fue aumentando en ambos tipos de materiales por encima de los valores esperables para un material biocompatible ($>70\%$ viabilidad) a las 72 horas ($p=0,583$). (Conclusión referida al objetivo específico n° 2)
3. La secreción de colágeno tipo I se vio influenciada por la superficie del material. En el tramo de 24 horas no se observó diferencia estadísticamente significativa entre Y-TZP y ZLS ($p=0,766$), sin embargo, a las 72 horas fue significativamente superior sobre Y-TZP ($p<0,01$). La secreción de colágeno disminuyó de forma considerable en todos los grupos a las 72 horas. (Conclusión referida al objetivo específico n° 3)

Bibliografia



9. BIBLIOGRAFÍA

1. Sorrell JM, Caplan AI. Fibroblasts-a diverse population at the center of it all. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2009;276:161-214.
2. Mohd Nor NH, Berahim Z, Azlina A, Mokhtar KI, Kannan TP. Identification and Characterization of Intraoral and Dermal Fibroblasts Revisited. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2017;12(8):675-681.
3. Shen Y, Wang Z, Wang J, Zhou Y, Chen H, Wu C, Haapasalo M. Bifunctional bioceramics stimulating osteogenic differentiation of a gingival fibroblast and inhibiting plaque biofilm formation. *Biomater Sci.* 2016 Apr;4(4):639-51.
4. McCulloch CA, Bordin S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J Periodontal Res.* 1991 May;26(3 Pt 1):144-54.
5. Jansen JA, den Braber ET, Walboomers XF, de Ruijter JE. Soft tissue and epithelial models. *Adv Dent Res.* 1999 Jun; 13:57-66. Review.
6. Guo WH, Alvarez-Urena P, Wang YL. Chapter 4 – Cell and Tissue Mechanobiology. In Hollinger, J. O. *An Introduction to Biomaterials*, 2nd Ed.: Hoboken 2011. p. 43-50.
7. Becker WM., Kleinsmith LJ., Hardin J. Chapter 15: 15. Beyond the Cell: Cell Adhesions, Cell Junctions, and Extracellular Structures. In Becker WM., Kleinsmith LJ., Hardin J. *The world of the cell.* 9th Ed.: Pearson Benjamin Cummings 2006.
8. Basu B, Balani K. *Advanced Structural Ceramics.* 1st Ed.: John Wiley & Sons, Incorporated. 2011. p:3-11; 26-30.
9. González-García C, Cantini M, Ballester-Beltrán J, Altankov G, Salmerón-Sánchez M. The strength of the protein-material interaction determines cell fate. *Acta Biomater.* 2018 Sep 1; 77:74-84.
10. Lodish H, Berk A, Zipursky SL. Chapter 22: Integrating Cells into Tissues. In Lodish H, Berk A, Zipursky SL. *Molecular Cell Biology.* 4th Ed.: W. H. Freeman 2000.
11. Janson IA, Putnam AJ. Extracellular matrix elasticity and topography: material-based cues that affect cell function via conserved mechanisms. *J Biomed Mater Res A.* 2015 Mar;103(3):1246-58.
12. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* 2010 Dec 15;123(Pt 24):4195-200.

13. Pivodova V, Frankova J, Ulrichova J. Osteoblast and gingival fibroblast markers in dental implant studies. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2011 Jun;155(2):109-16.
14. Palaiologou AA, Yukna RA, Moses R, Lallier TE. Gingival, dermal, and periodontal ligament fibroblasts express different extracellular matrix receptors. *J Periodontol.* 2001 Jun;72(6):798-807.
15. Rozario T, DeSimone DW. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol.* 2010 May 1;341(1):126-40.
16. Hari RA., Alvarez-Urena P. Collagen. Chapter 21 – A Natural Biomaterial for Tissue Engineering. In Hollinger, J. O. *An Introduction to Biomaterials*, 2nd Ed.: Hoboken 2011. p. 379-381.
17. Chang. SW., Buehler M. Molecular biomechanics of collagen molecules. *Materials Today* 2014; 17(2):70-76.
18. Imagen obtenida de Nelson D., Cox M. *Lehninger principles of biochemistry*. 4th Ed.: W.H.Freeman & Co Ltd. 2005.
19. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003 Nov 28;55(12):1531-46.
20. Mayne R. Chapter 1: Types I, II and III. Structure and function of Collagen types. Academic Press 1987. p:1-36.
21. Weisel JW. Fibrinogen and fibrin. *Adv Protein Chem.* 2005; 70:247-99.
22. Schaefer L, Schaefer RM. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res.* 2010 Jan;339(1):237-46.
23. De Arcangelis A, Georges-Labouesse E. Integrin and ECM functions—Roles in vertebrate development. *Trends Genet* 2000;16: 389–395.
24. Salmerón-Sánchez M, Altankov G. Cell-Protein-Material interaction in tissue engineering. *In-Tech.* 2010; p. 77-102.
25. Kenny FN, Connelly JT. Integrin-mediated adhesion and mechano-sensing in cutaneous wound healing. *Cell Tissue Res.* 2015 Jun;360(3):571-82.
26. Siebers MC, ter Brugge PJ, Walboomers XF, Jansen JA. Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review. *Biomaterials* 2005; 26:137-146.
27. Van der Pauw MTM, Everts V, Beertsen W. Expression of integrins by human periodontal ligament and gingival fibroblasts and their involvement in fibroblast

- adhesion to enamel matrix-derived proteins. *J Periodontol* 2002; 37(5): 317-323.
28. Riikonen T, Westermarck J, Koivisto L, Broberg A, Kähäri VM, Heino J. Integrin $\alpha 2\beta 1$ is a positive regulator of collagenase (MMP-1) and collagen $\alpha 1$ (I) gene expression. *J. Biol. Chem.* 1995; 270:13548–13552.
29. Donnelly H, Dalby MJ, Salmeron-Sanchez M, Sweeten PE. Current approaches for modulation of the nanoscale interface in the regulation of cell behavior. *Nanomedicine.* 2018 Oct;14(7):2455-2464.
30. LeDuc P, Gonzalez L, Rauck BM, Wang Y. Chapter 7 – Protein Adsorption at the Biomaterial-Tissue Interface. In Hollinger, J. O. *An Introduction to Biomaterials*, 2nd Ed.: Hoboken 2011. p. 126-129.
31. Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Pearcy MJ. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Eng.* 2005 Jan-Feb;11(1-2):1-18. Review.
32. Rutkunas V, Bukelskiene V, Sabaliauskas V, Balciunas E, Malinauskas M, Baltriukiene, D. Assessment of human gingival fibroblast interaction with dental implant abutment materials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2015; 26(4):169.
33. Jansen KA, Atherton P, Ballestrem C. Mechanotransduction at the cell-matrix interface. *Semin Cell Dev Biol.* 2017 Nov; 71:75-83.
34. Arima Y, Iwata H. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials* 2007; 28:3074–82.
35. Tagaya M, Ikoma ., Hanagata N, Tanaka J. Analytical Investigation of Protein Mediation Between Biomaterials and Cells. *Mater. Exp.* 2012; 2(1):1-22.
36. Araujo MG, Lindhe J. Peri-implant health. *J Periodontol.* 2018;89(1):249–256.
37. Atsuta I, Ayukawa Y, Kondo R, Oshiro W, Matsuura Y, Furuhashi A, Tsukiyama Y, Koyano K. Soft tissue sealing around dental implants based on histological interpretation. *J Prosthodont Res.* 2016 Jan;60(1):3-11.
38. Lindhe J, Wennström J, Berglundh T. Chapter 3 - The mucosa at teeth and implants. In Lindhe, J., Lang, N. P., & Karring, T. *Clinical periodontology and implant dentistry*. 5th ed: Oxford: Blackwell Munksgaard; 2008. p. 75-76.
39. Ikeda H, Yamaza T, Yoshinari M, Ohsaki Y, Ayukawa Y, Kido MA, et al. Ultrastructural and immunoelectron microscopic studies of the peri-implant

- epitheliumimplant (Ti-6Al-4V) interface of rat maxilla. *J Periodontol* 2000;71:961-73
40. Imagen obtenida de la web: <https://www.nobelbiocare.com/blog/science/peri-implant-soft-tissue-barrier/>
41. Berglundh T, Lindhe J, Ericsson I, Marinello CP, Liljenberg B, Thomsen P. The soft tissue barrier at implants and teeth. *Clin Oral Implants Res* 1991;2:81-90
42. Moon IS, Berglundh T, Abrahamsson I, Linder E, Lindhe J. The barrier between the keratinized mucosa and the dental implant. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*. 1999 Oct;26(10):658-63.
43. Tetè S, Mastrangelo F, Bianchi A, Zizzari V, Scarano A. Collagen fiber orientation around machined titanium and zirconia dental implant necks: an animal study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009 Jan-Feb;24(1):52-8.
44. García B, Camacho F, Peñarrocha D, Tallarico M, Perez S, Canullo L. Influence of plasma cleaning procedure on the interaction between soft tissue and abutments: a randomized controlled histologic study. *Clin Oral Implants Res*. 2017 Oct;28(10):1269-1277.
45. Chien HH, Schroering RL, Prasad HS, Tatakis DN. Effects of a new implant abutment design on peri-implant soft tissues. *J Oral Implantol*. 2014 Oct;40(5):581-8.
46. Blanco J, Caneiro L, Liñares A, Batalla P, Muñoz F, Ramos I. Peri-implant soft tissue analyses comparing Ti and ZrO(2) abutments: an animal study on beagle dogs. *Clin Oral Implants Res*. 2016 Oct;27(10):1221-1226
47. Pae A, Lee H, Kim HS, Kwon YD, Woo YH. Attachment and growth behaviour of human gingival fibroblasts on titanium and zirconia ceramic surfaces. *Biomed Mater*. 2009 Apr;4(2):025005.
48. Berglundh T, Zitzmann NU, Donati M. Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions. *J Clin Periodontol* 2011;38:188-202.
49. Eisenbarth E, Velten D, Schenk-Meuser K, Linez P, Biehl V, Duschner H, et al. Interactions between cells and titanium surfaces. *Biomol Eng* 2002;19:243-9.
50. Smith PC, Martínez C, Martínez J, McCulloch CA. Role of Fibroblast Populations in Periodontal Wound Healing and Tissue Remodeling. *Front Physiol*. 2019; 10:270.
51. Schultze-Mosgau S, Blatz MB, Wehrhan F, Schlegel KA, Thorwart M, Holst S. Principles and mechanisms of peri-implant soft tissue healing. *Quintessence Int*. 2005 Nov-Dec;36(10):759-69.

52. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008 May 15;453(7193):314-21.
53. Tomasi C, Tessarolo F, Caola I, Wennström J, Nollo G, Berglundh T. Morphogenesis of peri-implant mucosa revisited: an experimental study in humans. *Clin Oral Implants Res*. 2014 Sep;25(9):997-1003.
54. Cochran DL, Hermann JS, Schenk RK, Higginbottom FL, Buser D. Biologic width around titanium implants. A histometric analysis of the implant-to-gingival junction around unloaded and loaded nonsubmerged implants in the canine mandible. *J Periodontol*. 1997 Feb;68(2):186-98.
55. Hermann JS, Buser D, Schenk R, Higginbottom FL, Cochran D. L. Biologic width around titanium implants. A physiologically formed and stable dimension over time. *Clinical Oral Implants Research* 2000; 11:1–11.
56. Sculean A, Gruber R, Bosshardt DD. Soft tissue wound healing around teeth and dental implants. *J Clin Periodontol*. 2014 Apr;41(15):6-22.
57. Rahmati M, Mozafari M. A critical review on the cellular and molecular interactions at the interface of zirconia-based biomaterials. *Ceram Int* 2018;44(14):16137-16149.
58. Kasemo B, Lausmaa J. Material-tissue interfaces: the role of surface properties and processes. *Environ Health Perspect*. 1994; 102(5):41–45.
59. Gasik M. Understanding biomaterial-tissue interface quality: combined in vitro evaluation. *Sci Technol Adv Mater*. 2017 Jul 31;18(1):550-562.
60. Vogler EA. Protein adsorption in three dimensions. *Biomaterials*. 2012 Feb;33(5):1201-37.
61. Noh H, Vogler EA. Volumetric interpretation of protein adsorption: competition from mixtures and the Vroman effect. *Biomaterials*. 2007 Jan;28(3):405-22.
62. Kasemo B, Gold J. Implant surfaces and interface processes. *Adv Dent Res*. 1999 Jun;13:8-20. Review.
63. Kusakawa Y, Yoshida E, Hayakawa T. Protein Adsorption to Titanium and Zirconia Using a Quartz Crystal Microbalance Method. *Biomed Res Int*. 2017; 2017:1521593.
64. Kasemo B. Biological surface science. *Surf. Sci*. 500. 2002; 656-677.

65. Xu LC, Bauer JW, Siedlecki CA. Proteins, platelets, and blood coagulation at biomaterial interfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014 Dec 1; 124:49-68.
66. El-Mohri H, Wu Y, Mohanty S, Ghosh G. Impact of matrix stiffness on fibroblast function. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017 May 1; 74:146-151.
67. Donno R. Nanomechanical Characterisation of Cells and Biocompatible Substrates. Ph.D. Thesis, School of Medicine, The University of Manchester, Causeway Bay, UK, 2013.
68. Panzetta V. Evaluation of Material Mechanical Properties Influences on Single Cell Mechanics. In Research Doctorate in Ingegneria dei Materiali e Delle Strutture XXIII Cycle, Facoltà di Ingegneria Dipartimento di Ingegneria dei Materiali e Della Produzione; Università degli studi di Napoli "Federico II": Napoli, Italia, 2011.
69. Dokukina IV, Gracheva ME. A model of fibroblast motility on substrates with different rigidities. *Biophys J*. 2010 Jun 16;98(12):2794-803.
70. Qiu Q, Sayer M, Kawaja M, Shen X, Davies JE. Attachment, morphology, and protein expression of rat marrow stromal cells cultured on charged substrate surfaces. *J Biomed Mater Res*. 1998; 42:117-27.
71. Ghibaudo M, Trichet L, Le Digabel J, Richert A, Hersen P, Ladoux B. Substrate topography induces a crossover from 2D to 3D behavior in fibroblast migration. *Biophys J*. 2009 Jul 8;97(1):357-68.
72. Drelich JW, Chibowski E, Meng D.D, Terpilowski K. Hydrophilic and Superhydrophilic Surfaces and Materials. *Soft Matter* 2011, 7(21):9804-9828.
73. Dataphysics. Contact angle. [Internet].; 2018 [citado el 9 de abril de 2019]. Disponible en: <https://www.dataphysics-instruments.com/knowledge/understanding-interfaces/contact-angle/>
74. Israelachvili JN. Chapter 17: Adhesion and Wetting Phenomena. In Israelachvili JN. *Intermolecular and Surface Forces*.: Academic Press; 2011. P. 415-467.
75. Rupp F, Gittens RA, Scheideler L, Marmur A, Boyan BD, Schwartz Z, Geis-Gerstorfer J. A review on the wettability of dental implant surfaces I: theoretical and experimental aspects. *Acta Biomater*. 2014 Jul;10(7):2894-906.
76. Levy F, Pardini LC. Capítulo 5: Adesão e interface reforço/matriz. En *Compositos estruturais: ciência e tecnologia*. 1ª Ed.: Edgard Blücher Ltda.; 2016. p.171-182.

77. Kwok DY, Neumann AW. Contact angle interpretation in terms of solid surface tension. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects* 2000; 161: 31-48.
78. Yoshida F, Tsujimoto A, Ishii R, Nojiri K, Takamizawa T, Miyazaki M, Latta MA. Influence of surface treatment of contaminated lithium disilicate and leucite glass ceramics on surface free energy and bond strength of universal adhesives. *Dent Mater J.* 2015;34(6):855-62.
79. Dataphysics. Dispersive & polar parts of the surface energy and surface tension. [Internet].; 2018 [citado el 9 de abril de 2019]. Disponible en: <https://www.dataphysics-instruments.com/knowledge/understanding-interfaces/dispersive-polar-parts/>
80. Gittens RA, Scheideler L, Rupp F, Hyzy SL, Geis-Gerstorfer J, Schwartz Z, Boyan BD. A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects. *Acta Biomater.* 2014 Jul;10(7):2907-18.
81. Yamano S, Ma AK, Shanti RM, Kim SW, Wada K, Sukotjo C. The influence of different implant materials on human gingival fibroblast morphology, proliferation, and gene expression. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 2011; 26(6):1247–1255.
82. Xu LC, Siedlecki CA. Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials.* 2007 Aug;28(22):3273-83.
83. Zheng M, Yang Y, Liu XQ, Liu MY, Zhang XF, Wang X, Li HP, Tan JG. Enhanced Biological Behavior of In Vitro Human Gingival Fibroblasts on Cold Plasma-Treated Zirconia. *PLoS One.* 2015 Oct 13;10(10):e0140278.
84. Noro A, Kaneko M, Murata I, & Yoshinari M. Influence of surface topography and surface physicochemistry on wettability of zirconia (tetragonal zirconia polycrystal) *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials* 2013; 101(2):355-63.
85. Webb K, Hlady V, Tresco PA. Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeletal organization. *J Biomed Mater Res.* 1998 Sep 5;41(3):422-30.
86. Vogler EA. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science* 1998; 74:69-117.
87. Rupp F, Liang L, Geis-Gerstorfer J, Scheideler L, Hüttig F. Surface characteristics of dental implants: A review. *Dent Mater.* 2018 Jan;34(1):40-57.

88. Harbers GM, Grainger DW. Chapter 5 – Cell-Material Interactions: Fundamental Design Issues for Tissue Engineering and Clinical Considerations. In Hollinger, J. O. *An Introduction to Biomaterials*, 2nd Ed.: Hoboken 2011. p. 61-77.
89. Dérand H. Protein interfacial behaviour in microfabricated analysis systems and microarrays. In: Malmsten M, editor. *Surfactant science series*, vol. 110—biopolymers at interfaces. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc.; 2003. p.393.342.
90. Razafiarison T, Silván U, Meier D, Snedeker JG. Surface-Driven Collagen Self-Assembly Affects Early Osteogenic Stem Cell Signaling. *Adv Healthc Mater.* 2016 Jun;5(12):1481-92.
91. Thevenot P, Hu W, Tang L. Surface chemistry influences implant biocompatibility. *Curr Top Med Chem.* 2008; 8(4):270–280.
92. Altankov G, Groth T. Reorganization of substratum-bound fibronectin on hydrophilic and hydrophobic materials is related to biocompatibility. *J Mater Sci: Mater Med* 1994; 5: 732.
93. Altankov G, Grinnell F, Groth T. Studies on the biocompatibility of materials: fibroblast reorganization of substratum-bound fibronectin on surfaces varying in wettability. *J Biomed Mater Res.* 1996 Mar;30(3):385-91.
94. Luong-Van E, Rodriguez I, Low H Y, Elmouelhi N, Lowenhaupt B, Natarajan S, Lim CT, Prajapati R, Vyakarnam M, Cooper K. Review: Micro- and nanostructured surface engineering for biomedical applications, *J. Mater. Res.* 2013; 28(2):165–174.
95. Williams, DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008; 29 (20):2941-2953.
96. Elshahawy W. Chapter 15: Biocompatibility. In Sikalidis C. *Advances in Ceramics Electric and Magnetic Ceramics, Bioceramics, Ceramics and Environment*. 1st Ed.: InTech Open 2011; p:359-374.
97. International Standards Organization (ISO). 10993–5:2009. *Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. International Standards Organization, Geneva; Switzerland; 2009.
98. Black J. *Biological Performance of Materials. Fundamentals of Biocompatibility*. 4th Ed.: CRC Press Taylor & Francis Group 2006. p: 3-7.
99. Williams DF. *Definitions in biomaterials: Proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials*, vol. 4. Chester, England, March 3-5, 1986. Amsterdam: Elsevier, 1987.

Bibliografia

100. Vasconcelos DP, Águas AP, Barbosa MA, Pelegrín P, Barbosa JN. The inflammasome in host response to biomaterials: Bridging inflammation and tissue regeneration. *Acta Biomater.* 2019 Jan 1;83:1-12.
101. Sudhakar CK, Nitish U, Arpit V, Jain A, Narayana CR, Sanjay J. Chapter 1 - Nanomedicine and Tissue Engineering. In Thomas S., Grohens Y., Ninan N. *Nanotechnology Applications for Tissue Engineering*. 1st Ed.: William Andrew Publishing 2015. p:1-19.
102. Migonney V. *Biomaterials*. 1st Ed.: John Wiley & Sons, Incorporated 2014. p.12-19; 40-43; 181-195.
103. Bartis D, Pongracz J. Three-dimensional tissue cultures and tissue engineering. [Internet]. University of Pécs. Pécs Medical School; 2011 [citado el 30 de junio de 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/271373926_Three_dimensional_tissue_cultures_and_tissue_engineering
104. Lyanpina M, Yaneva-Deliverska M, Deliversky J, Kisselova A. Borderline and classification in the Community regulatory framework for Medical devices – brief review on some Dentistry products. *J of IMAB.* 2015 Jan-Mar;21(1):709-712.
105. Directiva 93/42/CEE del consejo de 14 de junio de 1993 relativa a los productos sanitarios.
106. Directiva 98/79/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de octubre de 1998 sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro.
107. International Standards Organization (ISO). 13485:2016. Medical devices -- Quality management systems--Requirements for regulatory purposes. International Standards Organization, Geneva; Switzerland; 2016.
108. Weinstein M, Katz S, Weinstein AB. 3 052 982. US patent. 1962
109. Zhang Y, Kelly JR. Dental Ceramics for Restoration and Metal Veneering. *Dent Clin North Am.* 2017;61(4):797–819.
110. Cordeiro JM, Barão VAR. Is there scientific evidence favoring the substitution of commercially pure titanium with titanium alloys for the manufacture of dental implants? *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017 Feb 1;71:1201-1215.
111. Gautam C, Joyner J, Gautam A, Rao J, Vajtai R. Zirconia based dental ceramics: structure, mechanical properties, biocompatibility and applications. *Dalton Trans.* 2016 Dec 6;45(48):19194-19215.
112. Vallet-Regí M. *Bio-Ceramics with Clinical Applications*. 1st Ed.: John Wiley & Sons, Incorporated 2014. p.3-7; 78;96-97;153-161.

113. Shen J, Kosmac T. Advanced ceramics for dentistry. 1st Ed.: Waltham, MA: Butterworth-Heinemann. 2014. p:212-215; 219-244; 255-275; 332.
114. Kelly JR, Benetti P. Ceramic materials in dentistry: historical evolution and current practice. Aust Dent J. 2011 Jun; 56(1):84-96.
115. Gracis S, Thompson VP, Ferencz JL, Silva NR, Bonfante EA. A new classification system for all-ceramic and ceramic-like restorative materials. Int J Prosthodont. 2015 May-Jun;28(3):227-35.
116. Guess PC, Schultheis S, Bonfante EA, Coelho PG, Ferencz JL, Silva NR. All-ceramic systems: laboratory and clinical performance. Dent Clin North Am. 2011 Apr; 55(2):333-52.
117. Bajraktarova-Valjakova E, Korunoska-Stevkovska V, Kapusevska B, Gigovski N, Bajraktarova-Misevska C, Grozdanov A. Contemporary Dental Ceramic Materials, A Review: Chemical Composition, Physical and Mechanical Properties, Indications for Use. Open Access Maced J Med Sci. 2018;6(9):1742–1755.
118. Li RWK, Chow TW, Matinlinna JP. Ceramic dental biomaterials and CAD/CAM technology: State of the art. J Prosthodont Res. 2014; 58(4):208-16.
119. Chen H, Li CH. CEREC Digest Blog [Internet]. Taiwan: Chen H. [Sept 2017]– [citado el 7 julio de 2019]. Disponible en <https://www.cerecdigest.net/2017/09/10/investigation-margin-performance-cerasmart/>
120. Griggs JA. Recent advances in materials for all-ceramic restorations. Dent Clin North Am. 2007 Jul;51(3):713-27.
121. Helvey GA. Classifying dental ceramics: numerous materials and formulations available for indirect restorations. Compend Contin Educ Dent. 2014 Jan;35(1):38-43.
122. Shenoy A, Shenoy N. Dental ceramics: An update. J Conserv Dent. 2010;13(4):195–203.
123. Sjöberg S. Silica in aqueous environments. J. Non-Cryst. Solids. 1996; 196:51–57.
124. Hallmann L, Ulmer P, Kern M. Effect of microstructure on the mechanical properties of lithium disilicate glass-ceramics. J Mech Behav Biomed Mater. 2018 Jun;82:355-370.

Bibliografia

125. IPS e. max lithium disilicate: the future of all-ceramic dentistry—material science, practical applications, keys to success. Ivoclar Vivadent, Inc. Amherst, New York. 2009. p:1-3.
126. IPS e.max® CAD Scientific Documentation. Ivoclar Vivadent AG. Schaan, Liechtenstein. 2017.
127. Kracek FC. The binary system Li₂O - SiO₂. J Phys Chem. 1930;34(12); 2641-50.
128. Willard A, Gabriel Chu TM. The science and application of IPS e.Max dental ceramic. Kaohsiung J Med Sci. 2018 Apr;34(4):238-242.
129. Gehrt M., Wolfart S., Rafai N., Reich S., Edelhoff D. Clinical results of lithium-disilicate crowns after up to 9 years of service. Clin Oral Investig. 2013 Jan;17(1):275-84.
130. El-Meliegy EE, Noort R. Chapter 12: Lithium Disilicate Glass Ceramics. In Glasses and Glass Ceramics for Medical Applications. 2012. 1st Ed.: New York: Springer Science+Business Media LLC. p: 209–218.
131. Rinke S, Pabel AK, Rödiger M, Ziebolz D. Chairside Fabrication of an All-Ceramic Partial Crown Using a Zirconia-Reinforced Lithium Silicate Ceramic. Case Rep Dent. 2016;2016:1354186.
132. Fabian Fonzar R, Carrabba M, Sedda M, Ferrari M, Goracci C, Vichi A. Flexural resistance of heat-pressed and CAD-CAM lithium disilicate with different translucencies. Dent Mater. 2017 Jan;33(1):63-70.
133. Höland, W, Beall, GH. Glass-ceramic technology. 1st Ed.: Westerville: The American Ceramic Society. 2002; p:1–84.
134. Lien W, Roberts HW, Platt JA, Vandewalle KS, Hill TJ, Chu TM. Microstructural evolution and physical behavior of a lithium disilicate glass-ceramic. Dent Mater. 2015 Aug;31(8):928-40.
135. Pieger S., Salman A., Bidra A.S. Clinical outcomes of lithium disilicate single crowns and partial fixed dental prostheses: a systematic review. J Prosthet Dent. 2014 Jul;112(1):22-30.
136. Silva LHD, Lima E, Miranda RBP, Favero SS, Lohbauer U, Cesar PF. Dental ceramics: a review of new materials and processing methods. Braz Oral Res. 2017 Aug 28;31(1):58.
137. Denry I, Holloway JA. Ceramics for dental applications: A review. Materials. 2010; 3(1):351-68.

138. Krüger S, Deubener J, Ritzberger C, Höland W. Nucleation kinetics of lithium metasilicate in ZrO₂-bearing lithium disilicate glasses for dental application. *Int J Appl Glass Sci* 2013;4(1):9-19.
139. Traini T, Sinjari B, Pascetta R, Serafini N, Perfetti G, Trisi P, Caputi S. The zirconia-reinforced lithium silicate ceramic: lights and shadows of a new material. *Dent Mater J*. 2016 Oct 1;35(5):748-755.
140. Elsaka SE, Elnaghy AM. Mechanical properties of zirconia reinforced lithium silicate glass-ceramic. *Dent Mater*. 2016 Jul;32(7):908-14.
141. Vita Suprinity®. Technical and scientific documentation. BadSäckingen, Germany: Vita Zahnfabrik; 2014.
142. Celtra® Duo Zirconia-Reinforced Lithium Silicate (ZLS) Block. Technical Monograph. Dentsply Sirona.2016
143. Imagen obtenida de la web http://picdeer.com/media/1553033381810241995_464634287
144. Imagen obtenida de la web <https://www.rolanddga.com/products/dental/dental-clinical-milling>
145. Denry I, Kelly JR. Emerging ceramic-based materials for dentistry. *J Dent Res*. 2014;93(12):1235–1242.
146. Sieper K, Wille S, Kern M. Fracture strength of lithium disilicate crowns compared to polymer-infiltrated ceramic-network and zirconia reinforced lithium silicate crowns. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater*. 2017, 74, 342–348.
147. Aurélio IL, Dorneles LS, May LG. Extended glaze firing on ceramics for hard machining: Crack healing, residual stresses, optical and microstructural aspects. *Dental Materials*. 2017; 33(2): 226-240.
148. Lambert H, Durand JC, Jacquot B, Fages M. Dental biomaterials for chairside CAD/CAM: State of the art. *J. Adv. Prosthodont*. 2017; 9(6):486–495.
149. Colombo M, Poggio C, Lasagna A, Chiesa M, Scribante A. Vickers Micro-Hardness of New Restorative CAD/CAM Dental Materials: Evaluation and Comparison after Exposure to Acidic Drink. *Materials*. 2019 Apr 16;12(8).
150. Sen N, Us YO. Mechanical and optical properties of monolithic CAD-CAM restorative materials. *J Prosthet Dent*. 2018 Apr;119(4):593-599.
151. Tangsatchatham S, Juntavee N. Flexural strength of various types of computerized machinable ceramic veneered to yttria stabilized tetragonal

- zirconia polycrystalline ceramic upon different hybridized techniques. *Clin Cosmet Investig Dent*. 2019 Apr 2;11:61-71.
152. Gomes RS, Souza CMC, Bergamo ETP, Bordin D, Del Bel Cury AA. Misfit and fracture load of implant-supported monolithic crowns in zirconia-reinforced lithium silicate. *J Appl Oral Sci*. 2017 May-Jun;25(3):282-289.
153. Riquieri H, Monteiro JB, Viegas DC, Campos TMB, de Melo RM, de Siqueira Ferreira Anzaloni Saavedra G. Impact of crystallization firing process on the microstructure and flexural strength of zirconia-reinforced lithium silicate glass-ceramics. *Dent Mater*. 2018 Oct;34(10):1483-1491.
154. Schwindling FS, Rues S, Schmitter M. Fracture resistance of glazed, full-contour ZLS incisor crowns. *J Prosthodont Res* 2017;61(3):344–9.
155. Preis V, Hahnel S, Behr M, Bein L, Rosentritt M. In-vitro fatigue and fracture testing of CAD/CAM-materials in implant-supported molar crowns. *Dent Mater*. 2017 Apr;33(4):427-433.
156. Belli R, Wendler M, de Ligny D, Cicconi MR, Petschelt A, Peterlik H, Lohbauer U. Chairside CAD/CAM materials. Part 1: Measurement of elastic constants and microstructural characterization. *Dent Mater*. 2017 Jan;33(1):84-98.
157. Zimmermann M, Egli G, Zaruba M, Mehl A. Influence of material thickness on fractural strength of CAD/CAM fabricated ceramic crowns. *Dent Mater J*. 2017 Nov 29;36(6):778-783.
158. Ramos Nde C, Campos TM, Paz IS, Machado JP, Bottino MA, Cesar PF, Melo RM. Microstructure characterization and SCG of newly engineered dental ceramics. *Dent Mater*. 2016; 32 (7):870–878.
159. Miyazaki T, Hotta Y, Kunii J, Kuriyama S, Tamaki Y. A review of dental CAD/CAM: current status and future perspectives from 20 years of experience. *Dent Mater J*. 2009 Jan;28(1):44-56.
160. Ben-Nissan B, Choi AH, Cordingley R. Alumina ceramics. In: *Bioceramics and their clinical applications*. Kokubo T edit., Woodhead Publishing LTD, Cambridge, UK, 2008:223-242.
161. Ferber MK, Brown SD. Subcritical crack growth in dense alumina exposed to physiological media. *J Am Ceram Soc* 1980; 63:424– 9.
162. Hisbergues M, Vendeville S, Vendeville P. Zirconia: Established facts and perspectives for a biomaterial in dental implantology. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009 Feb;88(2):519-29.

163. Considine DM., Considine GD. Van Nostrand's Scientific Encyclopedia. 8th Ed.: Springer Science & Business Media 1995. p.3372; 3380.
164. Yin L, Nakanishi Y, Alao AR, Song XF, Abduo J, Zhang Y. A review of engineered zirconia surfaces in biomedical applications. *Procedia CIRP*. 2017; 65:284–290.
165. Chen YW, Moussi J, Drury JL, Wataha JC. Zirconia in biomedical applications. *Expert Rev Med Devices*. 2016 Oct;13(10):945-963. Epub 2016 Sep 16.
166. Bona AD, Pecho OE, Alessandretti R. Zirconia as a Dental Biomaterial. *Materials (Basel)*. 2015 Aug 4;8(8):4978-4991.
167. Drouet C, Leriche A, Hampshire S, Kashani M, Stamboulis A, Iafisco M, Tampieri A. Chapter 2: Types of ceramics: Material class. In Palmero P., De Barra E., Cambier E. *Advances in Ceramic Biomaterials: Materials, Devices and Challenges*. 1st Ed.: Woodhead Publishing 2017. p.37-38.
168. BruxZir®. Full-Strength vs. BruxZir® Anterior – Choosing Between Transformation Toughening and Light Transmission. *Chairside Magazine*. 2011; 11(3):16.
169. Chevalier J, Gremillard L, Virkar A, Clarke DR. The Tetragonal-Monoclinic Transformation in Zirconia: Lessons Learned and Future Trends. *J. Am. Ceram. Soc.* 2009; 92(9): 1901-1920.
170. Kelly JR, Denry I. Stabilized zirconia as a structural ceramic: an overview. *Dent Mater*. 2008 Mar;24(3):289-98.
171. El-Ghany, OSA, Sherief AH. Zirconia based ceramics, some clinical and biological aspects: Review. *Futur. Dent. J.* 2016; 2(2):55–64.
172. Garvie RC, Hannink RH, Pascoe RT. (1975). Ceramic steel? *Nature* 258:703-704.
173. Chevalier J, Deville S, Münch E, Jullian R, Lair F. Critical effect of cubic phase on aging in 3mol% yttria-stabilized zirconia ceramics for hip replacement prosthesis. *Biomaterials*. 2004 Nov;25(24):5539-45.
174. Gupta TK, Bechtold JH, Kuznicki RC, Cadoff LH, Rossing B.R. Stabilization of tetragonal phase in polycrystalline zirconia. *J. Mater. Sci.* 1977, 12, 2421.
175. Mason T.O. [Advanced structural ceramics] *Encyclopaedia Britannica, Inc.* 1997. [Figure 1, Resistance to cracking in transformation-toughened zirconia].

Bibliografia

176. Matinlinna JP. Handbook of Oral Biomaterials. 1st Ed.: CRC Press: Pan Stanford Publishing. Taylor & Francis Group, LLC. 2015. p:525.
177. International Standards Organization (ISO). 13356:2008. Implants for surgery — Ceramic materials based on yttria-stabilized tetragonal zirconia(Y-TZP). International Standards Organization, Geneva, Switzerland, 2008.
178. Chevalier J, Cales B, Drouin JM. Low-temperature aging of Y-YZP ceramics. *J Am Ceram Soc* 1999; 82:2150-2154.
179. Badwal S.P.S. Zirconia-based solid electrolytes: microstructure, stability and ionic conductivity. *Solid State Ionics*, 1992; 52:23-32.
180. Kern F. Evidence of phase transitions and their role in the transient behavior of mechanical properties and low temperature degradation of 3Y-TZP made from stabilizer-coated powder. *Ceramics* 2019; 2:271-285.
181. Mao L, Kaizer MR, Zhao M, Guo B, Song YF, Zhang Y. Graded Ultra-Translucent Zirconia (5Y-PSZ) for Strength and Functionalities *J. Dent. Res* 2018; 1-7
182. Zhang F, Inokoshi M, Batuk M, Hadermann J, Naert I, Van Meerbeek B, Vleugels J. Strength, toughness and aging stability of highly-translucent Y-TZP ceramics for dental restorations. *Dent Mater.* 2016 Dec;32(12): e327-e337.
183. Zhang Y, Lawn BR. Novel Zirconia Materials in Dentistry. *J Dent Res.* 2018 Feb;97(2):140-147.
184. Zhang Y. Making yttria-stabilized tetragonal zirconia translucent. *Dent Mater.* 2014; 30:1195–1203.
185. Nakonieczny DS, Ziębowicz A, Paszenda ZK, Krawczyk C. Trends and perspectives in modification of zirconium oxide for a dental prosthetic applications – A review. *Biocybernetics and Biomedical Engineering.* 2017; 37 (1):229-245.
186. Kobayashi K, Kuwajima H, Masaki T. Phase change and mechanical properties of ZrO₂-Y₂O₃ solid electrolyte after aging. *Sol Stat Ion* 1981; 3(4):489-95.
187. Pereira GKR, Venturini AB, Silvestri T, Dapieve KS, Montagner AF, Soares FZM, Valandro LF. Low-temperature degradation of Y-TZP ceramics: A systematic review and meta-analysis. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2015 Mar; 55:151-163.
188. Nakamura K. Mechanical and Microstructural Properties of Monolithic Zirconia. Crown Fracture Resistance and Impact of Low-Temperature

- Degradation. Ph.D. Thesis, School of Odontology Sahlgrenska Academy at University of Gothenburg., University of Gothenburg: Gothenburg, Göteborg, Sweden: 2015, p: 6.
189. Denry I, Kelly JR. State of the art of zirconia for dental applications. *Dent Mater* 2008; 24(3): 299-307.
190. Miyazaki T, Nakamura T, Matsumura H, Ban S, Kobayashi T. Current status of zirconia restoration. *J Prosthodont Res*. 2013 Oct;57(4):236-61.
191. Abduo J, Lyons K. Rationale for the use of CAD/CAM technology in implant prosthodontics. *Int J of Dent*. 2013; 2013:1-8.
192. Imagen obtenida de la web <http://www.medicalexpo.com/prod/detal/product-102573-810780.html>
193. Imagen obtenida de la web: <https://lmtmag.com/products/60073>
194. Weigl P, Trimpou G, Grizas E, Hess P, Nentwig GH, Lauer HC, Lorenz J. All-ceramic versus titanium-based implant supported restorations: Preliminary 12-months results from a randomized controlled trial. *J Adv Prosthodont*. 2019 Feb;11(1):48-54.
195. Matsui K, Yoshida H, Ikuhara Y. Grain-boundary structure and microstructure development mechanism in 2–8 mol% yttria-stabilized zirconia polycrystals. *Acta Materialia*. 2008;56(6):1315–1325.
196. De Lima E, Meira JBC, Özcan M, Cesar PF. Chipping of Veneering Ceramics in Zirconium Dioxide Fixed Dental Prosthesis. *Curr Oral Health Rep* (2015) 2(4): 169-173.
197. Preis V, Weiser F, Handel G, Rosentritt M. Wear performance of monolithic dental ceramics with different surface treatments. *Quintessence Int*. 2013 May;44(5):393-405.
198. Monaco C, Caldari M, Scotti R. Clinical Evaluation of 1,132 Zirconia-Based Single Crowns: A Retrospective Cohort Study from the AIOP Clinical Research Group. *Int J Prosthodont* 2013; 26(5): 435-442.
199. Yang B, Barloi A, Kern M. Influence of air-abrasion on zirconia ceramic bonding using an adhesive composite resin. *Dent Mater*. 2010 Jan;26(1):44-50.
200. Kim KT, Eo MY, Nguyen TTH, Kim SM. General review of titanium toxicity. *Int J Implant Dent*. 2019 Mar 11;5(1):1-12.

Bibliografía

201. Osman RB, Ma S, Duncan W, De Silva RK, Siddiqi A, Swain MV. Fractured zirconia implants and related implant designs: scanning electron microscopy analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2013 May;24(5):592-7.
202. Osman RB, Swain MV. A Critical Review of Dental Implant Materials with an Emphasis on Titanium versus Zirconia. *Materials (Basel).* 2015;8(3):932–958.
203. Liñares A, Grize L, Muñoz F, Pippenger BE, Dard M, Domken O, Blanco-Carrión J. Histological assessment of hard and soft tissues surrounding a novel ceramic implant: a pilot study in the minipig. *J Clin Periodontol.* 2016 Jun;43(6):538-46.
204. Manzano G, Herrero LR, Montero J. Comparison of clinical performance of zirconia implants and titanium implants in animal models: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2014 Mar-Apr;29(2):311-20.
205. Kubasiewicz-Ross P, Hadzik J, Dominiak M. Osseointegration of zirconia implants with 3 varying surface textures and a titanium implant: A histological and micro-CT study. *Adv Clin Exp Med.* 2018 Sep;27(9):1173-1179.
206. Cannizzaro G, Torchio C, Felice P, Leone M, Esposito M. Immediate occlusal versus non-occlusal loading of single zirconia implants. A multicentre pragmatic randomised clinical trial. *Eur J Oral Implantol.* 2010 Summer;3(2):111-20.
207. Roehling S, Schlegel KA, Woelfler H, Gahlert M. Performance and outcome of zirconia dental implants in clinical studies: A meta-analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2018 Oct; 29(16):135-153.
208. Depprich R, Naujoks C, Ommerborn M, Schwarz F, Kübler NR, Handschel J. Current findings regarding zirconia implants. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* 2014 Feb; 16(1):124–137.
209. Hashim D, Cionca N, Courvoisier DS, Mombelli A. A systematic review of the clinical survival of zirconia implants. *Clin Oral Investig.* 2016 Sep; 20(7):1403-17.
210. Sivaraman K, Chopra A, Narayan AI, Balakrishnan D. Is zirconia a viable alternative to titanium for oral implant? A critical review. *J Prosthodont Res.* 2018 Apr;62(2):121-133.
211. Covacci V, Bruzzese N, Maccauro G, Andreassi C, Ricci GA, Piconi C, et al. In vitro evaluation of the mutagenic and carcinogenic power of high purity zirconia ceramic. *Biomaterials* 1999; (20):371–6.

212. Hannouche D, Zingg M, Miozzari H, Nizard R, Lübbecke A. Third-generation pure alumina and alumina matrix composites in total hip arthroplasty: What is the evidence? *EFORT Open Rev.* 2018;3(1):7–14.
213. Maji A, Choubey G. Microstructure and Mechanical Properties of Alumina Toughened Zirconia (ATZ), *Materials Today: Proceedings.* 2018; 5(2):7457-7465.
214. Raffaelli L, Rossi Iommetti P, Piccioni E, Toesca A, Serini S, Resci F, Missori M, De Spirito M, Manicone PF, Calviello G. Growth, viability, adhesion potential, and fibronectin expression in fibroblasts cultured on zirconia or feldspatic ceramics in vitro. *J Biomed Mater Res A.* 2008 Sep 15;86(4):959-68.
215. Bajraktarova-Valjakova E, Grozdanov A, Guguvcevski Lj, Korunoska-Stevkovska V, Kapusevska B, Gigovski N, Mijoska A, Bajraktarova Misevska C. Acid etching as surface treatment method for luting of glass-ceramic restorations, part I: Acids, application protocol and etching effectiveness. *Open Access Maced J Med Sci.* 2018; 6(3):568-73.
216. Duret F, Preston JD. CAD/CAM imaging in dentistry. *Curr Opin Dent* 1991; 1: 150-154
217. Mormann WH, Brandestini M, Lutz F, Barbakow F. Chair side computer-aided direct ceramic inlays. *Quintessence Int* 1989; 20: 329-339
218. Andersson M, Oden A. A new all-ceramic crown: a dense-sintered, high purity alumina coping with porcelain. *Acta Odontol Scand* 1993; 51: 59-64
219. Andersson M, Carlsson L, Persson M, Bergmann B. Accuracy of machine milling and spark erosion with a CAD/CAM system. *J Prosthet Dent* 1996; 76: 187- 193.
220. Galhano GA, Pellizzer EP, Mazaro JV. Optical impression systems for CAD-CAM restorations. *J Craniofac Surg* 2012;23:e575–9.
221. Alghazzawi TF. Advancements in CAD/CAM technology: Options for practical implementation. *J Prosthodont Res.* 2016 Apr;60(2):72-84.
222. Alghazzawi T, Alsamadani K, Lemons J, Liu PR, Essig M, Bartolucci A, et al. Effect of imaging powder and CAD/CAM stone types on the marginal gap of zirconia crowns. *J Am Dent Assoc* 2015;146(2):111–20.
223. Antoniac I.V. *Handbook of Bioceramics and Biocomposites.* 1st Ed.: Springer International Publishing Switzerland. 2016. p:1108-1110; 1208-1213.
224. Solaberrieta E, Otegi JR, Minguez R, Etxaniz O. Improved digital transfer of the maxillary cast to a virtual articulator. *J Prosthet Dent* 2014; 112(4):921–924.

Bibliografia

225. Galante R, Figueiredo-Pina CG, Serro AP. Additive manufacturing of ceramics for dental applications: A review. *Dent Mater* 2019; 35(6):825-846.
226. Tapie L, Lebon N, Mawussi B, Fron Chabouis H, Duret F, Attal JP. Understanding dental CAD/CAM for restorations – the digital workflow from a mechanical engineering viewpoint. *Int J Comput Dent* 2015;18(1):21–44.
227. Schaefer O, Decker M, Wittstock F, Kuepper H, Guentsch A. Impact of digital impression techniques on the adaption of ceramic partial crowns in vitro. *J Dent* 2014; 42(6):677–683
228. Rekow ED, Erdman AG, Riley DR, Klamecki B. CAD/CAM for dental restorations—some of the curious challenges. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 1991;38(4):314–318.
229. Örtorp A, Jönsson D, Mouhsen A, Vult von Steyern P. The fit of cobalt-chromium three-unit fixed dental prostheses fabricated with four different techniques: a comparative in vitro study. *Dental Materials*. 2011;27(4):356–363.
230. Rekow ED, Silva NRFA, Coelho PG, Zhang Y, Guess P, Thompson VP. Performance of dental ceramics: challenges for improvements. *Journal of Dental Research*. 2011;90(8):937–952.
231. Keating AP, Knox J, Bibb R, Zhurov AI. A comparison of plaster, digital and reconstructed study model accuracy. *J Orthod* 2008;35(3):191–201.
232. Choi SH, Cheung HH. A multi-material virtual prototyping system. *Computer Aided Design*. 2005;37(1):123–136.
233. Azari A, Nikzad S. The evolution of rapid prototyping in dentistry: a review. *Rapid Prototyping J*. 2009; 15: 216–225.
234. Patzelt SB, Bishti S, Stampf S, Att W. Accuracy of computer-aided design/computer-aided manufacturing-generated dental casts based on intraoral scanner data. *J Am Dent Assoc* 2014;145(11):1133–40.
235. Alharbi N, Wismeijer D, Osman RB. Additive Manufacturing Techniques in Prosthodontics: Where Do We Currently Stand? A Critical Review. *Int J Prosthodont*. 2017 Sept/Oct;30(5):474–484.
236. Abduo J, Lyons K, Bennamoun M. Trends in computer-aided manufacturing in prosthodontics: a review of the available streams. *Int J Dent*. 2014; 2014:1-16.
237. Van Noort R. The future of dental devices is digital. *Dental Materials*. 2012;28(1):3–12.

238. Tamac E, Toksavul S, Toman M. Clinical marginal and internal adaptation of CAD/CAM milling, laser sintering, and cast metal ceramic crowns. *J Prosthet Dent.* 2014 Oct;112(4):909-13.
239. Chen Z, Li Z, Li J, Liu C, Lao C, Fu Y, Liu C, Li Y, Wang P, He Y. 3D printing of ceramics: A review. *J Eur Ceram Soc* 2019; 39(4): 661-687.
240. Valverde GB, Coelho PG, Janal MN, Lorenzoni FC, Carvalho RM, Thompson VP, Weltemann KD, Silva NR. Surface characterisation and bonding of Y-TZP following non-thermal plasma treatment. *J Dent.* 2013 Jan;41(1):51-9.
241. Tabari K, Hosseinpour S, Mohammad-Rahimi H. The Impact of Plasma Treatment of Cercon® Zirconia Ceramics on Adhesion to Resin Composite Cements and Surface Properties. *J Lasers Med Sci.* 2017 Summer;8(1):S56-S61.
242. Spriano S, Sarath Chandra V, Cochis A, Uberti F, Rimondini L, Bertone E, Vitale A, Sclaro C, Ferrari M, Cirisano F, Gautier di Confiengo G, Ferraris S. How do wettability, zeta potential and hydroxylation degree affect the biological response of biomaterials? *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017 May 1;74:542-555.
243. Canullo L, Micarelli C, Lembo-Fazio L, Iannello G, Clementini M. Microscopical and microbiologic characterization of customized titanium abutments after different cleaning procedures. *Clin Oral Implants Res.* 2014 Mar;25(3):328-336.
244. Canullo L, Tallarico M, Peñarrocha-Oltra D, Monje A, Wang HL, Peñarrocha-Diago M. Implant Abutment Cleaning by Plasma of Argon: 5-Year Follow-Up of a Randomized Controlled Trial. *J Periodontol.* 2016 Apr;87(4):434-42.
245. Rizo-Gorrita M, Luna-Oliva I, Serrera-Figallo MA, Torres-Lagares D. Superficial Characteristics of Titanium after Treatment of Chorreated Surface, Passive Acid, and Decontamination with Argon Plasma. *J Funct Biomater.* 2018 Dec 11;9(4).
246. González-Blanco C, Rizo-Gorrita M, Luna-Oliva I, Serrera-Figallo MÁ, Torres-Lagares D, Gutiérrez-Pérez JL. Human Osteoblast Cell Behaviour on Titanium Discs Treated with Argon Plasma. *Materials (Basel).* 2019 May 28;12(11).
247. Hao L, Lawrence J. On the role of CO₂ laser treatment in the human serum albumin and human plasma fibronectin adsorption on zirconia (MGO-PSZ) bioceramic surface. *J Biomed Mater Res A.* 2004 Jun 15;69(4):748-56.
248. Li H, Xie Y, Li K, Huang L, Huang S, Zhao B, Zheng X. Microstructure and wear behavior of graphene nanosheets-reinforced zirconia coating. *Ceram. Int.* 2014; 40:12821–1282.

249. Roy M, Pompella A, Kubacki J, Piosik A, Psiuk B, Klimontko J, Szade J, Roy RA, Hedzelek W. Photofunctionalization of dental zirconia oxide: Surface modification to improve bio-integration preserving crystal stability. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017 Aug 1;156:194-202.
250. Hayashi T, Tanaka Y, Koide Y, Tanaka M, Hara M. Mechanism underlying bioinertness of self-assembled monolayers of oligo(ethyleneglycol)-terminated alkanethiols on gold: protein adsorption, platelet adhesion, and surface forces. *Phys Chem Phys*. 2012 Aug 7;14(29):10196-206.
251. Ito Y, Okawa T, Fukumoto T, Tsurumi A, Tatsuta M, Fujii T, Tanaka J, Tanaka M. Influence of atmospheric pressure low-temperature plasma treatment on the shear bond strength between zirconia and resin cement. *J Prosthodont Res*. 2016 Oct;60(4):289-293.
252. Soon G, Pinguan-Murphy B, Wee Lai K, Ali Akbar S. Review of zirconia-based bioceramic: Surface modification and cellular response. *Ceram. Int*. 2016; 42:12543–12555.
253. Tessmar JK, Göpferich AM. Matrices and scaffolds for protein delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007 May 30;59(4-5):274-91.
254. Kim EC, Lee DY, Lee MH, Lee HJ, Kim KH, Leesungbok R, Ahn SJ, Park SJ, Yoon JH, Jee YJ, Lee SC, Lee SW. The Effect of Fibronectin-Immobilized Microgrooved Titanium Substrata on Cell Proliferation and Expression of Genes and Proteins in Human Gingival Fibroblasts. *Tissue Eng Regen Med*. 2018 Aug 28;15(5):615-627.
255. Keselowsky BG, Collard DM, García AJ. Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. *Biomaterials*. 2004 Dec;25(28):5947-54.
256. Kidoaki S, Matsuda T. Adhesion forces of the blood plasma proteins on self-assembled monolayer surfaces of alkanethiolates with different functional groups measured by an atomic force microscope. *Langmuir* 1999; 15(22):7639-7646.
257. Schünemann FH, Galárraga-Vinueza ME, Magini R, Fredel M, Silva F, Souza JCM et al. Zirconia surface modifications for implant dentistry. *Materials Science and Engineering C*. 2019 Jan 1; 98:1294-1305.
258. Laranjeira MS, Carvalho Â, Pelaez-Vargas A, Hansford D, Ferraz MP, Coimbra S, Costa E, Santos-Silva A, Fernandes MH, Monteiro FJ. Modulation of human dermal microvascular endothelial cell and human gingival fibroblast behavior by micropatterned silica coating surfaces for zirconia dental implant applications. *Sci Technol Adv Mater*. 2014 Mar 7;15(2):025001.

259. Liu M, Zhou J, Yang Y, Zheng M, Yang J, Tan J. Surface modification of zirconia with polydopamine to enhance fibroblast response and decrease bacterial activity in vitro: A potential technique for soft tissue engineering applications. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015 Dec 1;136:74-83.
260. Lee H, Dellatore SM, Miller WM, Messersmith PB. Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *Science*. 2007 Oct 19;318(5849):426-30.
261. Nakamura M, Hori N, Namba S, Toyama T, Nishimiya N, Yamashita K. Wettability and surface free energy of polarised ceramic biomaterials. *Biomed Mater*. 2015 Jan 13;10(1):011001.
262. Nozaki K, Koizumi H, Horiuchi N, Nakamura M, Okura T, Yamashita K, Nagai A. Suppression effects of dental glass-ceramics with polarization-induced highly dense surface charges against bacterial adhesion. *Dent Mater J*. 2015; 34 (5):671-8.
263. Milleret V, Lienemann PS, Gasser A, Bauer S, Ehrbar M, Wennerberg A. Rational design and in vitro characterization of novel dental implant and abutment surfaces for balancing clinical and biological needs. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2019 Mar; 21(1):15-24.
264. Susin C, Finger Stadler A, Muszkopf ML, de Sousa Rabelo M, Ramos UD, Fiorini T. Safety and efficacy of a novel, gradually anodized dental implant surface: A study in Yucatan mini pigs. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2019 Mar; 21(1): 34-43.
265. Martínez-Rus F, Prieto M, Salido MP, Madrigal C, Özcan M, Pradíes G. A Clinical Study Assessing the Influence of Anodized Titanium and Zirconium Dioxide Abutments and Peri-implant Soft Tissue Thickness on the Optical Outcome of Implant-Supported Lithium Disilicate Single Crowns. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2017 Jan/Feb;32(1):156-163.
266. Mussano F, Genova T, Laurenti M, Zicola E, Munaron L, Rivolo P, Mandracci P, Carossa S. Early Response of Fibroblasts and Epithelial Cells to Pink-Shaded Anodized Dental Implant Abutments: An In Vitro Study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2018 May/Jun;33(3):571-579.
267. Gil MS, Ishikawa-Nagai S, Elani HW, Da Silva JD, Kim DM, Tarnow D, Schulze-Späte U, Cleber S, Bittner N. Comparison of the Color Appearance of Peri-implant Soft Tissue with Natural Gingiva Using Anodized Pink-Neck Implants and Pink Abutments: A Prospective Clinical Trial. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2019 May/June;34(3):752–758.
268. Riivari S, Shahramian K, Kangasniemi I, Willberg J, Närhi TO. TiO₂-Modified Zirconia Surface Improves Epithelial Cell Attachment. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2019 Mar/Apr;34(2):313-319.

Bibliografia

269. Brunello G, Brun P, Gardin C, Ferroni L, Bressan E, Meneghello R, Zavan B, Sivolella S. Biocompatibility and antibacterial properties of zirconium nitride coating on titanium abutments: An in vitro study. *PLoS One*. 2018 Jun 26;13(6):e0199591.
270. Preis V, Hahnel S, Behr M, Rosentritt M. In vitro performance and fracture resistance of novel CAD/CAM ceramic molar crowns loaded on implants and human teeth. *J Adv Prosthodont*. 2018;10(4):300–307.
271. Elsayed A, Wille S, Al-Akhali M, Kern M. Effect of fatigue loading on the fracture strength and failure mode of lithium disilicate and zirconia implant abutments. *Clin. Oral Implants Res*. 2017; 5:20–27.
272. Ongun S, Kurtulmus-Yilmaz S, Meriç G, Ulusoy M. A Comparative Study on the Mechanical Properties of a Polymer-Infiltrated Ceramic-Network Material Used for the Fabrication of Hybrid Abutment. *Materials (Basel)*. 2018;11(9):1681.
273. Horzum U, Ozdil B, Pesen-Okvur D. Step-by-step quantitative analysis of focal adhesions. *MethodsX*. 2014 Jul 7;(1):56-9.
274. Pandoleon P, Bakopoulou A, Papadopoulou L, Koidis P. Evaluation of the biological behaviour of various dental implant abutment materials on attachment and viability of human gingival fibroblasts. *Dent Mater J* 2019 Jul; 35(7):1053-1063.
275. Arnold M, Cavalcanti-Adam EA, Glass R, Blümmel J, Eck W, Kantlehner M, et al. Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces. *Chemphyschem* 2004;5(3):383–8.
276. Brunot-Gohin C, Duval JL, Verbeke S, et al. Biocompatibility study of lithium disilicate and zirconium oxide ceramics for esthetic dental abutments. *J Periodontal Implant Sci*. 2016;46(6):362–371.
277. Brunot-Gohin C, Duval JL, Azogui EE, Jannetta R, Pezron I, Laurent-Maquin D, Gangloff SC, Egles C. Soft tissue adhesion of polished versus glazed lithium disilicate ceramic for dental applications. *Dent Mater*. 2013 Sep;29(9):e205-12.
278. Scarano A, Piattelli M, Caputi S, Favero GA, Piattelli A. Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study. *J Periodontol*. 2004 Feb;75(2):292-6.
279. Rompen E, Domken O, Degidi M, Pontes AE, Piattelli A. The effect of material characteristics, of surface topography and of implant components and connections on soft tissue integration: A literature review. *Clin. Oral Implant. Res*. 2006; 17 (2):55–67.

280. International Standards Organization (ISO). 25178:2012. Geometric Product Specifications (GPS) – Surface texture: areal. International Standards Organization, Geneva; Switzerland; 2012.
281. Dataphysics. Sessile drop method — Optical determination of the contact angle. [Internet].; 2018 [citado el 9 de abril de 2019]. Disponible en: <https://www.dataphysics-instruments.com/knowledge/understanding-interfaces/sessile-drop-method/>
282. Rapp BE. Chapter 22 - Measuring Surface Tension and Free Surface Energy. In: Rapp BE, editor. Micro and Nano Technologies, Microfluidics: Modelling, Mechanics and Mathematics. 1st ed.: Elsevier; 2017. p. 453-465.
283. Dataphysics. Determination of the surface energy of a solid. [Internet].; 2018 [citado el 9 de abril de 2019]. Disponible en: <https://www.dataphysics-instruments.com/knowledge/understanding-interfaces/solid-surface-energy/>.
284. Owens DK, Wendt RC. Estimation of the surface free energy of polymers. J. Appl. Polym. Sci. 1969; 13(8).
285. Sanchez Valenciano D. Análisis del software ImageJ para el análisis científico de imágenes. Proyecto fin de Grado en Ingeniería de Sonido e Imagen, Escuela Técnica Superior de Ingeniería y Sistemas de Telecomunicación, Universidad Politécnica de Madrid; 2014.
286. Sjögren G, Sletten G, Dahl JE. Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by millipore filter, agar overlay, and MTT tests. J Prosthet Dent. 2000 Aug;84(2):229-36.
287. Densidad óptica. [Internet]. Diccionario Español de Ingeniería DEI 1.0. [citado el 30 de mayo de 2019]. Disponible en: <http://diccionario.raing.es/es/lema/densidad-%C3%B3ptica>
288. Imagen obtenida de la web <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>
289. Kasten FH, Felder SM, Gettleman L, Alchediak T. A model culture system with human gingival fibroblasts for evaluating the cytotoxicity of dental materials. In Vitro. 1982 Jul;18(7):650-60.
290. Zizzari V, Borelli B, De Colli M, et al. SEM evaluation of human gingival fibroblasts growth onto CAD/CAM zirconia and veneering ceramic for zirconia. Ann Stomatol (Roma). 2014;4(3-4):244–249.
291. Kwon YD, Choi HJ, Lee H, Lee JW, Weber HP, Pae A. Cellular viability and genetic expression of human gingival fibroblasts to zirconia with enamel matrix derivative (Emdogain®). J. Adv. Prosthodont. 2014; (6):406–414.

Bibliografia

292. Grenade C, de Pauw-Gillet MC, Gailly P, Vanheusden A, Mainjot A. Biocompatibility of polymer-infiltrated- ceramic-network (PICN) materials with Human Gingival Fibroblasts (HGFs). *Dent. Mater.* 2016; (32):1152–1164.
293. Kent LW, Dyken RA, Rahemtulla F, Allison AC, Michalek SM. Effect of in vitro passage of healthy human gingival fibroblasts on cellular morphology and cytokine expression. *Arch. Oral Biol.* 1996; (41):263–270.
294. Pabst AM, Walter C, Bell A, Weyhrauch M, Schmidtmann I, Scheller H, Lehmann KM. Influence of CAD/CAM zirconia for implant-abutment manufacturing on gingival fibroblasts and oral keratinocytes. *Clin. Oral Investig.* 2016; (20):1101–1108.
295. Nothdurft FP, Fontana D, Ruppenthal S, May A, Aktas C, 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.* 2015; (17):1237–1249.
296. Grenade C, de Pauw-Gillet MC, Pirard, C.; Bertrand, V.; Charlier, C.; Vanheusden, A.; Mainjot, A. Biocompatibility of polymer-infiltrated-ceramic-network (PICN) materials with Human Gingival Keratinocytes (HGKs). *Dent. Mater.* 2017; (33): 333–343.
297. Linkevicius T, Apse P. Influence of abutment material on stability of peri-implant tissues: A systematic review. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 2008; (23): 449–456.
298. Abrahamsson I, Berglundh T, Glantz PO, Lindhe J. The mucosal attachment at different abutments. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol.* 1998 Sep;25(9):721-7.
299. Mecca Jr S, Ramos E, Carvalho G, Kreve S, Franco A, Dias S. Marginal adaptation of implant ceramic crowns produced with cerec system. *Eur J Gen Dent* 2019, 8(1):18-22.
300. Vahey BR, Sordi MB, Stanley K, Magini RS, Novaes de Oliveira AP, Fredel MC, Henriques B, Souza JCM. Mechanical integrity of cement- and screw-retained zirconium-lithium silicate glass-ceramic crowns to Morse taper implants. *J Prosthet Dent.* 2018 Nov;120(5):721-731.
301. Ludovichetti FS, Trindade FZ, Adabo GL, Pezzato L, Fonseca RG. Effect of grinding and polishing on the roughness and fracture resistance of cemented CAD-CAM monolithic materials submitted to mechanical aging. *J Prosthet Dent.* 2019 May;121(5):866.e1-866.e8.

302. Rosentritt M, Hahnel S, Engelhardt F, Behr M, Preis V. In vitro performance and fracture resistance of CAD/CAM-fabricated implant supported molar crowns. *Clin Oral Investig*. 2017 May;21(4):1213-1219.
303. Preis V, Behr M, Hahnel S, Rosentritt M. Influence of cementation on in vitro performance, marginal adaptation and fracture resistance of CAD/CAM-fabricated ZLS molar crowns. *Dent Mater*. 2015 Nov;31(11):1363-9.
304. Weyhrauch M, Igiel C, Scheller H, Weibrich G, Lehmann KM. Fracture Strength of Monolithic All-Ceramic Crowns on Titanium Implant Abutments. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2016 Mar-Apr;31(2):304-9.
305. Zimmermann M, Valcanaia A, Neiva G, Mehl A, Fasbinder D. Digital evaluation of the fit of zirconia-reinforced lithium silicate crowns with a new three-dimensional approach. *Quintessence Int*. 2018;49(1):9-15.
306. Lawson NC, Bansal R, Burgess JO. Wear, strength, modulus and hardness of CAD/CAM restorative materials. *Dent Mater*. 2016 Nov;32(11):e275-e283.
307. Ludovichetti FS, Trindade FZ, Werner A, Kleverlaan CJ, Fonseca RG. Wear resistance and abrasiveness of CAD-CAM monolithic materials. *J Prosthet Dent*. 2018 Aug;120(2):318.e1-318.e8.
308. Kashkari A, Yilmaz B, Brantley WA, Schricker SR, Johnston WM. Fracture analysis of monolithic CAD-CAM crowns. *J Esthet Restor Dent*. 2019 Feb 28.
309. Naveau A, Rignon-Bret C, Wulfman C. Zirconia abutments in the anterior region: A systematic review of mechanical and esthetic outcomes. *J Prosthet Dent*. 2019 May;121(5):775-781.e1.
310. Tetè S, Zizzari VL, Borelli B, De Colli M, Zara S, Sorrentino R, Scarano A, Gherlone E, Cataldi A, Zarone F. Proliferation and adhesion capability of human gingival fibroblasts onto zirconia, lithium disilicate and feldspathic veneering ceramic in vitro. *Dent Mater J*. 2014;33(1):7-15.
311. Linkevicius T, Vaitelis J. The effect of zirconia or titanium as abutment material on soft peri-implant tissues: A systematic review and meta-analysis. *Clin. Oral Implants Res*. 2015, 26, 139–147.
312. Sampatanukul T, Serichetaphongse P, Pimkhaokham A. Histological evaluations and inflammatory responses of different dental implant abutment materials: A human histology pilot study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2018 Apr;20(2):160-169.
313. Geckili O. Limited Evidence Suggests That Zirconia Abutments Generate Less Bleeding on Probing Around Implants Compared to Titanium Abutments. *J Evid Based Dent Pract*. 2018 Dec;18(4):346-348.

Bibliografía

314. Schwarz F, Messias A, Sanz-Sánchez I, Carrillo de Albornoz A, Nicolau P, Taylor T, Beuer F, Schär A, Sader R, Guerra F, Sanz M. Influence of implant neck and abutment characteristics on peri-implant tissue health and stability. Oral reconstruction foundation consensus report. Clin Oral Implants Res. 2019 Apr 21.
315. Degidi M, Artese L, Scarano A, Perrotti V, Gehrke P, Piattelli A. Inflammatory infiltrate, microvessel density, nitric oxide synthase expression, vascular endothelial growth factor expression, and proliferative activity in peri-implant soft tissues around titanium and zirconium oxide healing caps. J Periodontol. 2006 Jan; 77(1): 73-80.
316. Atsuta I, Ayukawa Y, Furuhashi A, Narimatsu I, Kondo R, Oshiro W, Koyano K. Epithelial sealing effectiveness against titanium or zirconia implants surface. J Biomed Mater Res A. 2019 Jul;107(7):1379-1385.
317. Welander M, Abrahamsson I, Berglundh T. The mucosal barrier at implant abutments of different materials. Clin Oral Implants Res. 2008 Jul;19(7):635-41.
318. Roehling S, Astasov-Frauenhoffer M, Hauser-Gerspach I, Braissant O, Woelfler H, Waltimo T, Kniha H, Gahlert M. In Vitro Biofilm Formation on Titanium and Zirconia Implant Surfaces. J Periodontol. 2017 Mar;88(3):298-307.
319. Rimondini L, Cerroni L, Carrassi A, Torricelli P. Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: an in vitro and in vivo study. Int J Oral Maxillofac Implants. 2002 Nov-Dec;17(6):793-8.
320. Hu M, Chen J, Pei X, Han J, Wang J. Network meta-analysis of survival rate and complications in implant-supported single crowns with different abutment materials. J Dent. 2019 Apr 12.
321. Lops D, Stellini E, Sbricoli L, Cea N, Romeo E, Bressan E. Influence of abutment material on peri-implant soft tissues in anterior areas with thin gingival biotype: a multicentric prospective study. Clin Oral Implants Res. 2017 Oct;28(10):1263-1268.
322. Kim A, Campbell SD, Viana MA, Knoernschild KL. Abutment Material Effect on Peri-implant Soft Tissue Color and Perceived Esthetics. J Prosthodont. 2016 Dec;25(8):634-640.
323. Sala L, Bascones-Martínez A, Carrillo-de-Albornoz A. Impact of abutment material on peri-implant soft tissue color. An in vitro study. Clin Oral Investig. 2017 Sep;21(7):2221-2233.
324. Bidra AS, Rungruanunt P. Clinical outcomes of implant abutments in the anterior region: a systematic review. J Esthet Restor Dent. 2013 Jun;25(3):159-76.

325. Atash R, Boularbah MR, Sibel C. Color variation induced by abutments in the superior anterior maxilla: an in vitro study in the pig gingiva. *J Adv Prosthodont.* 2016 Dec;8(6):423-432.
326. de Medeiros RA, Vechiato-Filho AJ, Pellizzer EP, Mazaro JV, dos Santos DM, Goiato MC. Analysis of the peri-implant soft tissues in contact with zirconia abutments: an evidence-based literature review. *J Contemp Dent Pract.* 2013 May 1;14(3):567-72.
327. van Brakel R, Meijer GJ, Verhoeven JW, Jansen J, de Putter C, Cune MS. Soft tissue response to zirconia and titanium implant abutments: an in vivo within-subject comparison. *J Clin Periodontol.* 2012 Oct;39(10):995-1001.
328. Wittneben JG, Gavric J, Belser UC, Bornstein MM, Joda T, Chappuis V, et al. Esthetic and clinical performance of implant-supported all-ceramic crowns made with prefabricated or cad/cam zirconia abutments: a randomized, multicenter clinical trial. *J Dent Res* 2017;96(2):163–70.
329. Vechiato-Filho AJ, Pesqueira AA, De Souza GM, dos Santos DM, Pellizzer EP, Goiato MC. Are zirconia implant abutments safe and predictable in posterior regions? A systematic review and meta-analysis. *Int J Prosthodont* 2016;29(3):233–44.
330. Cosgarea R, Gasparik C, Dudea D, Culic B, Dannewitz B, Sculean A. Peri-implant soft tissue colour around titanium and zirconia abutments: a prospective randomized controlled clinical study. *Clin Oral Implants Res.* 2015 May;26(5):537-44.
331. Huang S, Cao P, Wang C, Huang Z, Gao W. Fabrication of a high-strength lithium disilicate glass-ceramic in a complex glass system, *Journal of Asian Ceramic Societies.* 2013; 1(1): 46-52.
332. Dunn GA, Brown AF. Alignment of fibroblasts on grooved surfaces described by a simple geometric transformation. *J Cell Sci.* 1986 Jul;83:313-40.
333. Martínez-Rus F, Pradíes G, Suárez GMJ, Rivera GB. Cerámicas dentales: clasificación y criterios de selección. *RCOE [Internet].* 2007 Dic; 12(4): 253-263.
334. Strasser T, Preis V, Behr M, Rosentritt M. Roughness, surface energy, and superficial damages of CAD/CAM materials after surface treatment. *Clin Oral Investig.* 2018 Nov;22(8):2787-2797.
335. Echeverri Palomino DM, Garzón Rayo H. Cementación de estructuras para prótesis parcial fija en zirconia. *Rev Fac Odontol Univ Antioq.* 2013 June; 24(2):321-335.
336. Manicone PF, Rossi Iommetti P, Raffaelli L. An overview of zirconia ceramics: basic properties and clinical applications. *J Dent.* 2007 Nov;35(11):819-26.

337. Denry I. How and when does fabrication damage adversely affect the clinical performance of ceramic restorations? *Dent. Mater.* 2013; 29 (1):85–96.
338. Alao AR, Stoll R, Song XF, Miyazaki T, Hotta Y, Shibata Y, Yin L. Surface quality of yttria-stabilized tetragonal zirconia polycrystal in CAD/CAM milling, sintering, polishing and sandblasting processes. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2017; 65:102–116.
339. Dal Piva A, Contreras L, Ribeiro FC., Anami LC, Camargo S, Jorge A, Bottino MA. Monolithic Ceramics: Effect of Finishing Techniques on Surface Properties, Bacterial Adhesion and Cell Viability. *Oper. Dent.* 2018 May/Jun; 43 (3):315–325.
340. Brunette DM, Chehroudi B. The effects of the surface topography of micromachined titanium substrata on cell behavior in vitro and in vivo. *J. Biomech. Eng.* 1999; 121 (1):49–57.
341. Cochran D, Simpson J, Weber HP, Buser D. Attachment and growth of periodontal cells on smooth and rough titanium. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 1994; 9(3):289–297.
342. Fischer NG, Wong J, Baruth A, Cerut DR. Effect of Clinically Relevant CAD/CAM Zirconia Polishing on Gingival Fibroblast Proliferation and Focal Adhesions. *Materials* 2017; 10(2):1358.
343. Kunzler TP, Drobek T, Schuler M, Spencer ND. Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients. *Biomaterials* 2007; 28 (13):2175–2182.
344. Pendegrass CJ, Gordon D, Middleton CA, Sun S, Blunn W. Sealing the skin barrier around transcutaneous implants: In vitro study of keratinocyte proliferation and adhesion in response to surface modifications of titanium alloy. *J. Bone Jt. Surg. Br.* 2008; 90(1):114–121.
345. Cho YD, Shin JC, Yoon HI, Ku Y, Ryoo HM, Kim DJ, Kim DG, Han JS. Characterization of Human Gingival Fibroblasts on Zirconia Surfaces Containing Niobium Oxide. *Materials (Basel)*. 2015 Sep 10;8(9):6018-6028.
346. Wood MA, Bagnaninchi P, Dalby MJ. The beta integrins and cytoskeletal nanoimprinting. *Exp Cell Res.* 2008 Feb;314(4) 927-935.
347. Ngandu Mpoyi E, Cantini M, Reynolds PM, Gadegaard N, Dalby MJ, Salmerón-Sánchez M. Protein Adsorption as a Key Mediator in the Nanotopographical Control of Cell Behavior. *ACS Nano.* 2016 Jul 26;10(7):6638-47.
348. Kournetas N, Spintzyk S, Schweizer E, Sawada T, Said F, Schmid P, Geisgerstorfer J, Eliades G, Rupp F. Comparative evaluation of topographical data

- of dental implant surfaces applying optical interferometry and scanningelectron microscopy. *Dent Mater.* 2017 Aug;33(8): e317-e327.
349. Hopp I, Michelmore A, Smith LE, Robinson DE, Bachhuka A, Mierczynska A, Vasilev K. The influence of substrate stiffness gradients on primary human dermal fibroblasts. *Biomaterials.* 2013 Jul;34(21):5070-7.
350. Lo CM, Wang HB, Dembo M, Wang YL. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys. J.* 2000; 79 (1):144–152.
351. Yeung T, Georges PC, Flanagan LA, Marg B, Ortiz M, Funaki M, Zahir N, Ming W, Weaver V, Janmey PA. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2005 Jan;60(1):24-34.
352. Freytes DO, Wan LQ, Vunjak-Novakovic G. Geometry and force control of cell function. *J. Cell. Biochem.* 2009; 108(5):1047–1058
353. Siani A, Robert-Nicoud G, Cellesi F, Tirelli N. Quantitative descriptors for the effect of nature/mechanical properties of solid substrates on fibroblast morphology. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2012;10(3):265-72.
354. Gupta M, Sarangi BR, Deschamps J, Nematbakhsh Y, Callan-Jones A, Margadant F, Mège RM, Lim CT, Voituriez R, Ladoux B. Adaptive rheology and ordering of cell cytoskeleton govern matrix rigidity sensing. *Nat Commun.* 2015 Jun 25;6:7525.
355. Solon J, Levental I, Sengupta K, Georges PC, Janmey PA. Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates. *Biophys J.* 2007;93(12):4453–4461.
356. Vita Zahnfabrik BadSäckingen. VITA YZ Technical and Scientific Documentation; Vita Zahnfabrik BadSäckingen: Bad Säckingen, Germany, 2014.
357. An N, Rausch-fan X, Wieland M, Matejka M, Andrukhov O, Schedle A. Initial attachment, subsequent cell proliferation/viability and gene expression of epithelial cells related to attachment and wound healing in response to different titanium surfaces. *Dent Mater.* 2012 Dec;28(12):1207-14.
358. Kloss FR, Steinmüller-Nethl D, Stigler RG, Ennemoser T, Rasse M, Hächl O. In vivo investigation on connective tissue healing to polished surfaces with different surface wettability. *Clin. Oral Impl. Res.* 2011; 22(7): 699–705.
359. Watanabe H, Saito K, Kokubun K, Sasaki H, Yoshinari M. Change in surface properties of zirconia and initial attachment of osteoblast like cells with hydrophilic treatment. *Dent Mater J.* 2012;31(5):806-14.

Bibliografia

360. Kock-Yee L, Hong Z. Surface Wetting. Chapter 2: Contact Angle Measurements and Surface Characterization Techniques. In: Kock-Yee L., Hong Z. Characterization, Contact Angle, and Fundamentals. 1st Ed.: Springer International Publishing; 2016. p. 7-11.
361. Vogler EA. Water and the acute biological response to surfaces. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1999;10(10):1015-45.
362. Schmalz G. Chapter 6: Cements and Ceramics. In: Schmalz G., Arenholt-Bidslev D. Biocompatibility of Dental Materials. 1st Ed.: Springer Science & Business Media; 2008. p. 177-180.
363. Milleding P, Gerdes S, Holmberg K, Karlsson S. Surface energy of non-corroded and corroded dental ceramic materials before and after contact with salivary proteins. *Eur J Oral Sci.* 1999 Oct;107(5):384-92.
364. Milleding P, Karlsson S, Nyborg L. On the surface elemental composition of non-corroded and corroded dental ceramic materials in vitro. *J Mater Sci Mater Med.* 2003 Jun;14(6):557-66.
365. Hahnel S. Chapter 5: Biofilms on dental implants. In Deng Y., Wie L. Biofilms and Implantable Medical Devices. 1st Ed.: Woodhead Publishing. 2017; p.117-140.
366. Meier R, Hauser-Gerspach I, Lüthy H, Meyer J. Adhesion of oral streptococci to all-ceramics dental restorative materials in vitro. *J Mater Sci Mater Med.* 2008 Oct;19(10):3249-53.
367. Ramakrishnaiah R, Alkheraif AA, Divakar DD, Matinlinna JP, Vallittu PK. The Effect of Hydrofluoric Acid Etching Duration on the Surface Micromorphology, Roughness, and Wettability of Dental Ceramics. *Int J Mol Sci.* 2016 May 27;17(6).
368. Wenzel RN. Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Industrial & Engineering Chemistry* 1936; 28(8): 988–994.
369. Marmur A, Della Volpe C, Siboni S, Amirfazli A, and Drelich JW. Contact angles and wettability: towards common and accurate terminology. *J Surface Innovations* 2017; 5(1):3-8
370. Quéré D. Wetting and roughness. *Ann Rev Mater Res.* 2008; 38:71–99.
371. Astasov-Frauenhoffer M, Glauser S, Fischer J, Schmidli F, Waltimo T, Rohr N. Biofilm formation on restorative materials and resin composite cements. *Dent Mater.* 2018 Nov;34(11):1702-1709.
372. Rupp F, Scheideler L, Olshanska N, de Wild M, Wieland M, & Geis-Gerstorfer J. Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical

- modification of microstructured titanium implant surfaces *Journal of Biomedical Materials Research* 2006; 76(2):323-334.
373. Drelich JW. Contact angles: From past mistakes to new developments through liquid-solid adhesion measurements. *Adv Colloid Interface Sci.* 2019 May;267:1-14.
374. Elson EL. Cellular mechanics as an indicator of cytoskeletal structure and function. *Annu Rev Biophys Chem.* 1988;17:397-430.
375. Jean RP, Gray DS, Spector AA, Chen CS. Characterization of the nuclear deformation caused by changes in endothelial cell shape. *J Biomech Eng.* 2004 Oct;126(5):552-8.
376. Vishavkarma R, Raghavan S, Kuyyamudi C, Majumder A, Dhawan J, Pullarkat PA. Role of actin filaments in correlating nuclear shape and cell spreading. *PLoS One.* 2014 Sep 24;9(9):e107895.
377. Ingber DE. Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J Cell Sci.* 2003 Apr 1;116(7):1157-73.
378. Nebe B, Forster C, Pommerenke H, Fulda G, Behrend D, Bernewski U, Schmitz KP, Rychly J. Structural alterations of adhesion mediating components in cells cultured on poly-beta-hydroxy butyric acid. *Biomaterials.* 2001 Sep;22(17):2425-34.
379. Abercrombie M. Fibroblasts. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol).* 1978;12:1-6.
380. Hunter A, Archer CW, Walker PS, Blunn GW. Attachment and proliferation of osteoblasts and fibroblasts on biomaterials for orthopaedic use. *Biomaterials.* 1995 Mar;16(4):287-95.
381. Knetsh LWM. Chapter 13: Evolution of Current and Future Concepts of Biocompatibility Testing. In: Dumitriu S., Popa V. *Polymeric Biomaterials: Structure and function Volume 1.1st Ed.*: CRC Press; 2013. p. 385-396.
382. Brackett MG, Lockwood PE, Messer RL, Lewis JB, Bouillaguet S, Wataha JC. In vitro cytotoxic response to lithium disilicate dental ceramics. *Dent Mater.* 2008 Apr;24(4):450-6.
383. Killic K, Kesim B, Sumer Z, Polat Z, Kesim S. In vitro cytotoxicity of all-ceramic substructural materials after aging. *J Dent Sci* 2013; 8(3):231-238.
384. Forster A, Ungvári K, Györgyey Á, Kukovecz Á, Turzó K, Nagy K. Human epithelial tissue culture study on restorative materials. *J Dent* 2014;42(1):7-14.

Bibliografia

385. Kim YS, Shin SY, Moon SK, Yang SM. Surface properties correlated with the human gingival fibroblasts attachment on various materials for implant abutments: a multiple regression analysis. *Acta Odontol Scand.* 2015 Jan;73(1):38-47.
386. Kim YS, Ko Y, Kye SB, Yang SM. Human gingival fibroblast (HGF-1) attachment and proliferation on several abutment materials with various colors. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2014 Jul-Aug;29(4):969-75.
387. Elshahawy W, Shohieb F, Yehia H, Etman W, Watanabe I, Kramer P. Cytotoxic effect of elements released clinically from gold and CAD-CAM fabricated ceramic crowns. *Tanta Dental Journal* 2014; 11(3): 189-193.
388. Milleding P, Haraldsson C, Karlsson S. Ion leaching from dental ceramics during static in vitro corrosion testing. *J Biomed Mater Res.* 2002 Sep 15;61(4):541-50.
389. Sulaiman Li TA, Abdulmajeed AA, Shahramian K, Hupa L, Donovan TE, Vallittu P, Närhi TO. Impact of gastric acidic challenge on surface topography and optical properties of monolithic zirconia. *Dent Mater.* 2015 Dec;31(12):1445-52.
390. Seabra A, Durán N. Nanotoxicology of Metal Oxide Nanoparticles. *Metals* 2015; 5(2):934-975.
391. Atay A, Gürdal I, Bozok I, Çetintas V, Üşümez A, Cal E. Effects of New Generation All-Ceramic and Provisional Materials on Fibroblast Cells. *J Prosthodont.* 2018 Jan;28(1):e383-e394.
392. 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;13(1):61.
393. Nistor L, Grădinaru M, Rîcă R, Mărășescu P, Stan M, Manolea H, Ionescu A, Moraru I. Zirconia Use in Dentistry - Manufacturing and Properties. *Curr Health Sci J.* 2019 Jan-Mar;45(1):28-35.
394. Kramer PR, Janik Keith A, Cai Z, Ma S, Watanabe I. Integrin mediated attachment of periodontal ligament to titanium surfaces. *Dent Mater.* 2009 Jul;25(7):877-83.
395. Payer M, Lorenzoni M, Jakse N, Kirmeier R, Dohr G, Stopper M, Pertl C. Cell growth on different zirconia and titanium surface textures: a morphologic in vitro study. *J Dent Implant* 2010; (4): 338-341.
396. Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. General review on in vitro hepatocyte models and their applications. *Methods Mol Biol* 2010; 640: 1-40.

397. Iyer P, Walker KJ, Madihally SV. Increased matrix synthesis by fibroblasts with decreased proliferation on synthetic chitosan-gelatin porous structures. *Biotechnol Bioeng* 2012; 109: 1314-1325.
398. Häkkinen L, Larjava H, Fournier BP. Distinct phenotype and therapeutic potential of gingival fibroblasts. *Cytotherapy* 2014; 16(9): 1171-1186.
399. Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res* 1988; 67(1): 66-70.
400. Shi Y, Dong Y, Duan Y, Jiang X, Chen C, Deng L. Substrate stiffness influences TGF- β 1-induced differentiation of bronchial fibroblasts into myofibroblasts in airway remodeling. *Mol Med Rep.* 2013 Feb;7(2):419-24.
401. De Rosa M, Carteni' M, Petillo O, Calarco A, Margarucci S, Rosso F, De Rosa A, Farina E, Grippo P, Peluso G. Cationic polyelectrolyte hydrogel fosters fibroblast spreading, proliferation, and extracellular matrix production: Implications for tissue engineering. *J Cell Physiol.* 2004 Jan;198(1):133-43.
402. Yang Y, Wang K, Gu X, Leong KW. Biophysical Regulation of Cell Behavior—Cross Talk between Substrate Stiffness and Nanotopography. *Engineering* 2017; 3(1):36-54.

Anexos



10. ANEXOS

Anexo 1. Artículo publicado en la revista *International Journal of Molecular Science* con factor de impacto 4.183 según los datos obtenidos del *Journal Citations Reports*[®] (JCR) en el año 2018, según *Clarivate Analytics* en 2018.

Rizo-Gorrita M, Luna-Oliva I, Serrera-Figallo MÁ, Gutiérrez-Pérez JL, Torres-Lagares D. Comparison of Cytomorphometry and Early Cell Response of Human Gingival Fibroblast (HGFs) between Zirconium and New Zirconia-Reinforced Lithium Silicate Ceramics (ZLS). *Int J Mol Sci*. 2018 Sep 11;19(9).



Article

Comparison of Cytomorphometry and Early Cell Response of Human Gingival Fibroblast (HGFs) between Zirconium and New Zirconia-Reinforced Lithium Silicate Ceramics (ZLS)

María Rizo-Gorrita, Irene Luna-Oliva, María-Ángeles Serrera-Figallo, José-Luis Gutiérrez-Pérez and Daniel Torres-Lagares *

Department of Oral Surgery, College of Dentistry, Seville University, Calle de Avicena s/n, 41009 Seville, Spain; marrizgor@alum.us.es (M.R.-G.); irenelunaoliva@gmail.com (I.L.-O.); maserrera@us.es (M.-Á.S.-F.); jlgp@us.es (J.-L.G.-P.)

* Correspondence: danieltl@us.es



Received: 19 August 2018; Accepted: 10 September 2018; Published: 11 September 2018

Abstract: New zirconia-reinforced lithium silicate ceramics (ZLS) could be a viable alternative to zirconium (Y-TZP) in the manufacture of implantological abutments—especially in aesthetic cases—due to its good mechanical, optical, and biocompatibility properties. Although there are several studies on the ZLS mechanical properties, there are no studies regarding proliferation, spreading, or cytomorphometry. We designed the present study which compares the surface, cellular proliferation, and cellular morphology between Y-TZP (Vita YZ[®] T [Vita Zahnfabrik (Postfach, Germany)]) and ZLS (Celtra[®] Duo [Degudent (Hanau-Wolfgang, Germany)]). The surface characterization was performed with energy dispersive spectroscopy (EDS), scanning electron microscopy (SEM), and optical profilometry. Human gingival fibroblasts (HGFs) were subsequently cultured on both materials and early cellular response and cell morphology were compared through nuclear and cytoskeletal measurement parameters using confocal microscopy. The results showed greater proliferation and spreading on the surface of Y-TZP. This could indicate that Y-TZP continues to be a gold standard in terms of transgingival implant material: Nevertheless, more in vitro and in vivo research is necessary to confirm the results obtained in this study.

Keywords: zirconia reinforced-lithium silicate ceramic (ZLS); gingival fibroblast; zirconia; computer-aided design/computer-aided manufacturing (CAD/CAM) materials; early cell proliferation; early cell spreading

1. Introduction

After the implants' osseointegration period, second stage surgery requires remodelling the marginal gingival tissues (mainly keratinocytes and fibroblasts) around transgingival abutments [1]. Correct remodelling is essential for direct cellular contact at the level of the implant-abutment interface, which results in a correct mucosal seal [2], avoids apical migration of the junctional epithelium and bone resorption [3], and reduces bacterial adhesion on the surface [4,5].

Furthermore, the material of the transgingival abutment should be biocompatible and able to mimic native tissues as much as possible, providing the best possible substrate to the cells and thus accelerating

adhesion, proliferation, and early spreading [1,6,7]. The introduction of computer-aided design/computer-aided manufacturing (CAD/CAM) technology has allowed the use of a wide variety of restorative materials with precise marginal adaptation and reduced processing time. The current gold standard in the manufacture of implant devices is titanium. Nevertheless, according to the latest

Int. J. Mol. Sci. **2018**, *19*, 2718; doi:10.3390/ijms19092718

www.mdpi.com/journal/ijms

in vitro studies [7–11], zirconium could be a viable option due to its good mechanical properties, high biological stability, and biocompatibility, as well as lower plaque retention [12,13].

The disadvantage of zirconium is that, due to its white colour and high opacity, it is considered less aesthetic than ceramics [13,14]. The introduction of monolithic zirconium stabilized with yttrium in its translucent (Y-TZP T) and highly translucent versions (Y-TZP HT) for use in CAD/CAM technology has made possible its use as a restorative material without having to be covered by feldspathic ceramics, thus avoiding chipped porcelain and improving its aesthetic properties [15,16].

A systematic review by Linkevicius et al. [17] reported that although there are no statistically significant differences between zirconium and titanium at the bone level, the former is significantly more favourable in terms of the appearance of soft tissues and creates better aesthetics in cases of fine biotype.

Zirconia-reinforced lithium silicate ceramics (ZLS) is a new type of glass ceramic that is considered a valid alternative to lithium disilicate ceramics in cases of high aesthetic demand [18]. ZLS presents a double microstructure composed of very fine crystals of lithium metasilicate and lithium disilicate and a vitreous matrix containing highly dispersed zirconium oxide [14,19,20]. It combines the superior mechanical properties of zirconium—through the transformation from tetragonal to monoclinic phase—with the excellent optical properties of glass ceramics [15,21].

Celtra[®] Duo (one type of this ceramic) was developed through the manufacturer Degudent (Hanau-Wolfgang, Germany) [22,23]. It is characterized by the inclusion of 10% zirconia in the glass phase, which increases its strength; by the increase of flexural strength from 300.1 MPa after milling to 451.4 MPa after sintered, and an elastic modulus of 70 MPa. Furthermore, it has good optical properties due to a wide range of shades. On the other hand, zirconium is the more studied ceramic. It presents an elastic modulus of 210 MPa and its major advantage is its excellent mechanical strength (800–1200 MPa) [24–27].

To authors' knowledge, Celtra Duo has not been compared to Y-TZP in terms of cytotoxicity. Only two studies compared zirconium and Vita Suprinity, presenting both materials adequate values [4,28].

Conversely, there are no studies on early cell proliferation, adhesion, or spreading. We designed the present study which compares the surface, cellular proliferation, and cellular morphology between Y-TZP (Vita YZ[®] T [Vita Zahnfabrik (Postfach, Germany)]) and ZLS (Celtra[®] Duo [Degudent (Hanau-Wolfgang, Germany)]) based on nuclear and cytoskeletal measurement parameters in human gingival fibroblasts (HGFs).

The null hypothesis is that there is no difference at the level of proliferation, spreading, or cell morphology between the two materials.

2. Results

2.1. Surface Characterization

2.1.1. Surface Composition Analysis

The results from the EDS analysis (Figures 1 and 2) showed high peaks of silicon, oxygen, and potassium in the case of ZLS, and zirconium and yttrium for the case of Y-TZP. Potassium, oxygen, and aluminium were detected in both, while in the case of ZLS, lithium was not detected due to its low molecular weight. Table 1 shows the percentage of mass content of the chemical compounds detected in each material. Both presented alumina in a reduced percentage. The proportions were similar with those provided by

the manufacturer; except in the case of ZLS where the zirconium content was higher than the published value (10%).

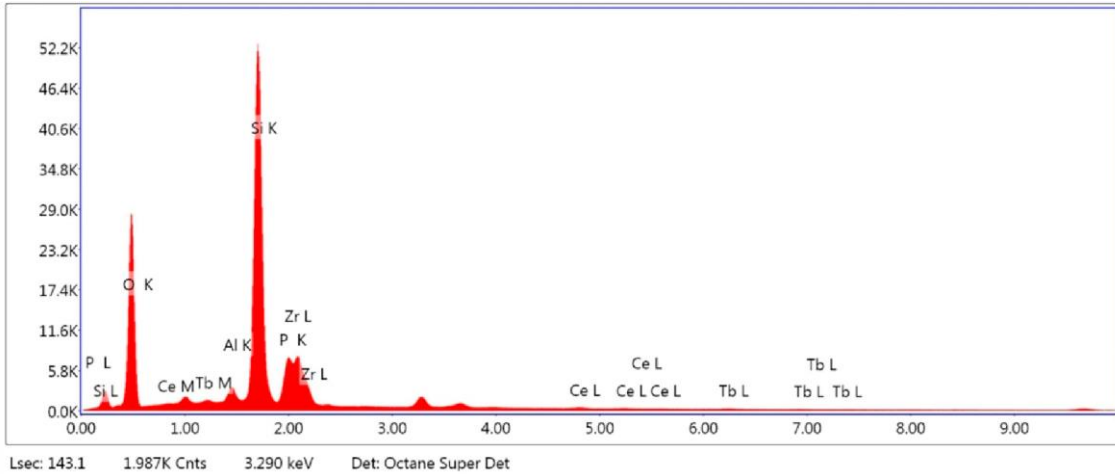


Figure 1. Energy dispersive spectroscopy analysis of Celtra Duo (ZLS).

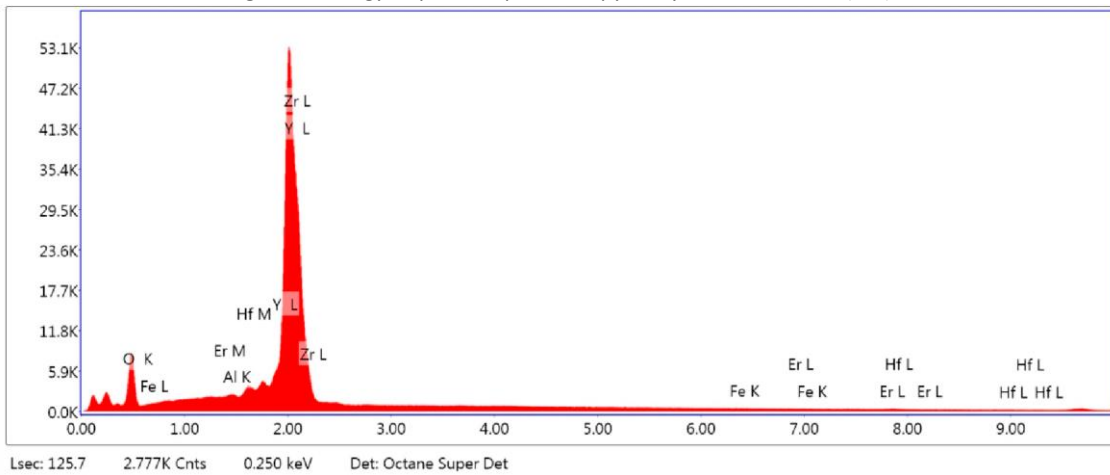


Figure 2. Energy dispersive spectroscopy analysis of zirconium (Y-TZP).

Table 1. Mass content (%) of Celtra Duo (ZLS) and zirconium (Y-TZP) by energy dispersive spectroscopy (EDS) analysis.

Material	CELTRA DUO (ZLS) [wt %]	Material	Y-TZP [wt %]
Al ₂ O ₃	2.85	Al ₂ O ₃	0.08
SiO ₂	71.01	ZrO ₂	88.66
P ₂ O ₅	7.44	Y ₂ O ₃	10.41
ZrO ₂	16.72	Fe ₂ O ₃	0.16
Ce ₂ O ₃	1.10	Er ₂ O ₃	0.26
Tb ₂ O ₃	0.89	Hf ₂ O ₃	0.43

2.1.2. Profilometry

The measurement areas on the samples and the images obtained from the three-dimensional roughness profile for ZLS and Y-TZP can be seen in Figure 3. A high mean roughness after 5 measurements could be seen in the ZLS sample (S_a (μm) of 2.84 ± 1.14), while Y-TZP surface was shown to be more homogeneous (S_a (μm) of 0.80 ± 0.08).

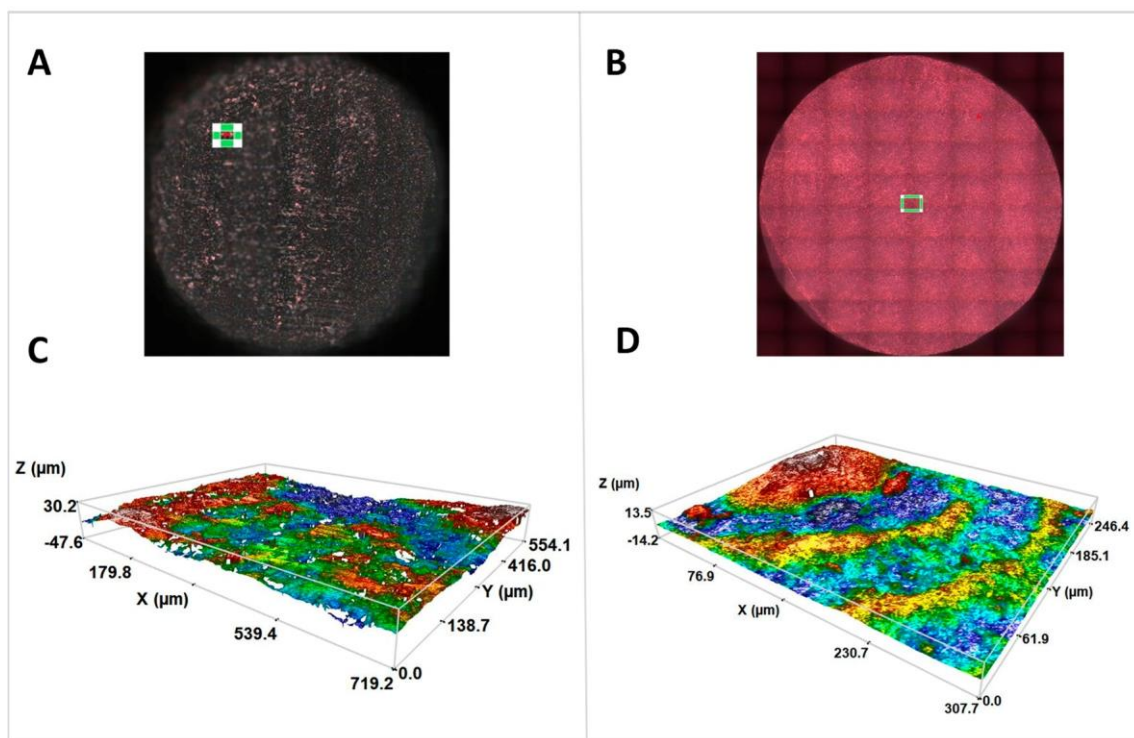


Figure 3. Measurement areas of ZLS (A) and Y-TZP (B) and profilometry of the samples, objective 20×. (C) ZLS; (D) Y-TZP.

2.1.3. Surface Topography

SEM images of the samples can be seen in Figure 4. ZLS surface revealed a porous, non-homogeneous, irregular structure with crater-like areas and random distribution, while Y-TZP showed concentric and parallel grooves pattern, resulting from the disc manufacturing process. Both surfaces revealed porosities and typical surface defects from the milling and sintering processes.

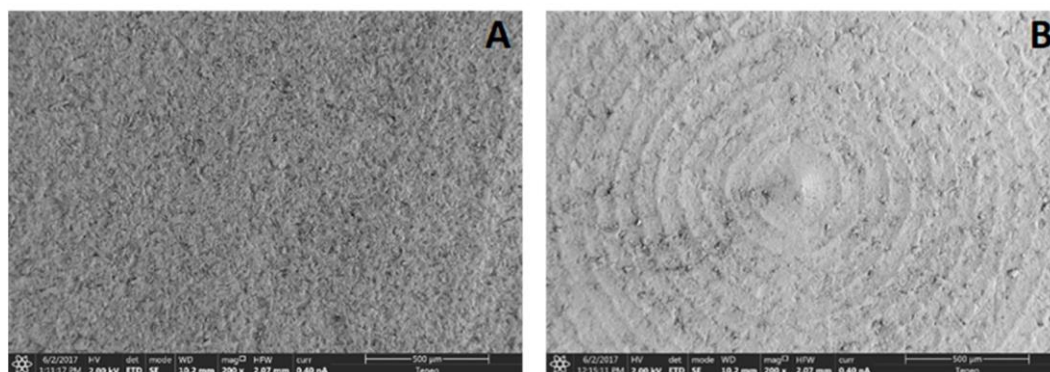


Figure 4. Scanning electron microscopy (SEM) images at 200× magnification of ZLS (A) and Y-TZP (B).

2.2. Cellular Study

2.2.1. Cell Proliferation

To assess the surface topography's effect on the cells, the mean number of cells observed in each image at 20× magnification was quantified. An average of 34.55 ± 17.52 and 68.90 ± 49.02 cells were observed in the case of ZLS and Y-TZP, respectively. According to the U Mann Whitney test, this difference was statistically significant ($p = 0.039$, $r = -0.371$) (Figure 5A).

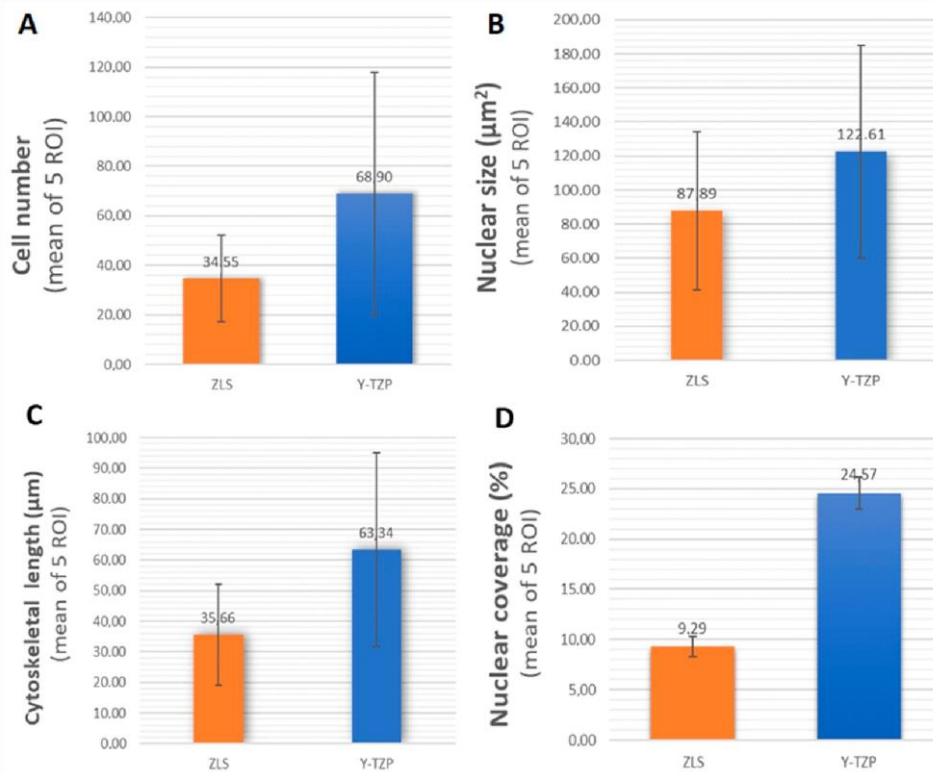


Figure 5. Graphic representations of number of cells (A), average size (B), length of the cytoskeleton (C), and occupied area (D).

2.2.2. Cytomorphometry

The mean nuclear size observed for ZLS was $87.89 \pm 46.61 \mu\text{m}^2$, while for Y-TZP was $122.61 \pm 62.42 \mu\text{m}^2$. According to the U Mann Whitney test, this difference was not statistically significant ($p = 0.117$) (Figure 5B).

Mean length of the main cell axis was $35.66 \pm 16.44 \mu\text{m}$ for ZLS and $63.34 \pm 31.64 \mu\text{m}$ for cells cultured on Y-TZP. According to the U Mann Whitney test, this difference was statistically significant ($p = 0.000$, $r = -0.468$) (Figure 5C).

The mean circularity value of the nuclei was 0.58 ± 0.09 for ZLS and 0.60 ± 0.07 for Y-TZP. According to the *t*-student test, this difference was not statistically significant ($t_{29} = -0.637$, $p = 0.529$).

2.2.3. Nuclear Coverage

Regarding the area occupied by cell nuclei, the percentage observed in ZLS was $9.29 \pm 1.03\%$, while in the case of Y-TZP it was $24.57 \pm 1.61\%$. According to the U Mann Whitney test, this difference was statistically significant ($p = 0.002$, $r = -0.548$) (Figure 5D).

HGFs grown on the surface of ZLS and Y-TZP presented nuclei of similar size and circularity. However, in Y-TZP the number of observed cell and the length of the cytoskeleton and nuclear coverage percentage were higher than those in ZLS.

2.2.4. Morphology and Cellular Attachment

Figure 6 shows the confocal microscopy images of fibroblasts obtained for the observation of cell morphology at magnification $40\times$ and $63\times$. Double staining was used for the visualization of the nuclei with DAPI (4⁰,6-diamidino-2-phenylindole, blue) and the actin filaments of the cytoskeleton with phalloidin (green).

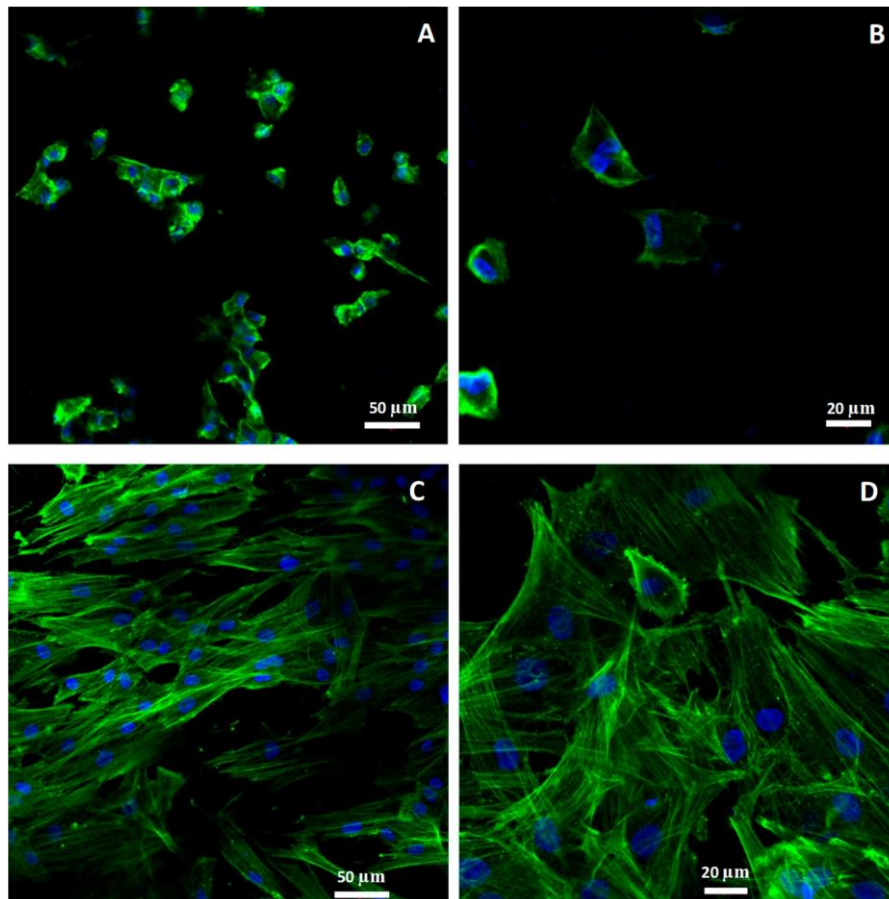


Figure 6. Confocal microscope images of fibroblasts on ZLS at magnification 20× (A) and 40× (B), and Y-TZP 20× (C) and 40× (D).

In ZLS images, cellular aggregates with weak spreading were observed (Figure 6A). The cell morphology was rounded or quadrangular, with a poor organization of cytoskeletal actin filaments in most cells (Figure 6B), which could be due to a weak initial cell attachment to the disc surface.

In the Y-TZP images, cells with spindle-like morphology are observed in greater numbers, well spread, and uniformly distributed, with a more organized cytoskeleton showing bundles of actin filaments and stress fibers (Figure 6D). These images could be interpreted as a more favourable surface to initial cellular attachment than in ZLS.

These findings are in line with the statistically significant differences found in the number of cells, nuclear coverage, and cell length.

3. Discussion

The aim of our study was to evaluate the early cellular response, characterized by proliferation, spreading, covering, and cell morphology of HGFs cultured on Y-TZP and ZLS surfaces.

The results rejected the null hypothesis of equal influence on cellular behaviour. Statistically significant differences were observed in terms of higher mean cell count, cell length, and nuclear coverage on the Y-TZP surface. No significant differences were observed at mean nuclear size, nor at circularity level between both groups.

In this study, statistical differences were evaluated not only based on the p value but estimating how they differed, based on effect size tests of the significant variables (Cohen's d and Normal Approximation z to r) [29,30]. These tests results showed a moderate effect for both cell proliferation and cell length ($r = -0.371$ and -0.468 , respectively) and large effect on nuclear coverage ($r = -0.548$). The cellular morphological analysis was in line with the aforementioned results. According to confocal images, a

higher cell count and wider extension of the actin filaments over the Y-TZP surface could be interpreted as a greater cellular affinity after 24 h, the interval at which the images were taken.

The cellular response to the surface of a material depends on multiple variables, including topography, chemical composition of the surface, and phenotype of the cultured cell line [1,7,10].

HGFs are the major cell type in the gingival connective tissue and play a fundamental role in the sealing of soft tissues around the transgingival area of implant abutments [31]. Keratinocytes are another cell line usually studied, given their relevance in the insertion of the junctional epithelium. Several comparative studies of keratinocytes and fibroblasts behaviour seeded on different surfaces have been conducted. In one of them, the keratinocytes viability and migration capacity was negatively influenced on zirconium surfaces of varying composition, while in the case of fibroblasts, they were not affected [1]. Grenade et al. obtained better results in terms of viability, number, and cell coverage when seeding fibroblasts and keratinocytes on titanium and zirconium surfaces compared to lithium disilicate ceramics [32,33]. However, Northdurft et al. cultured epithelial cells and fibroblasts, obtaining different cellular response between both cell lines by growing them on titanium and zirconium surfaces with different surface treatments. Both types of cells had greater proliferation on rough surfaces—a significant finding, since up until that moment a greater proliferation of epithelial cells had been reported on smooth surfaces [7,34]. In our study, human fibroblasts from an immortal cell line were used. It offers greater reproducibility of results than a primary culture, in which cell behaviour can significantly vary from one patient to another [9].

The mean observed cell count had large standard deviations, as in studies where primary cultures were used [32]. In our case, it could be due to the use of cells from increasing passages and not always from the same passage number for each experiment repetition, which could lead to a lower cellular proliferation, as demonstrated by Kent et al. in their study of gingival fibroblasts [35].

The significant difference in three of the five variables (cell count, cell length, and nuclear coverage) could be attributed to the different composition, topography and roughness of both surfaces, as these factors can influence the cell growth and spread, especially in the early stages of proliferation [11].

Material composition is a very influential factor in cell adhesion, with zirconium and titanium observed as having better maintenance of the mucoepithelial barrier than ceramics [36].

In addition to Celtra® Duo [Degudent (Hanau-Wolfgang, Germany)], Vita Suprinity® Vita [Zahnfabrik (Postfach, Germany)] is commercially available. Both are ZLS, but have slight chemical differences: Suprinity® presents potassium oxide (K_2O : 1–4% wt.) while Celtra® Duo presents terbium oxide (Tb_2O_3 : 1% wt.), which could influence the cellular response, as reported in the case of zirconium [1]. The advantage of Celtra® Duo (used in this study) is that it can be milled in the final crystallized state, offering the possibility to avoid a second sintering, unless better mechanical properties are preferred [14,19,20,24].

Our results showed mass content (wt %) of zirconium oxide (16.72%) in EDS analysis of ZLS, higher than that announced by the manufacturer (10%) [23]. The peak of lithium oxide, one of the main compounds of this material, was not detected, possibly due to the low molecular weight of lithium [24,25].

As discussed above, factors such as topography or roughness can influence cell morphology, its function, or organization [37]. After sintering process, zirconium presents a less homogeneous surface and a roughness increase due to sintering-induced grain coarsening and residual stresses. In addition, it undergoes a volumetric contraction due to grain growth and material transformation from tetragonal to monoclinic phase [4,26,38].

Our results show that both samples presented an irregular surface, with porosities and surface defects observed in SEM images. However, the Y-TZP surface revealed a concentric and parallel grooves pattern that could have facilitated or guided the attachment and proliferation of the fibroblasts on this surface. Deep grooves and their periodicity influence cell behaviour [39]. Pae et al. [5] cultured fibroblasts in titanium with a smooth surface and zirconium with microgrooves. After twenty-four hours, increased cell proliferation was observed on the surface with micro-roughness. Fibroblasts presented a flattened morphology, widely spread, and oriented following the direction of the microgrooves. Cells cultured on smooth surfaces showed less proliferation and random direction spreading. From these findings, they

propose creating microgrooves in the transmucosal implant abutments in order to improve anchorage, allowing for a greater biological seal, an inhibition of epithelial downgrowth, and lower bacterial adhesion. However, some authors disagree. Pabst et al. suggested that smooth surfaces increased cell adhesion and viability and decreased bacterial adhesion [1,4].

In our study, we can see the formation of fibroblast bundles on Y-TZP surface, but not having evaluated the cell culture in a scanning electronic microscope, it is not possible to affirm if these bundles followed the direction of the concentric grooves that characterize the surface of this material.

On surfaces with heterogeneous topography, fibroblasts need more time for initial mechanical stabilization compared to those that grow on more homogeneous surfaces [3,39–41]. Cells grown on a rough surface stabilize themselves on topographic irregularities, not needing to develop a strong cytoskeleton. Fibroblasts grown on smoother surfaces in order to mechanically stabilize develop a strong network of actin fibers, appearing more elongated and spread [40,42,43]. This explains why the fibroblasts grown on Y-TZP showed a greater extension of the actin filaments and an elongated shape.

Nothdurft et al. demonstrated that cell area was lower in rougher surfaces. From this finding, it can be deduced that the irregularities of the substrate could have represented a barrier to the extension of the actin filaments of the cytoskeleton on the surface [7,44], as seen on our results.

There is no consensus about which is the best surface to create a good mucosal seal and reduce bacterial adhesion. Some authors have reported the importance of this surface being smooth [8,11,39,42], while other authors have shown that rough surfaces are preferred, either through some surface treatment like sandblasting—with random cell growth—[7,45], or the creation of micro-roughness [5] to enhance attachment, proliferation, and spreading in the direction of the microgrooves.

One factor to be considered is that surfaces with greater roughness have a more hydrophobic behaviour, allowing greater bacterial adhesion on their surface [4].

Fischer et al. and Kournetas et al. postulate that it is necessary to rethink the way in which roughness parameters are applied to in vitro studies. The arithmetic roughness value Ra is a limited factor in complex topographies and is a parameter that depends on experimental conditions and the surface treatment technique employed [42,46].

Caution is advised when comparing our results regarding cellular response based on the value of roughness with other published studies, as in our case the profilometric study was carried out according to ISO 25178, which was not used by other studies.

The stiffness of the substrate can influence cell behaviour more than chemical composition or surface hydrophilicity [40,43,47]. The ability to perceive and respond to the stiffness of the substrate has been observed in fibroblasts, which prefer rigid surfaces, a phenomenon known as durotaxis [48,49]. They have the ability to adapt to the substrate by reorganizing the structure of the actin stress filaments of the cytoskeleton, thus adjusting their intracellular stiffness [50]. In studies of fibroblasts cultured on surfaces of increasing stiffness, it was observed that the greater the increase in the modulus of elasticity of the substrate, the greater the proliferation, area, length, and cell density, allowing a better cell to cell contact, which stimulates the elongation and development of the stress fibers of the cytoskeleton, resulting in a spindle-like phenotype [47–49,51–53].

The results of our study are consistent with the aforementioned studies. Y-TZP had a modulus of elasticity (210 GPa) [54] more than ZLS (70 GPa) [55,56], which is reflected in the greater proliferation, cell length, and nuclear coverage on Y-TZP surface.

To the authors' knowledge, there is no comparative studies of cell proliferation, spreading, and morphology of cell cultures on Y-TZP and ZLS surfaces, the present work being the first study in this matter. However, two studies about cellular viability and cytotoxicity have been performed in which Suprinity® is compared with Y-TZP. In one, cell viability rate was not statistically significant at 24 h when comparing Suprinity® with zirconium. However, the initial apoptosis rate was significantly higher in the zirconium [28]. In the other study, cell viability was studied at 24 h in two surface treatments. A higher cell viability was observed in zirconium for both polished and glazed surfaces [4].

Conversely, early cellular response in zirconium has been compared with multiple restoration materials, such as feldspathic ceramics [9,10] or titanium [7,8]. In vitro, zirconium is considered the alternative to titanium in terms of better maintenance of soft tissue stability, since it provides better biocompatibility and aesthetics [1,9,31].

Raffaelli et al. made a comparative study of zirconium and feldspathic ceramics, finding higher cell growth rate in the zirconium at the first 24 h [9].

As cell shape is a good indicator of the physical effects of a substrate on cellular behaviour regarding proliferation, adhesion, or spreading [57], we conducted a cytomorphometric study based on nucleus and cytoskeleton measurement parameters.

It has been observed that cell spreading and nuclear geometry are closely related [58,59]. In our study, no statistically significant differences were observed in the size or nuclear circularity between ZLS and Y-TZP.

Another indicator of cellular response is the cytoskeleton shape, which is a regulatory structure of the signals perceived from the environment and coordinates cell size, shape, and function [60]. After initial cell attachment to a surface, spreading, proliferation, and cell migration take place [61].

The average cell length observed in our study for Y-TZP surface ($63.34 \pm 31.64 \mu\text{m}$) is in line with that published by other authors for an extended fibroblast [48]. However, in the case of ZLS ($35.66 \pm 16.44 \mu\text{m}$), the average length was approximately half of that of Y-TZP. These results are in line with those of the cytomorphometric analysis, since on Y-TZP surface, extended cells with spindle-like phenotype were observed with a more organized cytoskeleton in actin filaments bundles and stress fibers. Cells cultured on ZLS showed cellular aggregates, a rounded phenotype with a more cortical cytoskeleton and weaker extension of the actin filaments. From these results, ZLS can be inferred as a less favourable surface for early attachment and proliferation.

Our results showed greater nuclear coverage on Y-TZP. Cellular coverage percentage is a variable that can be calculated from the value of the area occupied by the nuclei multiplied by the value of the nucleocytoplasmic ratio (N:C), which in the case of the fibroblast is 0.306 [62]. This ratio is generally used in cell biology to measure cell size [63].

The resulting formula would be the following: $\% \text{ nuclear area} = \frac{\text{nuclear area}}{\text{cell total area}} \times \frac{1}{\text{N:C}}$. Therefore, cellular coverage area in ZLS is $0.306 \times \frac{9.29}{24.57} = 30.35\%$, and in the case of Y-TZP it is $0.306 \times \frac{24.57}{30.35} = 80.29\%$.

Several studies have shown that cell morphology is associated with spreading, adhesion, and cell division. Flattened and more spread out cells have a higher division rate and more favourable adhesion than circular ones with scarce spreading. This reasoning is in line with the results obtained in our study. Cells cultured on Y-TZP resulted in more coverage of the disc surface [5,64,65].

As mentioned above, there are several factors that influence initial cellular adhesion to a surface, such as chemical composition, mechanical properties (such as wettability or stiffness), or the cytotoxicity of the material. Therefore, this is a multiparametric and complex analysis, in which each parameter should be studied independently under an ISO standard, so that in vitro studies could be reproducible with objectively comparable results [32,42,46]. Some examples are ISO 10993:2009 (Part 5 based on vitro cytotoxicity tests, Part 12 based on sample preparation, and Part 19 based on physico-chemical, morphological, and topographical characterization of materials).

4. Materials and Methods

4.1. Sample Preparation

Two CAD/CAM materials were studied for all-ceramic restorations: VITA YZ[®] T [Vita Zahnfabrik (Postfach, Germany)] and Celtra[®] Duo [Degudent (Hanau-Wolfgang, Germany)]. Its composition, manufacturer's data, and reference are shown in Table 2.

From Y-TZP discs and ZLS blocks used for CAD/CAM ceramic restorations, disc-shaped samples (size 10 mm × 2 mm) were milled. The Y-TZP samples were sintered according to the manufacturer's

recommendations. ZLS commercial blocks are fully crystallized, being only necessary to mill the block in a disc form.

Discs were then cleaned by immersion with absolute ethanol and sterilized with UV exposure for 30 min on each side inside laminar flow workstation. Finally, discs were placed on its base in a sterile Petri dish before performing the experiment.

Name	Material Type	Manufacturer	Ref./Lot Number
VITA YZ® (Y-TZP)	Zirconium dioxide partially yttrium oxide	VITA Zahnfabrik, Bad Säckinger, Germany	YZ T ^{white} /63320
Celtra® Duo (ZLS)	Lithium silicate vitreous ceramic with zirconium	Degudent GmbH, reinforced Hanau-Wolfgang, Germany	HT-A1/18027341

Table 2. Summary of the characteristics of the studied materials.

4.2. Surface Characterization

Prior to the experiments, composition, roughness profile, and surface morphology of each of the discs were analysed.

4.2.1. Surface Composition Analysis

Surface composition analysis was performed by energy dispersive spectroscopy analysis (EDS) using a scanning electron microscope (FE-SEM) FEI TENE0 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) with field emission gun Schottky type and EDAX METEK SDD detector. EDAX TEAM software version 4.4.1 was used for image processing. An area of 130 μm was analysed for 200 s. The results of the microanalysis are expressed as a percentage of mass content (wt %).

4.2.2. Profilometry

The roughness study was performed using the confocal-interferometric microscope Sensofar S NEOX (Sensofar Medical, Terrassa, Spain). The software used was SensoMAP Premium 7.4.

The measurements were made in accordance with ISO 25178: Geometric Product Specifications (GPS)—Surface texture: Areal. A 20 \times epi-illumination lens was used at a focal length of 4.50 mm and a green optical resolution of 0.32 μm . Five measurements were made randomly and in different locations for each material, with a pre-established dimension of 0.87 \times 0.66 mm² and a cut-off correction of 250 μm . The quantitative roughness parameter used was the arithmetic mean and the standard deviation of the 3D roughness (S_a).

4.2.3. Scanning Electron Microscopy

The FE-SEM analysis of the surface morphology was performed with the FEI TENE0 scanning electron microscope (SEM) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) at 200 \times magnification.

4.3. Cell Culture

Human gingival fibroblasts (HGF, Lonza, Basel, Switzerland) were cultured in T75 flasks in an incubator (5% CO₂, 95% air at 37 °C). The culture medium prepared was Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Biowest, Nuaille, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Biowest) and 1% glutamine-penicillin-streptomycin (Biowest, Nuaille, France) for each 500 mL of culture medium.

The medium was changed every 48 h and the cells were subcultured regularly upon reaching 80% confluence using Dulbecco's phosphate-buffered saline without calcium and magnesium (DPBS, Lonza, Basel, Switzerland) and 0.25% trypsin heated at 37 ° (Biowest, Nuaille, France).

For control and cell counting while culturing in T75 flasks, an inverted phase contrast microscope

Olympus CKX41SF2 (Olympus, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan) was employed. The initial adhesion, growth, and cellular spread between the passages were verified. Cells were seeded on the discs from the 3rd passage and never reached 10th passage, as indicated by the manufacturer.

Samples of both materials were glued on its base to a sterile Petri dish. HGFs were grown on the discs at a previously calculated concentration of 1×10^3 cells in 40 μ L of culture medium per disc. After several hours, the initial cellular adhesion was checked on the disc surface with an Olympus CKX41SF2 inverted phase contrast microscope (Olympus, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan). Subsequently, the Petri dish was filled with culture medium up to the level of the discs' surface using a pipette. Cells were then incubated for 24 h before immunocytochemical staining.

4.3.1. Immunocytochemical Staining

After 24 h of cell culture in the discs, the medium was removed with a pipette. After washing with 500 μ L DPBS twice, it was fixed with 4% paraformaldehyde in DPBS (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) for 10 min, then washed with DPBS before permeabilizing with 0.1% Triton X-100 (Sigma, Saint Louis, MO, USA) at 4 °C for 5 min. Samples were washed again, and the blocking phase of nonspecific background staining was performed by applying 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 20 min. After removal of BSA excess with a pipette, immunohistochemical staining was performed with 15 μ L of Acti-stain 488 Fluorescent Phalloidin (Cytoskeleton, Inc., Denver, CO, USA) per disc. This staining is a mycotoxin that has high affinity for F-actin, present in the filaments of the cellular cytoskeleton. For DNA staining of the cell nuclei, 15 μ L of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was also used, which is incorporated in the Vectashield mounting medium (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Phalloidine stain was applied and left for 30 min in the dark before washing again with DPBS and applying the DAPI with the Vectashield mounting medium and the coverslip. The samples were kept at 4 °C and observed under the confocal microscope after 24 h.

4.3.2. Confocal Microscopy

The samples were observed with a Zeiss LSM 7 DUO confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) with an Excite 120PC epifluorescence unit. Images were obtained using the FITC at 488 nm laser and fluorescence emission was collected through 535 nm band pass filter for the cytoskeleton visualization; for the visualization of the nuclei, the excitation filter DAPI at 355 nm was used and collected the emission through 458 nm band pass filter, all in accordance with the parameters recommended by the manufacturer. Image analysis software "ZenLite" 2012 was used (Carl Zeiss, Jena, Germany), along with three Plan-Apochromat objectives of 20 \times /0.8, 40 \times /1.30 Oil DIC and 63 \times /1.40 Oil DIC. Images were taken in 5 regions of interest (ROI) per disc (northwest, northeast, centre, southwest and southeast). No sample was exposed to the laser for more than 5 min in order to avoid photobleaching.

4.3.3. Image Processing: Image J

Images of 2048 \times 2048 pixels were obtained at 8-bit, which were saved in tiff format for later analysis with the ImageJ v1.50e program (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). With the 20 \times objective images, the number of cells and the disc coverage were analysed; with the 40 \times and 63 \times , cell morphology was analysed and cell size measurements were made.

Each image was calibrated to μ m before processing. For cell count, the RGB channels (red, green, and blue) were separated from the original image at 20 \times . With the "blue" image, an automatic threshold was established which identified the cell nuclei from the creation of a binary image (*Image* \rightarrow *Adjust* \rightarrow *Threshold* \rightarrow *Auto*). The *Process* \rightarrow *Binary* \rightarrow *Watershed* command was applied to automatically separating or cutting apart nuclei that touched each other. Finally, the *Analyze* \rightarrow *Analyze Particles* command was applied, in which the minimum size of a nucleus to be detected was set at 5 μ m².

In the case of cell length measurement, after image calibration at μm , a linear selection of the main axis of the cytoskeleton of 3 cells chosen randomly in each 40 \times -oil photo was made. The variable length is represented as the length in μm .

4.3.4. Cellular Parameters Analyzed

The variables analysed were the number of cells (proliferation), the average size of the nucleus (*nuclear size*), its circularity (*circularity*), the percentage of area occupied by the nuclei with respect to the total image (*% nuclear coverage*), and average length of the main axis of the cytoskeleton (*cell length*).

The circularity value of the nucleus oscillates between 0 and 1 [66]. Values closer to 0 are interpreted as elongated forms; on the other hand, the value of 1 is interpreted as a perfect circle. It is

(Perimeter)² based on the following formula: $\frac{4\pi Area}{(Perimeter)^2}$, perimeter = $2\pi r$.

The cellular parameters analysed—which can be observed within the Results section—are classified as cell proliferation, cytomorphometry, and nuclear coverage. Cell morphology and attachment are based on the visualization of the SEM images. All parameters are expressed in values of mean \pm standard deviation for the images observed in each of the variables.

4.4. Statistic Analysis

The comparison of the two groups for each of the analysed variables was made using IBM SPSS Statistics 24.0 software (International Business Machines Corp, New York, NY, USA). The Kolmogorov-Smirnov test was performed to verify the existence of normality. For those variables with normal distribution, the Levene test was employed to check the variance homogeneity prior to the application of t-student. For the variables in which normality was not verified, the U Mann Whitney test was applied. A level of statistical significance of 5% was established ($p < 0.05$). In the cases of variables with a normal distribution in which statistically significant differences were identified, the magnitude of the effect was calculated through Cohen's d. Scale interpretation for the values of Cohen's d is based on standard deviation units: 0.2 (small effect), 0.5 (moderate effect), and 0.80 (large effect) [29]. Normal Approximation z to r (based on the formula $r = \sqrt{\frac{z^2}{N}}$, where N is total number of n scores) was used for those variables with non-normal distribution. Scale interpretation was valued on Cohen's criteria of 0.1 (small effect), 0.3 (moderate effect), and 0.5 (large effect) [30].

5. Conclusions

The results of this study suggest that HGFs cultured on Y-TZP have a greater cell proliferation, coverage, and spreading than those cultured on ZLS, which translates in a greater affinity for the surface of Y-TZP. Several factors influence the initial cellular adhesion to a surface, and although not all have been analysed in the present study, the better cellular response in Y-TZP could be attributed to a more homogeneous and less rough surface topography. Hence Y-TZP can still be considered a *gold standard* even when compared against new ceramic materials such as ZLS.

In order to establish comparable results, future studies should be reproducible under ISO standards. In future studies, rugosity parameters should be homogenised as it can be a confounding variable during the period of early cellular response.

Due to the limitations of this study, more in vitro and in vivo studies are necessary to verify the obtained results.

Author Contributions: M.R.-G., I.L.-O. and D.T.-L. conceived, designed and performed the experiments. M.R.-G., I.L.-O. and D.T.-L. analysed the data. J.-L.G.-P. and D.T.-L. supervised the work. M.-Á.S.-F. and M.R.-G. wrote the manuscript with input from all authors.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: Authors gratefully thank Modesto Carballo Álvarez from the Center of Investigation, Technology and Innovation from Seville University (CITIUS) for experimental assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

CAD/CAM	Computer Aided Design/Computer Aided Manufacturing
Y-TZP	Yttria-stabilized Tetragonal Zirconia Polycrystal
HGFs	Human Gingival Fibroblasts
ZLS	Zirconia Lithium Silicate
EDS	Energy Dispersive Spectroscopy
SEM	Scanning Electron Microscopy

References

- Pabst, A.M.; Walter, C.; Bell, A.; Weyhrauch, M.; Schmidtman, I.; Scheller, H.; Lehmann, K.M. Influence of CAD/CAM zirconia for implant-abutment manufacturing on gingival fibroblasts and oral keratinocytes. *Clin. Oral Investig.* **2016**, *20*, 1101–1108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Furuhashi, A.; Ayukawa, Y.; Atsuta, I.; Okawachi, H.; Koyano, K. The difference of fibroblast behavior on titanium substrata with different surface characteristics. *Odontology* **2012**, *100*, 199–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rompen, E.; Domken, O.; Degidi, M.; Pontes, A.E.; Piattelli, A. The effect of material characteristics, of surface topography and of implant components and connections on soft tissue integration: A literature review. *Clin. Oral Implant. Res.* **2006**, *17*, 55–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dal Piva, A.; Contreras, L.; Ribeiro, F.C.; Anami, L.C.; Camargo, S.; Jorge, A.; Bottino, M.A. Monolithic Ceramics: Effect of Finishing Techniques on Surface Properties, Bacterial Adhesion and Cell Viability. *Oper. Dent.* **2018**, *43*, 315–325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pae, A.; Lee, H.; Kim, H.S.; Kwon, Y.D.; Woo, Y.H. Attachment and growth behaviour of human gingival fibroblasts on titanium and zirconia ceramic surfaces. *Biomed. Mater.* **2009**, *4*, 025005. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Miyazaki, T.; Nakamura, T.; Matsumura, H.; Ban, S.; Kobayashi, T. Current status of zirconia restoration. *J. Prosthodont. Res.* **2013**, *57*, 236–261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Nothdurft, F.P.; Fontana, D.; Ruppenthal, S.; May, A.; Aktas, C.; 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.* **2015**, *17*, 1237–1249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cho, Y.D.; Shin, J.C.; Yoon, H.I.; Ku, Y.; Ryoo, H.M.; Kim, D.J.; Kim, D.G.; Han, J.S. Characterization of human gingival fibroblasts on zirconia surfaces containing niobium oxide. *Materials* **2015**, *8*, 6018–6028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Raffaelli, L.; Rossi Iommetti, P.; Palomas, E.; Toesca, A.; Serini, S.; Resci, F.; Missori, M.; De Spirito, M.; Manicone, P.F.; Calviello, G. Crecimiento, viabilidad, adhesión potencial y la expresión de fibronectina en fibroblastos cultivados con zirconia o cerámica feldespática in vitro. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2008**, *86*, 959–968. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zizzari, V.; Borelli, B.; De Colli, M.; Tumedei, M.; Di Iorio, D.; Zara, S.; Sorrentino, R.; Cataldi, A.; Gherlone, E.F.; Zarone, F.; et al. Evaluación SEM de la gingival humana crecimiento de fibroblastos en CAD/CAM zirconia y recubrimiento de cerámica para zirconia. *Ann. Stomatol.* **2014**, *4*, 244–249.
- Yamano, S.; Ma, A.K.; Shanti, R.M.; Kim, S.W.; Wada, K.; Sukotjo, C. The influence of different implant materials on human gingival fibroblast morphology, proliferation, and gene expression. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **2011**, *26*, 1247–1255. [[PubMed](#)]
- Gautam, C.; Joyner, J.; Gautam, A.; Rao, J.; Vajtai, R. Zirconia based dental ceramics: Structure, mechanical properties, biocompatibility and applications. *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 19194–19215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- El-Ghany, O.S.A.; Sherief, A.H. Zirconia based ceramics, some clinical and biological aspects: Review. *Futur. Dent. J.* **2016**, *2*, 55–64. [[CrossRef](#)]
- Hallmann, L.; Ulmer, P.; Kern, M. Effect of microstructure on the mechanical properties of lithium disilicate glass-ceramics. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2018**, *82*, 355–370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Gracis, S.; Thompson, V.P.; Ferencz, J.L.; Silva, N.R.; Bonfante, E.A. A new classification system for all-ceramic and ceramic-like restorative materials. *Int. J. Prosthodont.* **2015**, *28*, 227–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Kimmich, M.; Stappert, C.F.J. Intraoral treatment of veneering porcelain chipping of fixed dental restorations: A review and clinical application. *J. Am. Dent. Assoc.* **2013**, *144*, 31–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Linkevicius, T.; Vaitelis, J. The effect of zirconia or titanium as abutment material on soft peri-implant tissues: A systematic review and meta-analysis. *Clin. Oral Implants Res.* **2015**, *26*, 139–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Silva, L.H.D.; Lima, E.; Miranda, R.B.P.; Favero, S.S.; Lohbauer, U.; Cesar, P.F. Dental ceramics: A review of new materials and processing methods. *Braz. Oral Res.* **2017**, *31*, e58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Traini, T.; Sinjari, B.; Pascetta, R.; Serafini, N.; Perfetti, G.; Trisi, P.; Caputi, S. The zirconia-reinforced lithium silicate ceramic: Lights and shadows of a new material. *Dent. Mater. J.* **2016**, *35*, 748–755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Elsaka, S.E.; Elnaghy, A.M. Mechanical properties of zirconia reinforced lithium silicate glass-ceramic. *Dent. Mater.* **2016**, *32*, 908–914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Sieper, K.; Wille, S.; Kern, M. Fracture strength of lithium disilicate crowns compared to polymer-infiltrated ceramic-network and zirconia reinforced lithium silicate crowns. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2017**, *74*, 342–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Vita Suprinity®. *Technical and Scientific Documentation*; Vita Zahnfabrik: BadSäckingen, Germany, 2014.
23. Celtra® Duo Zirconia-Reinforced Lithium Silicate (ZLS) Block. *Technical Monograph*; Dentsply Sirona: Hanau-Wolfgang, Germany, 2016.
24. Riquieri, H.; Monteiro, J.B.; Viegas, D.C.; Campos, T.M.B.; de Melo, R.M.; de Siqueira Ferreira Anzaloni Saavedra, G. Impact of crystallization firing process on the microstructure and flexural strength of zirconia-reinforced lithium silicate glass-ceramics. *Dent. Mater.* **2018**, *23*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Ramos Nde, C.; Campos, T.M.; Paz, I.S.; Machado, J.P.; Bottino, M.A.; Cesar, P.F.; Melo, R.M. Microstructure characterization and SCG of newly engineered dental ceramics. *Dent. Mater.* **2016**, *32*, 870–878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Alao, A.R.; Stoll, R.; Song, X.F.; Miyazaki, T.; Hotta, Y.; Shibata, Y.; Yin, L. Surface quality of yttria-stabilized tetragonal zirconia polycrystal in CAD/CAM milling, sintering, polishing and sandblasting processes. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2017**, *65*, 102–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Matzinger, M.; Hahnel, S.; Preis, V.; Rosentritt, M. Polishing effects and wear performance of chairside CAD/CAM materials. *Clin. Oral Investig.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Atay, A.; Gürdal, I.; Bozok Çetintas, V.; Üs,ümez, A.; Cal, E. Effects of New Generation All-Ceramic and Provisional Materials on Fibroblast Cells. *J. Prosthodont.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Cohen, J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, 2nd ed.; Erlbaum: Hillsdale, NJ, USA, 1988.
30. Pallant, J. *SPSS Survival Manual*, 3rd ed.; McGraw Hill Open University Press: New York, NY, USA, 2007; pp. 224–240.
31. Kwon, Y.D.; Choi, H.J.; Lee, H.; Lee, J.W.; Weber, H.P.; Pae, A. Cellular viability and genetic expression of human gingival fibroblasts to zirconia with enamel matrix derivative (Emdogain®). *J. Adv. Prosthodont.* **2014**, *6*, 406–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Grenade, C.; de Pauw-Gillet, M.C.; Gailly, P.; Vanheusden, A.; Mainjot, A. Biocompatibility of polymerinfiltrated-ceramic-network (PICN) materials with Human Gingival Fibroblasts (HGFs). *Dent. Mater.* **2016**, *32*, 1152–1164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Grenade, C.; de Pauw-Gillet, M.C.; Pirard, C.; Bertrand, V.; Charlier, C.; Vanheusden, A.; Mainjot, A. Biocompatibility of polymer-infiltrated-ceramic-network (PICN) materials with Human Gingival Keratinocytes (HGKs). *Dent. Mater.* **2017**, *33*, 333–343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Linkevicius, T.; Apse, P. Influence of abutment material on stability of peri-implant tissues: A systematic review. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **2008**, *23*, 449–456. [[PubMed](#)]
35. Kent, L.W.; Dyken, R.A.; Rahemtulla, F.; Allison, A.C.; Michalek, S.M. Effect of in vitropassage of healthy human gingival fibroblasts on cellular morphology and cytokineexpression. *Arch. Oral Biol.* **1996**, *41*, 263–270. [[CrossRef](#)]
36. Welander, M.; Abrahamsson, I.; Berglundh, T. The mucosal barrier at implant abutments of different materials. *Clin. Oral Implants Res.* **2008**, *19*, 635–641. [[PubMed](#)]

37. Soon, G.; Pingguan-Murphy, B.; Wee Lai, K.; Ali Akbar, S. Review of zirconia-based bioceramic: Surface modification and cellular response. *Ceram. Int.* **2016**, *42*, 12543–12555. [[CrossRef](#)]
38. Denry, I. How and when does fabrication damage adversely affect the clinical performance of ceramic restorations? *Dent. Mater.* **2013**, *29*, 85–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Tetè, S.; Mastrangelo, F.; Bianchi, A.; Zizzari, V.; Scarano, A. Collagen fiber orientation around machined titanium and zirconia dental implant necks: An animal study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **2009**, *24*, 52–58. [[PubMed](#)]
40. Brunette, D.M.; Chehroudi, B. The effects of the surface topography of micromachined titanium substrata on cell behavior in vitro and in vivo. *J. Biomech. Eng.* **1999**, *121*, 49–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Cochran, D.; Simpson, J.; Weber, H.P.; Buser, D. Attachment and growth of periodontal cells on smooth and rough titanium. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **1994**, *9*, 289–297.
42. Fischer, N.G.; Wong, J.; Baruth, A.; Cerutis, D.R. Effect of Clinically Relevant CAD/CAM Zirconia Polishing on Gingival Fibroblast Proliferation and Focal Adhesions. *Materials* **2017**, *10*, 1358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Kunzler, T.P.; Drobek, T.; Schuler, M.; Spencer, N.D. Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients. *Biomaterials* **2007**, *28*, 2175–2182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Pendegrass, C.J.; Gordon, D.; Middleton, C.A.; Sun, S.N.; Blunn, G.W. Sealing the skin barrier around transcutaneous implants: In vitro study of keratinocyte proliferation and adhesion in response to surface modifications of titanium alloy. *J. Bone Jt. Surg. Br.* **2008**, *90*, 114–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Rutkunas, V.; Bukelskiene, V.; Sabaliauskas, V.; Balciunas, E.; Malinauskas, M.; Baltriukiene, D. Assessment of human gingival fibroblast interaction with dental implant abutment materials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2015**, *26*, 169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Kournetas, N.; Spintzyk, S.; Schweizer, E.; Sawada, T.; Said, F.; Schmid, P.; Geis-Gerstorfer, J.; Eliades, G.; Rupp, F. Comparative evaluation of topographical data of dental implant surfaces applying optical interferometry and scanning electron microscopy. *Dent. Mater.* **2017**, *33*, e317–e327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Hopp, I.; Micheltore, A.; Smith, L.E.; Robinson, D.E.; Bachhuka, A.; Mierczynska, A.; Vasilev, K. The influence of substrate stiffness gradients on primary human dermal fibroblasts. *Biomaterials* **2013**, *34*, 5070–5077. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Lo, C.M.; Wang, H.B.; Dembo, M.; Wang, Y.L. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 144–152. [[CrossRef](#)]
49. Yeung, T.; Georges, P.C.; Flanagan, L.A.; Marg, B.; Ortiz, M.; Funaki, M.; Zahir, N.; Ming, W.; Weaver, V.; Janmey, P.A. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motil. Cytoskelet.* **2005**, *60*, 24–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Solon, J.; Levental, I.; Sengupta, K.; Georges, P.C.; Janmey, P.A. Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates. *Biophys. J.* **2007**, *93*, 4453–4461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Donno, R. Nanomechanical Characterisation of Cells and Biocompatible Substrates. Ph.D. Thesis, School of Medicine, The University of Manchester, Causeway Bay, UK, 2013.
52. Freytes, D.O.; Wan, L.Q.; Vunjak-Novakovic, G. Geometry and force control of cell function. *J. Cell. Biochem.* **2009**, *10*, 1047–1058. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Panzetta, V. Evaluation of Material Mechanical Properties Influencenon Single Cell Mechanics. In *Research Doctorate in Ingegneria dei Materiali e Delle Strutture XXIII Cycle, Facoltà di Ingegneria Dipartimento di Ingegneria dei Materiali e Della Produzione*; Università degli studi di Napoli “Federico II”: Napoli, Italia, 2011.
54. Vita Zahnfabrik BadSäckingen. *VITA YZ Technical and Scientific Documentation*; Vita Zahnfabrik BadSäckingen: Bad Säckingen, Germany, 2014.
55. Lawson, N.C.; Bansal, R.; Burgess, J.O. Wear, strength, modulus and hardness of CAD/CAM restorative materials. *Dent. Mater.* **2016**, *32*, e275–e283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Lambert, H.; Durand, J.C.; Jacquot, B.; Fages, M. Dental biomaterials for chairside CAD/CAM: State of the art. *J. Adv. Prosthodont.* **2017**, *9*, 486–495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Elson, E.L. Cellular Mechanics as an Indicator of Cytoskeletal Structure and Function. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1988**, *17*, 397–430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Jean, R.P.; Gray, D.S.; Spector, A.A.; Chen, C.S. Characterization of the nuclear deformation caused by changes in endothelial cell shape. *J. Biomech. Eng.* **2004**, *126*, 552–558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

59. Vishavkarma, R.; Raghavan, S.; Kuyyamudi, C.; Majumder, A.; Dhawan, J.; Pullarkat, P.A. Role of actin filaments in correlating nuclear shape and cell spreading. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e107895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Ingber, D.E.; Tensegrity, I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J. Cell Sci.* **2003**, *16*, 1157–1173. [[CrossRef](#)]
61. Nebe, B.; Forster, C.; Pommerenke, H.; Fulda, G.; Behrend, D.; Bernewski, U.; Schmitz, K.P.; Rychly, J. Structural alterations of adhesion mediating components in cells cultured on poly-beta-hydroxy butyric acid. *Biomaterials* **2001**, *22*, 2425–2434. [[CrossRef](#)]
62. Swanson, J.A.; Lee, M.; Knapp, P.E. Cellular dimensions affecting the nucleocytoplasmic volume ratio. *J. Cell Biol.* **1991**, *115*, 941–948. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Kulkarni, S. *Machine Learning Algorithms for Problem Solving in Computational Applications: Intelligent Techniques*; IGI Global: Hershey, PA, USA, 2012; pp. 1–464. [[CrossRef](#)]
64. Hunter, A.; Archer, C.W.; Walker, P.S.; Blunn, G.W. Attachments and proliferation of osteoblasts and fibroblasts on biomaterials for orthopedic use. *Biomaterials* **1995**, *16*, 287–295. [[CrossRef](#)]
65. Ismail, M.; Rohanzadeh, R.; Atwa, S.; Mason, R.; Ruys, A.; Martin, P.; Bendavid, A. The influence of surface chemistry and topography on the contact guidance of MG63 osteoblast cells. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2007**, *18*, 705–714. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Sanchez Valenciano, D. Análisis del software ImageJ para el análisis científico de imágenes. In *Proyecto fin de Grado en Ingeniería de Sonido e Imagen, Escuela Técnica Superior de Ingeniería y Sistemas de Telecomunicación*; Universidad Politécnica de Madrid: Madrid, Spain, 2014.



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Anexo 2. Publicación de resolución de premio al mejor artículo científico del mes de septiembre en el Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud año 2018.



Escuela Andaluza de Salud Pública
CONSEJERÍA DE SALUD Y FAMILIAS

**PREMIO A LA PUBLICACIÓN CIENTÍFICA DEL MES DEL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD**
(Universidad de Sevilla, Universidad de Jaén y Escuela Andaluza de Salud Pública)

**RESOLUCIÓN DEFINITIVA PREMIOS OTORGADOS A LA PUBLICACIÓN
CIENTÍFICA DEL MES 2018**

La Comisión Académica del Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud en su reunión de fecha 13 de diciembre de 2018, valora las publicaciones que han optado a esta convocatoria, atendiendo a criterios de factor de impacto y posición de la revista, otorgando los premios según se indica a continuación:

- Mejor publicación enero 2018: Eva Martín Ruíz
- Mejor publicación febrero 2018: Beatriz Castejón Vega
- Mejor publicación marzo 2018: Paloma Montero Miralles
- Mejor publicación abril 2018: José Manuel Martínez Montilla
- Mejor publicación mayo 2018: No se presentó ninguna publicación
- Mejor publicación junio 2018: Ana M^a Menjívar Galán
- Mejor publicación julio 2018: Paulo Soares Ribeiro
- Mejor publicación agosto 2018: Daniel Cabanillas Balsera
- Mejor publicación septiembre: María Rizo Gorrita
- Mejor publicación octubre: Inmaculada Lancharro Taverro
- Mejor publicación noviembre: Daniel Cabanillas Balsera
- Mejor publicación diciembre: Sandra Priscila Távora Vidalón.

Como se establece en la convocatoria se han seleccionado de entre las publicaciones premiadas las tres más relevantes, asignándoles además de su acreditación como mejor

publicación del mes correspondiente, una asignación económica. Los doctorandos que han obtenido el premio anual 2018 son los siguientes:

- Primer premio anual: Beatriz Castejón Vega
- Segundo premio anual: Sandra Priscila Távora Vidalón
- Tercer premio anual: Daniel Cabanillas Balsera

Los candidatos que hayan obtenido publicación premiada recibirán un certificado acreditando tal condición.



FDO. EUGENIA GIL GARCÍA
PRESIDENTA DE LA COMISIÓN ACADÉMICA

Anexo 3. Artículo publicado en la revista *Polymers* con factor de impacto 3.164 según los datos obtenidos del *Journal Citations Reports*[®] (JCR) en el año 2018, según *Clarivate Analytics* en 2018.

Rizo-Gorrita M, Herráez-Galindo C, Torres-Lagares D, Serrera-Figallo MÁ, Gutiérrez-Pérez JL. Biocompatibility of Polymer and Ceramic CAD/CAM Materials with Human Gingival Fibroblasts (HGFs). *Polymers* (Basel). 2019 Sep 3;11(9).

Article

Biocompatibility of Polymer and Ceramic CAD/CAM Materials with Human Gingival Fibroblasts (HGFs)

María Rizo-Gorrita †, Cristina Herráez-Galindo †, Daniel Torres-Lagares, María-Ángeles Serrera-Figallo * and José-Luis Gutiérrez-Pérez

Department of Oral Surgery, College of Dentistry, Seville University, Calle de Avicena, s/n, 41009 Seville, Spain

* Correspondence: maserrera@us.es

† These authors contributed equally to this work.

Received: 20 August 2019; Accepted: 31 August 2019; Published: 3 September 2019

Abstract: Four polymer and ceramic computer-aided design/computer-aided manufacturing (CAD/CAM) materials from different manufacturers (VITA CAD-Temp (polymethyl methacrylate, PMMA), Celtra Duo (zirconia-reinforced lithium silicate ceramic, ZLS), IPS e.max CAD (lithium disilicate (LS₂)), and VITA YZ (yttrium-tetragonal zirconia polycrystal, Y-TZP)) were tested to evaluate the cytotoxic effects and collagen type I secretions on human gingival fibroblasts (HGFs). A total of 160 disc-shaped samples (\varnothing : 10 ± 2 mm; h: 2 mm) were milled from commercial blanks and blocks. Direct-contact cytotoxicity assays were evaluated at 24, 48, and 72 h, and collagen type I (COL1) secretions were analysed by cell-based ELISA at 24 and 72 h. Both experiments revealed statistically significant differences ($p < 0.05$). At 24 and 48 h of contact, cytotoxic potential was observed for all materials. Later, at 72 h, all groups reached biologically acceptable levels. LS₂ showed the best results regarding cell viability and collagen secretion in all of the time evaluations, while Y-TZP and ZLS revealed intermediate results, and PMMA exhibited the lowest values in both experiments. At 72 h, all groups showed sharp decreases in COL1 secretion regarding the 24-h values. According to the results obtained and the limitations of the present in vitro study, it may be concluded that the ceramic materials revealed a better cell response than the polymers. Nevertheless, further studies are needed to consolidate these findings and thus extrapolate the results into clinical practice.

Keywords: polymethyl methacrylate (PMMA); silicates/chemistry; CAD-CAM; materials testing; biocompatible materials/chemistry; fibroblasts/cytology; cell survival; collagen type I

1. Introduction

Once implant osseointegration is achieved, a transepithelial abutment is placed for the soft tissue remodelling process [1]. The abutment material should be as similar as possible to the natural tissues in order to create a hermetic barrier [2] between the gingiva and abutment to achieve cellular proliferation and protect the underlying implant. These materials must be biocompatible [2–10] because dental materials are always in contact with soft or bone tissue [6,11].

The study materials were milled using a computer-aided design/computer-aided manufacturing (CAD/CAM) system. This technology was developed in 1985 [12] and has improved modern dentistry, introducing new material designs. CAD/CAM offers a wide variety of advantages, such as reducing production time and achieving mimetic and perfectly adapted structures [2,6,13–17].

Zirconia is one of the most used CAD/CAM materials, but it suffers from expansion during cooling after sintering. This volumetric change is associated with the transformation from the

tetragonal to monoclinic phase and can promote the propagation of cracks in its structure. The addition of a stabilizing agent, such as yttrium oxide (Y_2O_3), reinforces the zirconium oxide and

Polymers 2019, 11, 1446; doi:10.3390/polym11091446

www.mdpi.com/journal/polymers

prevents this transformation phase and the propagation of cracks. Adding 3–6% of yttrium to zirconia leads to the formation of yttrium-tetragonal zirconia polycrystal (Y-TZP) and is the type of zirconia most commonly used in dentistry [18–21].

Pre-sintered zirconia is usually employed to more easily handle the soft material and prevent the transformation phase induced by the milling of CAD/CAM materials, which are more susceptible to forming cracks on their structure [22]. Nevertheless, this material exhibits good mechanical properties, largely due to the particle size of the structure (0.2–0.5 μm), which helps to maintain the stable tetragonal phase. It presents a high flexural strength (900–1200 MPa), fracture resistance (7–10 MPa $\text{m}^{1/2}$), and elasticity modulus (210 GPa). It is increasingly considered to be the alternative to titanium for aesthetic dental implant abutments in final restorations.

Other ceramic materials are also widely used in dentistry [23,24], such as lithium disilicate ($\text{Li}_2\text{Si}_2\text{O}_5$) glass ceramic. This material has been used for CAD/CAM manufacture since 2006 under the name IPS e.max CAD[®] and has diverse indications (e.g., crowns, inlays, onlays, implant crowns, and veneers) because of its aesthetic properties and mechanical strength [2,6,17,23–26]. It is commercialised as pre-crystallised blue blocks, which have a metasilicate and lithium disilicate nucleus. This nucleus has good mechanical properties (flexural force of 130 MPa), which increase up to 360 MPa during the crystallisation process (sintering at 850 °C for 20–25 min), according to the manufacturer. Metasilicate is dissolved and leaves lithium disilicate crystals that can be coloured during the glazing process [2,6,13,15,23–25,27–29]. The final mechanical properties are a fracture resistance of 2.25 MPa $\text{m}^{1/2}$, flexural strength of 360 MPa, and elastic modulus of 95 GPa [30].

A new material has emerged to satisfy the need for a material with the good mechanical properties of zirconia and the good aesthetic properties of lithium disilicate (LS_2) [31]. This material is made by combining a vitreous matrix of lithium silicate and a crystal nucleus of zirconia, leading to the formation of zirconia-reinforced lithium silicate ceramic (ZLS). It was developed in 2013 by two manufacturers: Degudent and VITA Zahnfabrik at the Institute for Silicate Research in Germany. One of the commercialised materials is Celtra[®] Duo and has a fast CAD/CAM manufacturing process and better optical and mechanical properties than LS_2 [32–34]. It has a high fracture resistance of 2 MPa m^{-1} , elastic modulus of 70 GPa, and flexural strength of 200 MPa [35–37], and it is used for single anterior and posterior crowns, inlays, onlays, and veneers [37].

Recently, CAD/CAM materials were developed for temporary restorations, one of which is poly(methyl methacrylate) (PMMA), which is a synthetic polymer material that has been used in dentistry since 1930 for orthodontics, removable prostheses, and splint manufacturing [38]. Its colour stability, resistance, and ease of preparation make it an ideal provisional material [38–42]. Interim restorations are an essential part of the process, especially in fixed implant prosthesis treatment [38,42], preventing bacterial contamination and improving abutment health [38]. Vita CAD-Temp[®] was introduced to the market in 2005 as chemically improved polymer CAD/CAM blanks [43]. This PMMA-based polymer material is pre-polymerised before market distribution blocks. This reduces time and cost in the laboratory, eliminates polymerisation shrinkage [44], reduces clinical chairside, and unpleasant smells because the material is not mixed manually or in a cartridge, and it improves outcomes in terms of a better marginal fit and strength [12,38,42]. It is one of the most used temporary materials before the placement of the final restoration [38,45,46] and is also used in surgical guide manufacturing. It has good mechanical properties with a high elastic modulus (2800 MPa) and flexural resistance (>80 MPa), which makes it a long-term provisional material [39,47].

The aim of this in vitro study was to compare the early response of human gingival fibroblasts of four dental materials relative to biocompatibility and collagen secretion. To this end, we conducted an MTT cytotoxicity test, which measures cellular viability through mitochondria metabolism, and an enzyme-linked immunosorbent assay to measure collagen type I secretion.

To our knowledge, there are no other publications that compare these four materials in terms of their biocompatibility and COL1 secretion assays. Three publications compare some of these materials separately [13,17,48].

The null hypothesis was that the all-ceramic (Vita YZ® T, ZLS Celtra® Duo and IPS e.max® CAD) and interim materials (Vita CAD Temp®) do not significantly influence HGF viability and collagen type I secretion.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Preparation

Four CAD/CAM materials groups were used: Vita CAD-Temp® (VITA Zahnfabrik, Bad Säckingen, Germany), IPS e.max® CAD (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein), VITA YZ® T (Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Germany), and Celtra® Duo (Degudent GmbH, Hanau-Wolfgang, Germany); the manufacturers' details are summarised in Table 1.

Table 1. The brand names, types, compositions, and manufacturers' data of the materials.

Specimen	Material type	Composition	Manufacturer	Lot No.
Vita CAD-Temp® monoColor (PMMA)	Polymethacrylate	C ₅ O ₂ H ₈ , SiO ₂ and pigments	VITA Zahnfabrik, Bad Säckingen, Germany	1M27/51750
Celtra® Duo (ZLS)	Zirconiareinforced lithium silicate	SiO ₂ , Li ₂ O, P ₂ O ₅ , Al ₂ O ₃ , ZrO ₂ , CeO ₂ , Tb ₂ O ₃	Degudent GmbH, HanauWolfgang, Germany	HT-A1- C14/16002830
IPS e.max® CAD (LS ₂)	Vitreous ceramic lithium disilicate	SiO ₂ , Li ₂ O, K ₂ O, MgO, ZnO, Al ₂ O ₃ , P ₂ O ₅	Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein	HT A1/C1 4 /V28352
VITA YZ® (Y-TZP)	Zirconia partially stabilised with yttrium oxide	Al ₂ O ₃ , ZrO ₂ , Y ₂ O ₃ , Fe ₂ O ₃ , Er ₂ O ₃ , Hf ₂ O ₃	VITA Zahnfabrik, Bad Säckingen, Germany	YZ Twhite/74970

One hundred and sixty disc-shaped specimens (10 ± 2 mm in diameter and 2 mm in width) were milled from commercial blanks and blocks, as can be seen in Figure 1.

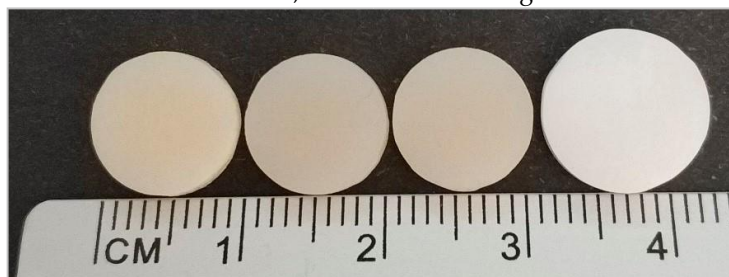


Figure 1. Materials (from left to right): PMMA, ZLS, LS₂, and Y-TZP.

Discs were milled using InLab MC XL® (Sirona, Bensheim, Germany) and Software InLab SW 16.1 (Sirona, Bensheim, Germany). This system works at 42,000 rpm and 320 VA and is irrigated with water and Dentatec (Sirona, Bensheim, Germany); the results obtained have high precision (tolerance value of $\pm 25\mu\text{m}$). The milling process was made with the following drills: Step Bur 12S and Cylinder Pointed Bur 12S (PMMA blocks), Step Bur 12 and 12S, Cylinder Pointed Bur 12 and 12S (ZLS blocks), Step Bur 12S, 12 and 20, Cylinder Pointed Bur 12S, 20 and 12EF (LS₂ blocks), and Step Bur 20, Cylinder Pointed Bur 20, Shaper 25 RZ and Finisher 10 (Y-TZP blanks, dry-milling).

Once the milling process was finished, lithium disilicate (LS₂) was crystallised in Programat® P700 (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein), a ceramic furnace that works in vacuum conditions at a temperature range between 840 and 850 °C for 20–30 min. Furthermore, the zirconia (Y-TZP) sintering process was performed in a VITA ZYRCOMAT 6000 MS furnace (VITA Zahnfabrik, Bad Säckingen, Germany) with the YT Universal program at 1530 °C for 4 h and 40 min.

Zirconia-reinforced lithium silicate (ZLS) blocks are commercialised in a fully sintered state with the final restoration shade; it is unnecessary to carry out additional sintering, unless better mechanical properties are demanded. This is a valid alternative to LS₂ when high aesthetic quality and time savings are required. PMMA is a polymer composite, so there is no need for a sintering or crystallisation process, as indicated by the manufacturer.

When the milling only (PMMA and ZLS) and the milling and sintering (Y-TZP and LS₂) processes were finished, we obtained discs of 10 ± 2 mm diameter and 2 mm height (final dimensions of all discs). Discs were then cleaned by immersion with absolute ethanol and sterilised with shortwavelength (200–280 nm) UV-C exposure for 30 min on each side inside a laminar flow workstation. Next, discs were placed on sterile 48-well plates and were used as cell seeding substrates for both experiments (Figure 2).

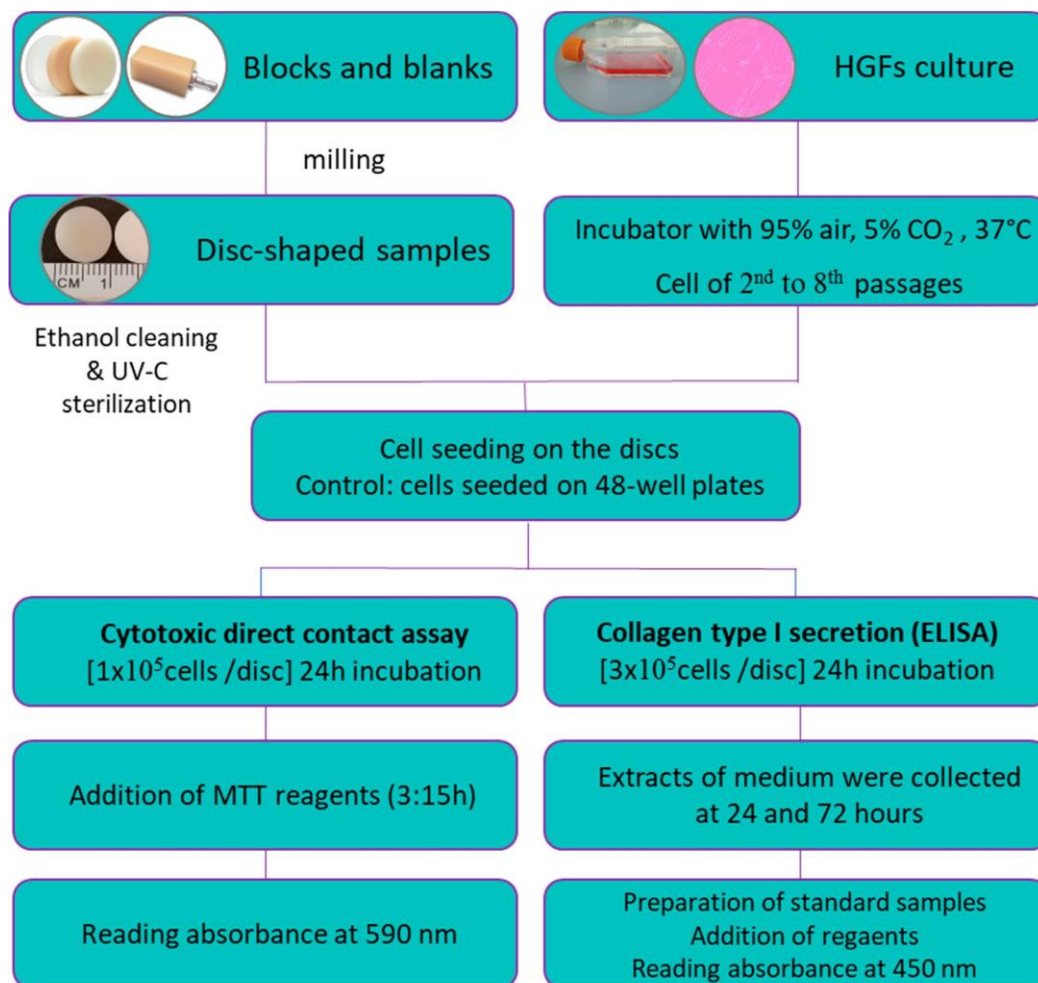


Figure 2. Diagram of the study design.

2.2. Cell Culture

Human gingival fibroblasts (Innoprot, Bizkaia, Spain) were cultured in tissue flasks of polystyrene in a CO₂ incubator in a Nuair US Autoflow NU-4750-E (Nuair, Plymouth, Minnesota, USA) at 37 °C in humidified 5% carbon dioxide (CO₂) with a 95% air atmosphere for 1–2 weeks. Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Biowest, Nuaille, France) was supplemented with 10% FBS (Biowest, Nuaille, France) and 1% glutamine–penicillin–streptomycin (Biowest, Nuaille, France). The medium was changed every 48 h, and the cells were subcultured regularly upon reaching 80% confluence. Later, the cells were passaged after trypsinization using 0.25% trypsin (Biowest, Nuaille, France) and Dulbecco's phosphate-buffered saline without calcium and magnesium (DPBS, Lonza, Basel, Switzerland), which was previously tempered in a water bath at 37 °C. Cellular growth, adhesion, and proliferation were monitored with an Olympus CKX41SF2 microscope (Olympus, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan). Cultured HGFs from the second to eighth passages were used for the experiments.

2.3. Cytotoxicity Assay

With the purpose of evaluating the cytotoxicity of the materials, a cell viability assay was carried out at 24, 48, and 72 h. The protocol used is based on measurements of the viability of cells through metabolic activity in a colorimetric test.

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) is a yellow-coloured tetrazolium water-soluble salt that is metabolically reduced by mitochondrial succinate dehydrogenase (SDH) from viable cells, produces formazan products (blue-violet salt), cannot cross plasmatic membranes, and accumulates in the cells [13,48–51]. The number of viable cells is correlated with the colour intensity determined by photometric measurements when formazan is dissolved in alcohol. The MTT cell proliferation assay (ab211091 kit, Abcam, Cambridge, UK) was performed by a direct-contact method according to ISO 10993-5:2009. This standard establishes that a material has a cytotoxic potential if cell viability is reduced below 70% [52].

Reaching 80% confluence, the cells were removed from culture flasks by enzymatic digestion Trypsin/EDTA 0.25% and centrifuged using Allegra™ X-22R Centrifuge (Bekman Coulter, Indianapolis, Indiana, USA) at 200 g for 3 min. A total of 96 discs was used for this experiment. Four discs were used for each material and evaluation time (24, 48, and 72 h) and were placed in 48-well plates. The same number of wells were used for the controls and blanks. Fibroblasts were seeded at a concentration of 1×10^5 cells/disc in 500 μ L of MEM (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA). The same cell concentration was cultured on empty 48-well plates as a control group. Wells containing only MEM were used as blanks. MEM was used without FBS or phenol red to avoid the overlapping of serum proteins and MTT absorbance.

At determined evaluation times, the medium was removed and replaced by MEM and MTT reagent during 3 h of incubation. Next, the formation of formazan crystals was checked under an inverted microscope and a dissolvent reagent was added. Plates were shaken for 15 min, and 250 μ L of each well was placed in a 96-microwell plate. The optical density (OD) of the resulting solution was measured with a Synergy HT microplate reader (Biotek, Winooski, VT, USA) and Gen5™ Data Analysis Software (Winooski, VT, USA) at 590 nm. The mean absorbance values (samples and controls) were corrected for the mean absorbance of the blanks.

Cell viability was calculated as a percentage in relation to the control group, taken as 100% with the following formula: % viability = [(Sample absorbance – Blank absorbance) / (Control absorbance – Blank absorbance)] \times 100.

2.4. Type I Collagen Secretion (ELISA)

To determinate the secretion of collagen type I into the medium by HGFs seeded on the discs, a double-antibody sandwich ELISA assay (ELISA Kit MyBioSource, San Diego, CA, USA) was performed. After 24 h and 72 h of incubation, the supernatant was collected, centrifuged, and analysed by an enzyme-linked immunosorbent assay. A total of 64 discs were used, with four discs per material and time evaluation. The cells were seeded at a density of 3×10^5 cells/disc in 500 μ L of MEM. MEM

was used for the same reasons as those stated above. Discs were placed in 48-well plates for the experiment.

Briefly, dilutions were prepared in a dilution buffer. On an antibody-precoated 96-microwell plate, 100 μ l of dilutions and 100 μ l supernatants were added to each well. Collagen was detected by the human COL1 monoclonal antibody. Next, the biotin labelling antibody was added and washed with a washing buffer. Later, avidin–horseradish peroxidase conjugates were added to the wells; the plate was washed to remove the unbound enzyme-labelled antibodies. A TMB substrate was used to colour the peroxidase catalyst blue, which turns yellow upon reaction to sulfuric acid. The plates were read at 450 nm with a Synergy HT microplate reader and Gen5™ Data Analysis Software. The mean absorbance values (samples and controls) were corrected for the mean absorbance of the blanks. A standard curve was assessed to interpolate optical density (OD) values to the concentrations of collagen type I (ng/mL).

2.5. Statistical Analysis

The comparison of the groups for each of the analysed variables was made using IBM SPSS Statistics 24.0 software (International Business Machines Corp., New York, NY, USA). The Kolmogorov–Smirnov test was performed to verify normal distribution. The homogeneity equality of variance was checked using Levene’s test. One-way analysis of variance (ANOVA) was calculated to assess the statistical significance of differences in cell viability and collagen type I secretion. Post hoc comparisons were undertaken with Bonferroni and Games–Howell tests for equal or unequal variances, respectively. The level of significance was set at $p < 0.05$. Results were reported as a mean \pm standard deviation (SD).

3. Results

3.1. Cytotoxicity of CAD/CAM Materials

In order to evaluate the cytotoxicity of the materials, cell viability was measured by a direct contact MTT assay at three evaluation times (24 h, 48 h, and 72 h). The results revealed a significant and linear effect of time ($p < 0.01$) and type of material ($p < 0.05$) on the cell viability. Cytotoxicity decreased over time (Figure 3). Significant differences among groups were shown at 24 h ($p < 0.01$). LS₂ revealed the highest viability (59.46% \pm 3.32%) and PMMA the lowest (40.65% \pm 3.32%); both were compared to the other materials (Y-TZP (54.74% \pm 3.90%) and ZLS (42.20% \pm 2.74%)). There were significant differences between all groups ($p < 0.02$), except between ZLS and PMMA ($p > 0.05$).

The same group distribution was seen at 48 h. There was an increase in the cell viability in all groups, with significant differences between them at 48 h ($p < 0.05$). LS₂ showed the highest viability (67.35% \pm 7.20%), and PMMA showed the lowest (58.85% \pm 3.18%), compared with the LS₂, Y-TZP (62.04% \pm 3.26%) and ZLS (60.51% \pm 2.69%) groups, but there were only significant differences when comparing LS₂ with ZLS ($p = 0.02$) and LS₂ with PMMA ($p < 0.01$).

At 72 h, all materials showed the highest viability between the three points of time evaluation. The group with the highest cell viability was LS₂ (94.52% \pm 2.30%), and PMMA showed the lowest (86.62% \pm 3.75%). The statistically significant differences seen at 48 h remained at 72 h between LS₂ and ZLS ($p = 0.01$) and LS₂ with PMMA ($p < 0.01$). There was also a significant difference between Y-TZP and PMMA ($p < 0.01$).

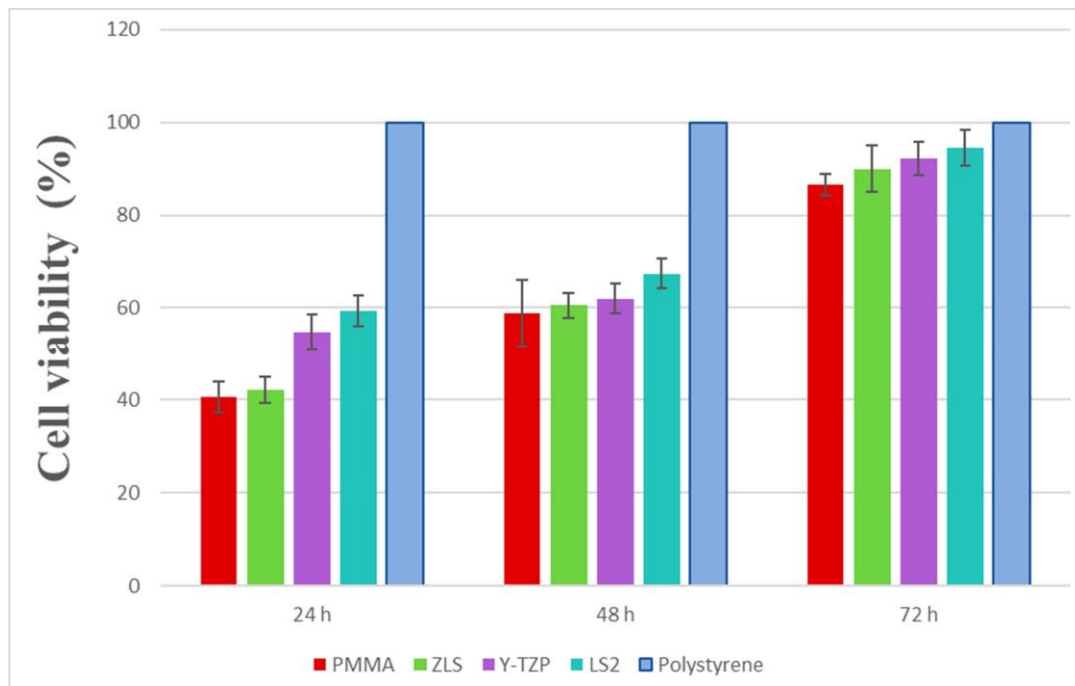


Figure 3. Cell viability percentage at 24, 48, and 72 h using MTT assay. The data are expressed as the mean values \pm standard deviation.

3.2. Evaluation of Collagen Type I Secretion (ELISA)

After seeding HGFs for 24 and 72 h, the secretion of collagen type I to the culture medium was quantified through an ELISA assay. A standard curve was defined by the absorbance from the standards containing known concentrations of COL1 (Figure 4).

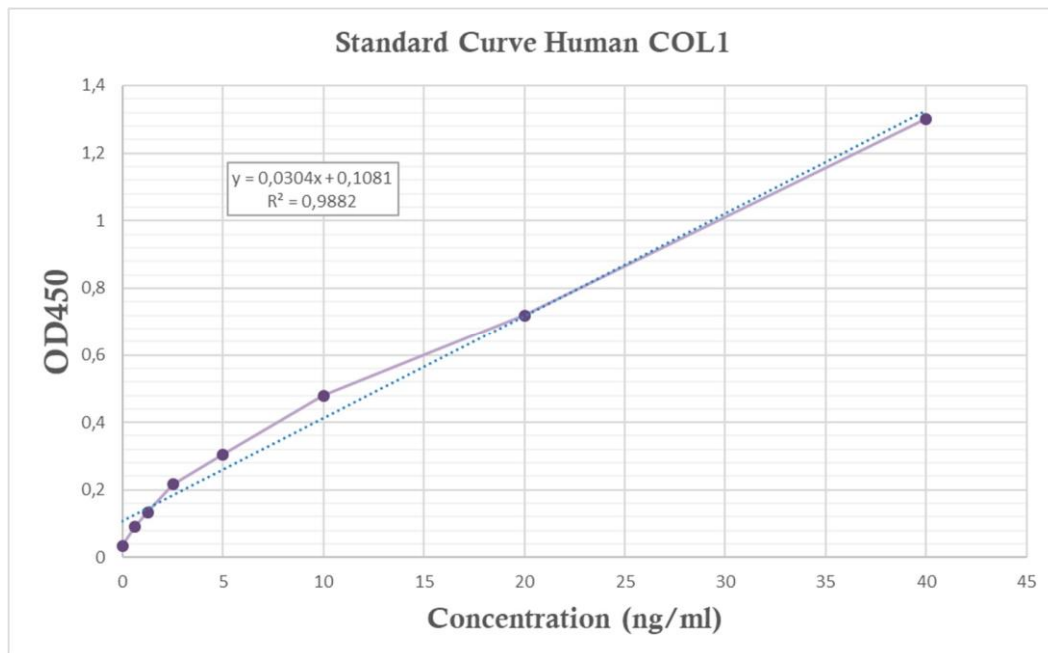


Figure 4. Standard curve used in ELISA assay. In the top-left box, the equation of the line used to obtain the concentrations of the samples is given, in addition to the correlation coefficient R^2 , which indicates a strong relation between the two variables (optical density (OD) and collagen type I (COL1) concentration) as it is close to 1.

After 24 h of cultivation, levels of collagen type I showed differences between groups ($p < 0.01$) (Figure 5). LS₂ (5.56 ± 0.41 ng/mL) showed the highest secretions ($p < 0.01$) compared to the other groups; in decreasing order: Y-TZP (3.89 ± 0.14 ng/mL), ZLS (3.77 ± 0.30 ng/mL), and PMMA (3.01 ± 0.06 ng/mL). The collagen secretion measured in the polystyrene control surface (1.63 ± 0.22 ng/mL) was significantly lower than the other groups ($p < 0.01$). There were statistically significant differences between all groups, except between ZLS–Y-TZP ($p > 0.05$) and ZLS–PMMA ($p = 0.05$).

At 72 h, the levels of secretion of collagen were sharply reduced in all groups ($p < 0.01$ for all groups). The same trend of group distribution was observed. LS₂ showed the lowest reduction (2.24 ± 0.13 ng/mL), followed by Y-TZP (1.50 ± 0.08 ng/mL), ZLS (0.6 ± 0.08 ng/mL), PMMA (0.38 ± 0.15 ng/mL), and the control group (0.21 ± 0.03 ng/mL). The latter group revealed the highest decrease in collagen secretion. There were significant differences between groups ($p < 0.01$), except for PMMA–ZLS and PMMA–control ($p > 0.05$ for both comparisons).

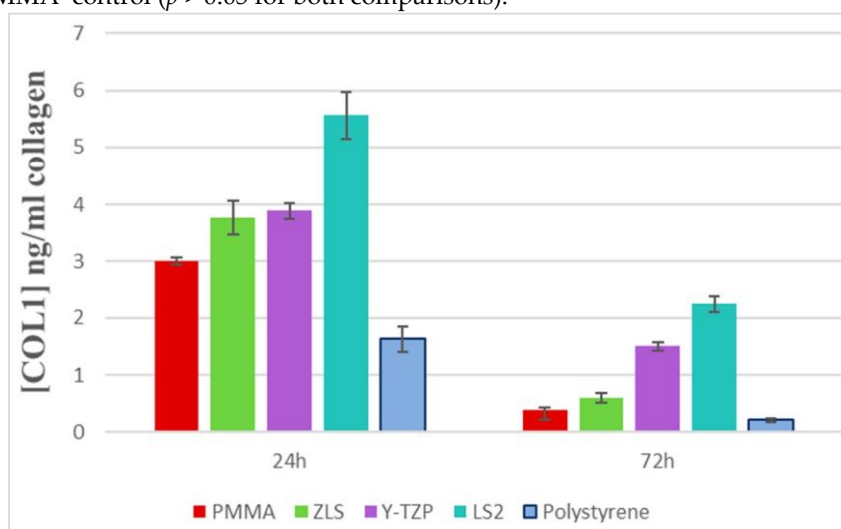


Figure 5. Type I secretion levels at 24 and 72 h.

4. Discussion

Biocompatibility refers to a material's ability to not affect the local or systemic behaviour of an organism. Cytotoxicity is an important biocompatibility component [11,53]. It can be studied in *in vivo* or *in vitro* studies. The former has some disadvantages, such as being difficult to control and interpret, in addition to legal and ethical considerations. Nevertheless, the latter offers important advantages: the possibility to study a reaction cell of interest, lower variability results, and easier access to the investigated site [11,51,53,54]. Most *in vitro* studies of dental material cytotoxicity are cell culture systems [53].

This study investigates the human gingival fibroblasts' response to the MTT cytotoxicity method and collagen type I secretion on dental CAD/CAM materials, which are widely used as implant crowns and implant transmucosal abutments. Unlike immortal cell lines, primary HGFs keep phenotypically similar features to normal cells, resulting in a very similar imitation to *in vivo* circumstances [6,49].

Gingiva is the epithelium in charge of creating a barrier (biological seal) between the abutment and the connective tissue. This barrier should adhere to the implant abutment surface, which has the function of creating stability between soft and hard tissues (protecting implant–abutment connection and peri-implant bone), protection against noxious bacteria, and has an acceptable aesthetic quality. The protective barrier requires a nontoxic material that favours the attachment and growth of the surrounding tissues [5,49,54–56].

A cell viability assay was conducted with a colorimetric MTT study based on the mitochondrial activity of cells in direct contact with the different surfaces. This kind of research is undertaken in accordance with ISO 10993-5, resulting in a standardised methodology and an objective numeric comparison of the obtained results. Nevertheless, the ISO standard does not have a defined classification to establish cell viability value ranges to determine the grade of cytotoxicity of the

materials according to the *in vitro*-type assay. Publications that do not apply an ISO standard add other variables that complicate the comparison between *in vitro* studies and the interpreted results [57]. Therefore, conclusions derived from comparisons made with no standardised viability assays should be interpreted with caution.

Most of the studies use an MTT assay, but this is not the only way to analyse cellular viability. One of the methods used was the (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) (XTT) cytotoxicity test, which used XTT, another salt that produces formazan through mitochondrial dehydrogenases [17,52]. Other similar colorimetric assays are the MTS test and XPS test [6].

MTT is not a new cellular proliferation assay in dentistry. In the year 1993, Li et al. published an experiment about cell reactions to zirconia and other ceramics. Another classic study investigated the cytotoxicity of some metals and ceramics in relation to mouse fibroblasts. They concluded that all ceramic materials had an appropriate biocompatibility [58]. Recently, the biocompatibility of allceramic CAD/CAM materials has also been studied [2,25,58–60], and the present study contributes to this research.

Our results demonstrated good biocompatibility levels in all the analysed materials. We studied viability levels using a direct-contact MTT assay evaluated at 24, 48, and 72 h periods on three all-ceramic CAD/CAM materials and one polymer-based CAD/CAM material. We determined ascendant viability values over the time points (viability at 72 h > 48 h > 24 h). LS₂ viability stood out significantly over all the other materials throughout the three-time evaluation points ($p < 0.05$); however, although some of the differences were statistically significant, Y-TZP and ZLS showed similar viability at 48 and 72 h. The distribution of values was similar in the three studied time lapses. PMMA showed the lowest viability during the three times evaluation points, which also increased over time.

Recently, Atay et al. sought to define a classification where a cell viability above 90% infers the material is not cytotoxic, values between 60–90% are considered slightly cytotoxic, values of 30–59% are moderately cytotoxic, and those below 30% are considered severely cytotoxic [17]. According to this classification, all materials should be considered as moderately cytotoxic at 24 h, all would be considered slightly cytotoxic at 48 h (except PMMA, which would remain moderately cytotoxic), and ZLS and PMMA should be considered as slightly cytotoxic at 72 h. After three days, LS₂ and Y-TZP should be considered as not cytotoxic. In Atay et al., the cytotoxic evaluation of different CAD/CAM materials was performed using extracts from the culture medium and not by direct contact, so this should be considered.

Lithium disilicate and zirconia are two widely used materials in dentistry because of their good optical and mechanical properties. However, LS₂ cytotoxicity remains unclear according to the conditions of the study. Some publications have reported the cytotoxicity of this material [24,61], and there is no clear consensus when comparing lithium disilicate and zirconia. A key factor could be the type of cells seeded on the surfaces. In some studies, LS₂ has been considered cytotoxic for HGFs, categorizing it as a second-class biomaterial [2,6,13,23,28]. In another study, it was observed—despite both materials being biocompatible—that proliferation and viability rates were higher in LS₂ for epithelial cells [62].

There are many studies comparing zirconia with titanium [49,50,63,64], but only a few have compared CAD/CAM-ceramics with CAD/CAM-polymers. Raffaelli et al. compared the response of rat immortalised fibroblasts to zirconia and feldspathic ceramics, and their findings suggested a better viability in zirconia. In that study, as in ours, they used polystyrene as a control. This material promotes growth and cell adhesion, which makes it widely used for *in vitro* assays [51]. Similar viability results were obtained in other studies when comparing CAD/CAM zirconia and LS₂ with feldspathic veneer ceramic, revealing a higher viability for the first two ceramic materials [13].

ZLS is a new material, and there are many publications about the product's mechanical properties but few about its biocompatibility. In 2017, Dal Pilva et al. conducted a similar study comparing ZLS and Y-TZP cytotoxicity at 24 h. They also reported severe cytotoxicity (<50% cell viability) at early contact [48].

We could only find one study that evaluated CAD/CAM all-ceramic materials and interim prosthesis materials in a proliferation assay. This study revealed a high cell viability (above 90%) for all materials at 24 and 72 h and on the seventh day. Nevertheless, the authors considered zirconia, LS₂, and Vita CAD-Temp materials as slightly cytotoxic at all incubation periods. This disparity between those results and ours could be explained by the fact that, in the mentioned study, the XTT viability assay was undertaken by an extract method, which could be a potential differentiating factor to consider [17].

One reason for this acute cytotoxicity in the first 24 h has been described by other authors: in the very first hours of the material immersion in the medium culture, ion leaching from ceramics can be expected. This phenomenon is responsible for cytotoxicity to a greater or lesser degree. In our experiment, the two main inorganic elements that are potentially released by LS₂ and ZLS are alumina and silicon, both of which are considered to have low cytotoxicity [65,66]. Some studies also blame this low viability on Zn, an LS₂ component considered by some as a cellular-viability suppressor or cytotoxicity increaser [24]. In the case of monolithic zirconia, the leaching elements could be zirconia, yttrium, silicon, and sodium. Nevertheless, polycrystalline ceramic is free from serious corrosion, and the cytotoxic potential of these elements is moderately low, according to the literature reviewed [66–69].

The most used dental interim materials are made with polymethyl methacrylate, polyethylene methacrylate, or bis-acryl resins. The polymerisation process of these materials produces by-products and unreacted monomers (polymerisation shrinkage) that can be noxious to gingival tissues. When these materials are commercialised in CAD/CAM blocks, they are pre-polymerised, reducing the harmful effects [17,39,45]. However, an incomplete pre-polymerisation may cause the leaching of some of the components of these resin materials [17,70]. The oral environment can lead to the materials' biodegradation, leaching potentially toxic agents (monomers, in most cases) that affect cells and tissues [39,71]. Degradation takes place as a result of multiple factors (e.g., saliva, bacteria colony, and mastication) [71]. Saliva is fundamentally composed of water, whose molecules can enter the polymers' structure and give rise to monomer and additive diffusion [17,70,71]. This phenomenon can occur in *in vitro* conditions as well, due to the aqueous base of the culture medium that can generate similar consequences as those of saliva [71].

Shim et al. compared some provisional materials in relation to the cytotoxic effect of HGFs, and they concluded PMMA and bis-acryl (viability >80%) have much better effects with fibroblasts than poly(ethyl methacrylate). However, Atay et al. considered Vita CAD-Temp to be slightly cytotoxic.

Our PMMA results can be explained if we consider that this is not a definitive material. This polymer can be used as a long-term provisional material, lasting up to two years according to the manufacturer. We cannot expect this polymer to exhibit definitive material behaviour because this kind of product is commercialised with the purpose of conforming the gingival tissue before the definitive material is placed, and also to protect the peri-implant space [38,42]. However, it should be easily removed by a professional without producing a new soft-tissue regenerating period.

In accordance with the obtained results, it cannot be said that these materials are totally inert; nevertheless, the cytotoxic values after 72 h are within the biocompatibility range for clinical use, as other authors have claimed [17,72,73].

After the placement of an implant abutment during the second-stage surgery, the wound must heal through the migration of fibroblasts and the formation of a collagen matrix [55]. To achieve the successful integration of a ceramic material, cells must colonise the surface, and elements of the extracellular matrix (ECM) must be remodelled, such as collagen, which plays an important role in cell adhesion to a surface [13,74].

Many of the published studies measure collagen mRNA expression, along with other cellular adhesion proteins, through reverse transcription polymerase chain reaction (PCR) assays. In these cases, collagen type I mRNA is isolated and extracted from HGFs, cultured on different study materials, and converted to cDNA [50,56,63]. Nevertheless, few publications have evaluated the collagen secretion on ceramic material through enzyme-linked immunoabsorption assays.

Fibroblasts are continually remodelling their ECM conformation because they adhere to a surface. These adjustments are done through the synthesis and proteolysis of the components. In our study, collagen type I secretion to the culture medium was determined in order to evaluate the correct function of fibroblasts. After 24 h, LS₂ was the surface with the highest level of collagen secretion, with statistically significant differences observed between all groups ($p < 0.01$), except in ZLS, Y-TZP, and PMMA, which showed similar values ($p > 0.05$). Collagen secretion decreased sharply for all groups at 72 h, and again, LS₂ was the surface with the highest value ($p < 0.01$). At this time evaluation point, there were no significant differences in ZLS, PMMA, and the polystyrene control group. The reason for this drastic secretion decrease has been explained by other publications [13,63].

Tetè et al. compared collagen type I secretion by HGFs at 24 and 72 h on different polished and unpolished ceramic surfaces and a polystyrene control. At 24 h, no significant differences were observed for polished or unpolished zirconia and glazed feldspathic surfaces; however, secretion levels on a polished LS₂ surface were statistically lower. At 72 h, a sharp decrease was detected in all groups and was statistically significant for both polished zirconia and LS₂ surfaces [13]. The control surface revealed the lowest secretion levels at both time evaluation points. Some researchers have attributed this to the maximum proliferation levels on polystyrene surfaces at the expense of the synthesis and assembling of the ECM components [75]. They stated that, in normal *in vivo* conditions, cells show a minimum proliferation rate and high collagen secretion levels, but in *in vitro* conditions, cellular behaviour is different. In the first hours of *in vitro* testing, cells showed a greater tendency to secrete collagen to enhance adhesion to the substrate and later on stimulating their proliferation. This could explain why collagen secretion sharply decreases beyond 72 h after cells adhere [13]. When cellular confluence is reached, proliferation stops by inhibition contact, and collagen secretion also decreases drastically after cells anchor to the surface [63].

The low values obtained in our results are due to another cause: collagen secretion differs depending on the type of fibroblast. Gingival fibroblasts express less collagen and present a different ECM organisation regarding periodontal ligament fibroblasts because HGFs have a lower expression of $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 10\beta 1$ integrins [76–79].

More research is needed to analyse the possible relationship between surface, material type, cell proliferation, and ECM protein secretions, such as collagen. In *in vitro* studies, factors such as the percentage of supplemented FBS, pH, or the composition of the culture medium are additional variables that can influence the collagen levels secreted by cells [79]. Assays should be undertaken under ISO standards in order to be reproducible and make objective comparisons of the results [6,9,80].

5. Conclusions

According to the results obtained and the limitations of the present *in vitro* study, it may be concluded that ceramic materials—more precisely, lithium disilicate—revealed better cell responses than polymers in terms of cell viability and collagen type I secretion. Regarding direct-contact cytotoxicity, a linear effect of time and type of material was observed with decreased cytotoxicity over time ($p < 0.05$). At 72 h, all groups reached biologically acceptable levels. Lithium disilicate showed the highest levels of collagen type I both at 24 and 72 h. The secretion levels were sharply reduced in all groups at 72 h ($p < 0.01$). Polymers showed poor results on both types of experiments. Nevertheless, further studies are needed to consolidate these findings and thus extrapolate the results into clinical practice.

Author Contributions: Conceptualization, Maria Rizo-Gorrita, Cristina Herraéz-Galindo, Daniel Torres-Lagares and Jose-Luis Gutiérrez-Perez; formal analysis, Maria Rizo-Gorrita and Cristina Herraéz-Galindo; investigation, Maria Rizo-Gorrita and Cristina Herraéz-Galindo; methodology, Maria-Angeles Serrera-Figallo; project administration, Jose-Luis Gutiérrez-Perez; supervision, Daniel Torres-Lagares, Maria-Angeles Serrera-Figallo and Jose-Luis Gutiérrez-Perez; Validation, Daniel Torres-Lagares; writing—original draft, Maria Rizo-Gorrita, Cristina Herraéz-Galindo and Maria-Angeles Serrera-Figallo; writing—review & editing, Maria Rizo-Gorrita, Cristina Herraéz-Galindo, Daniel Torres-Lagares, Maria-Angeles Serrera-Figallo and Jose-Luis Gutiérrez-Perez. **Funding:** This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors gratefully thank the Biology and Microscopy Departments from the Centre of Investigation, Technology and Innovation from Seville University (CITIUS) for their support and experimental assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Grenade, C.; De Pauw-Gillet, M.-C.; Pirard, C.; Bertrand, V.; Charlier, C.; Vanheusden, A.; Mainjot, A. Biocompatibility of polymer-infiltrated-ceramic-network (PICN) materials with Human Gingival Keratinocytes (HGKs). *Dent. Mater.* **2017**, *33*, 333–343, doi:10.1016/j.dental.2017.01.001.
- Pabst, A.M.; Walter, C.; Grassmann, L.; Weyhrauch, M.; Brüllmann, D.D.; Ziebart, T.; Scheller, H.; Lehmann, K.M. Influence of CAD/CAM all-ceramic materials on cell viability, migration ability and adenylate kinase release of human gingival fibroblasts and oral keratinocytes. *Clin. Oral Investig.* **2014**, *18*, 1111–1118, doi:10.1007/s00784-013-1098-9.
- Herráez-Galindo, C.; Rizo-Gorrita, M.; Luna-Oliva, I.; Serrera-Figallo, M.Á.; Castillo-Oyagüe, R.; TorresLagares, D. In vitro Comparative Study of Fibroblastic Behaviour of Polymethacrylate (PMMA) and Lithium Disilicate Polymer Surfaces. *Polymers* **2019**, *11*, 744, doi:10.3390/polym11040744.
- Rizo-Gorrita, M.; Luna-Oliva, I.; Serrera-Figallo, M.Á.; Gutiérrez-Pérez, J.L.; Torres-Lagares, D. Comparison of Cytomorphometry and Early Cell Response of Human Gingival Fibroblast (HGFs) between Zirconium and New Zirconia-Reinforced Lithium Silicate Ceramics (ZLS). *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2718, doi:10.3390/ijms19092718.
- Mehl, C.; Kern, M.; Schütte, A.M.; Kadem, L.F.; Selhuber-Unkel, C. Adhesion of living cells to abutment materials, dentin, and adhesive luting cement with different surface qualities. *Dent. Mater.* **2016**, *32*, 1524–1535, doi:10.1016/j.dental.2016.09.006.
- Grenade, C.; de Pauw-Gillet, M.C.; Gailly, P.; Vanheusden, A.; Mainjot, A. Biocompatibility of polymerinfiltrated- ceramic-network (PICN) materials with Human Gingival Fibroblasts (HGFs). *Dent. Mater.* **2016**, *32*, 1152–1164, doi:10.1016/j.dental.2016.06.020.
- Nothdurft, F.P.; Fontana, D.; Ruppenthal, S.; May, A.; Aktas, C.; 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.* **2015**, *17*, 1237–1249, doi:10.1111/cid.12253.
- D’Addona, A.; Ghassemian, M.; Raffaelli, L.; Manicone, P.F. Soft and hard tissue management in implant therapy-part I: Surgical concepts. *Int. J. Biomater.* **2012**, *2012*, 531202, doi:10.1155/2012/531202.
- Fischer, N.G.; Wong, J.; Baruth, A.; Cerutis, D.R. Effect of Clinically Relevant CAD/CAM Zirconia Polishing on Gingival Fibroblast Proliferation and Focal Adhesions. *Materials* **2017**, *10*, 1358, doi:10.3390/ma10121358.
- Miyazaki, T.; Nakamura, T.; Matsumura, H.; Ban, S.; Kobayashi, T. Current status of zirconia restoration. *J. Prosthodont. Res.* **2013**, *57*, 236–261, doi:10.1016/j.jpor.2013.09.001.
- Elshahawy, W.; Shohieb, F.; Yehia, H.; Etman, W.; Watanabe, I.; Kramer, P. Cytotoxic effect of elements released clinically from gold and CAD-CAM fabricated ceramic crowns. *Tanta Dent. J.* **2014**, *11*, 189–193.
- Srinivasan, M.; Gjengedal, H.; Cattani-Lorente, M.; Moussa, M.; Durual, S.; Schimmel, M.; Müller, F. CAD/CAM milled complete removable dental prostheses: An in vitro evaluation of biocompatibility, mechanical properties, and surface roughness. *Dent. Mater. J.* **2018**, doi:10.4012/dmj.2017-207.
- Tetè, S.; Zizzari, V.L.; Borelli, B.; De Colli, M.; Zara, S.; Sorrentino, R.; Scarano, A.; Gherlone, E.; Cataldi, A.; Zarone, F. Proliferation and adhesion capability of human gingival fibroblasts onto zirconia, lithium disilicate and feldspathic veneering ceramic in vitro. *Dent. Mater. J.* **2014**, *33*, 7–15.
- Awada, A.; Nathanson, D. Mechanical properties of resin-ceramic CAD/CAM restorative materials. *J. Prosthet. Dent.* **2015**, *114*, 587–593, doi:10.1016/j.prosdent.2015.04.016.
- Zarone, F.; Ferrari, M.; Mangano, F.G.; Leone, R.; Sorrentino, R. “Digitally Oriented Materials”: Focus on Lithium Disilicate Ceramics. *Int. J. Dent.* **2016**, *2016*, 9840594, doi:10.1155/2016/9840594.
- Horvath, S.D. Key Parameters of Hybrid Materials for CAD/CAM-Based Restorative Dentistry. *Compend. Contin. Educ. Dent.* **2016**, *37*, 638–643.
- Atay, A.; Gürdal, I.; Çetintas, V.B.; Üşümez, A.; Cal, E. Effects of New Generation All-Ceramic and Provisional Materials on Fibroblast Cells. *J. Prosthodont.* **2018**, *28*, e383–e394.
- Chevalier, J. Critical effect of cubic phase on aging in 3mol% yttria-stabilized zirconia ceramics for hip replacement prosthesis. *Biomaterials* **2004**, *25*, 5539–5545, doi:10.1016/j.biomaterials.2004.01.002.
- Chevalier, J.; Gremillard, L.; Virkar, A.; Clarke, D.R. The Tetragonal-Monoclinic Transformation in Zirconia: Lessons Learned and Future Trends. *J. Am. Ceram. Soc.* **2009**, *92*, 1901–1920.

20. Kelly, J.R.; Denry, I. Stabilized zirconia as a structural ceramic: An overview. *Dent. Mater.* **2008**, *24*, 289–298, doi:10.1016/j.dental.2007.05.005.
21. Gupta, T.K.; Bechtold, J.H.; Kuznicki, R.C.; Cadoff, L.H.; Rossing, B.R. Stabilization of tetragonal phase in polycrystalline zirconia. *J. Mater. Sci.* **1977**, *12*, 2421.
22. El-Ghany, O.S.A.; Sherief, A.H. Zirconia based ceramics, some clinical and biological aspects: Review. *Futur. Dent. J.* **2016**, *2*, 55–64.
23. Willard, A.; Chu, T.M.G. The science and application of IPS e. Max dental ceramic. *Kaohsiung J. Med. Sci.* **2018**, *34*, 238–242, doi:10.1016/j.kjms.2018.01.012.
24. Brackett, M.G.; Lockwood, P.E.; Messer, R.L.; Lewis, J.B.; Bouillaguet, S.; Wataha, J.C. In vitro cytotoxic response to lithium disilicate dental ceramics. *Dent. Mater.* **2008**, *24*, 450–456, doi:10.1016/j.dental.2007.06.013.
25. Li, R.W.K.; Chow, T.W.; Matinlinna, J.P. Ceramic dental biomaterials and CAD/CAM technology: State of the art. *J. Prosthodont. Res.* **2014**, *58*, 208–216, doi:10.1016/j.jpor.2014.07.003.
26. Simba, B.G.; Ribeiro, M.V.; Suzuki, P.A.; Alves, M.F.R.P.; Strecker, K.; Santos, C.D. Mechanical properties of lithium metasilicate after short-term thermal treatments. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2019**, *98*, 179–186, doi:10.1016/j.jmbbm.2019.06.011.
27. Ortiz, A.L.; Borrero-López, O.; Guiberteau, F.; Zhang, Y. Microstructural development during heat treatment of a commercially available dental-grade lithium disilicate glass-ceramic. *Dent. Mater.* **2019**, *35*, 697–708, doi:10.1016/j.dental.2019.02.011.
28. Kilic, K.; Kesim, B.; Sumer, Z.; Polat, Z.; Kesim, S. In vitro cytotoxicity of all-ceramic substructural materials after aging. *J. Dent. Sci.* **2013**, *8*, 231–238.
29. Barone, S.; Freulon, A.; Malard, B.; Dehmas, M. Solid-state phase transformation in a lithium disilicatebased glass-ceramic. *J. Non-Crystalline Solids* **2019**, *513*, 9–14.
30. *IPS e.max® CAD Scientific Documentation*. Ivoclar Vivadent AG: Liechtenstein, France, 2017.
31. Silva, L.H.D.; Lima, E.; Miranda, R.B.P.; Favero, S.S.; Lohbauer, U.; Cesar, P.F. Dental ceramics: A review of new materials and processing methods. *Braz. Oral Res.* **2017**, *31*, 58, doi:10.1590/1807-3107BOR2017.vol31.0058.
32. Rinke, S.; Pabel, A.-K.; Rödiger, M.; Ziebolz, D. Chairside Fabrication of an All-Ceramic Partial Crown Using a Zirconia-Reinforced Lithium Silicate Ceramic. *Case Rep. Dent.* **2016**, *2016*, 1354186, doi:10.1155/2016/1354186.
33. Sieper, K.; Wille, S.; Kern, M. Fracture strength of lithium disilicate crowns compared to polymer-infiltrated ceramic-network and zirconia reinforced lithium silicate crowns. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2017**, *74*, 342–348, doi:10.1016/j.jmbbm.2017.06.025.
34. Lambert, H.; Durand, J.-C.; Jacquot, B.; Fages, M. Dental biomaterials for chairside CAD/CAM: State of the art. *J. Adv. Prosthodont.* **2017**, *9*, 486–495, doi:10.4047/jap.2017.9.6.486.
35. Elsaka, S.E.; Elnaghy, A.M. Mechanical properties of zirconia reinforced lithium silicate glass-ceramic. *Dent. Mater.* **2016**, *32*, 908–914, doi:10.1016/j.dental.2016.03.013.
36. Sen, N.; Us, Y.O. Mechanical and optical properties of monolithic CAD-CAM restorative materials. *J. Prosthet. Dent.* **2018**, *119*, 593–599, doi:10.1016/j.prosdent.2017.06.012.
37. *Celtra® Duo Zirconia-Reinforced Lithium Silicate (ZLS) Block*; Technical Monograph; Dentsply Sirona: HanauWolfgang, Germany, 2016.
38. Abdullah, A.O.; Pollington, S.; Liu, Y. Comparison between direct chairside and digitally fabricated temporary crowns. *Dent. Mater. J.* **2018**, *37*, 957–963, doi:10.4012/dmj.2017-315.
39. Yao, J.; Li, J.; Wang, Y.; Huang, H. Comparison of the flexural strength and marginal accuracy of traditional and CAD/CAM interim materials before and after thermal cycling. *J. Prosthet. Dent.* **2014**, *112*, 649–657, doi:10.1016/j.prosdent.2014.01.012.
40. Akin, H.; Tugut, F.; Polat, Z.A. In vitro comparison of the cytotoxicity and water sorption of two different denture base systems. *J. Prosthodont.* **2015**, *24*, 152–155, doi:10.1111/jopr.12162.
41. Salido, M.; Vilches, J.I.; Gutiérrez, J.L. Actin cytoskeletal organization in human osteoblasts grown on different dental titanium implant surfaces. *Histol. Histopathol.* **2007**, *22*, 1355–1364, doi:10.14670/HH-22.1355.
42. Alp, G.; Murat, S.; Yilmaz, B. Comparison of Flexural Strength of Different CAD/CAM PMMA-Based Polymers. *J. Prosthodont.* **2019**, *28*, e491–e495, doi:10.1111/jopr.12755.
43. Huettig, F.; Prutscher, A.; Goldammer, C.; Kreutzer, C.A.; Weber, H. First clinical experiences with CAD/CAM-fabricated PMMA-based fixed dental prostheses as long-term temporaries. *Clin. Oral Investig.* **2016**, *20*, 161–168, doi:10.1007/s00784-015-1475-7.

44. Lo Giudice, G.; Cicciù, M.; Cervino, G.; Lizio, A.; Visco, A.M. Flowable resin and marginal gap on tooth third medial cavity involving enamel and radicular cementum: A SEM evaluation of two restoration techniques. *Indian J. Dent. Res.* **2012**, *23*, 763–769, doi:10.4103/0970-9290.111256.
45. Shim, J.S.; Kim, H.C.; Park, S.I.; Yun, H.J.; Ryu, J.J. Comparison of Various Implant Provisional Resin Materials for Cytotoxicity and Attachment to Human Gingival Fibroblasts. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **2019**, *34*, 390–396, doi:10.11607/jomi.6707.
46. Joda, T.; Ferrari, M.; Braegger, U. A digital approach for one-step formation of the supra-implant emergence profile with an individualized CAD/CAM healing abutment. *J. Prosthodont. Res.* **2016**, *60*, 220–223, doi:10.1016/j.jpor.2016.01.005.
47. Özçelik, T.B.; Yilmaz, B.; Seker, E.; Shah, K. Marginal Adaptation of Provisional CAD/CAM Restorations Fabricated Using Various Simulated Digital Cement Space Settings. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **2018**, *33*, 1064–1069, doi:10.11607/jomi.6271.
48. Dal Piva, A.; Contreras, L.; Ribeiro, F.C.; Anami, L.C.; Camargo, S.; Jorge, A.; Bottino, M.A. Monolithic Ceramics: Effect of Finishing Techniques on Surface Properties, Bacterial Adhesion and Cell Viability. *Oper. Dent.* **2018**, *43*, 315–325, doi:10.2341/17-011-L.
49. Rutkunas, V.; Bukelskiene, V.; Sabaliauskas, V.; Balciunas, E.; Malinauskas, M.; Baltrikiene, D. Assessment of human gingival fibroblast interaction with dental implant abutment materials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2015**, *26*, 169, doi:10.1007/s10856-015-5481-8.
50. Pae, A.; Lee, H.; Kim, H.-S.; Kwon, Y.-D.; Woo, Y.-H. Attachment and growth behaviour of human gingival fibroblasts on titanium and zirconia ceramic surfaces. *Biomed. Mater.* **2009**, *4*, 25005, doi:10.1088/17486041/4/2/025005.
51. Raffaelli, L.; Iommetti, P.R.; Piccioni, E.; Toesca, A.; Serini, S.; Resci, F.; Missori, M.; De Spirito, M.; Manicone, P.F.; Calviello, G. Growth, viability, adhesion potential, and fibronectin expression in fibroblasts cultured on zirconia or feldspathic ceramics in vitro. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2008**, *86*, 959–968, doi:10.1002/jbm.a.31693.
52. International Standards Organization (ISO). *Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity*; 10993–5:2009; International Standards Organization: Geneva, Switzerland, 2009.
53. Elshahawy, W.M.; Watanabe, I.; Kramer, P. In vitro cytotoxicity evaluation of elemental ions released from different prosthodontic materials. *Dent. Mater.* **2009**, *25*, 1551–1555, doi:10.1016/j.dental.2009.07.008.
54. Roffel, S.; Wu, G.; Nedeljkovic, I.; Meyer, M.; Razafiarison, T.; Gibbs, S. Evaluation of a novel oral mucosa in vitro implantation model for analysis of molecular interactions with dental abutment surfaces. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* **2019**, *21* (Suppl. 1), 25–33, doi:10.1111/cid.12750.
55. Pabst, A.M.; Walter, C.; Bell, A.; Weyhrauch, M.; Schmidtman, I.; Scheller, H.; Lehmann, K.M. Influence of CAD/CAM zirconia for implant-abutment manufacturing on gingival fibroblasts and oral keratinocytes. *Clin. Oral Investig.* **2016**, *20*, 1101–1108, doi:10.1007/s00784-015-1598-x.
56. Kwon, Y.-D.; Choi, H.-J.; Lee, H.; Lee, J.-W.; Weber, H.-P.; Pae, A. Cellular viability and genetic expression of human gingival fibroblasts to zirconia with enamel matrix derivative (Emdogain®). *J. Adv. Prosthodont.* **2014**, *6*, 406–414, doi:10.4047/jap.2014.6.5.406.
57. Knetsh, L.W.M. Chapter 13: Evolution of Current and Future Concepts of Biocompatibility Testing. In: *Polymeric Biomaterials: Structure and Function*, 1st ed.; Dumitriu, S., Popa, V., Eds.; CRC Press: 2013; Volume 1, pp. 385–396.
58. Sjögren, G.; Sletten, G.; Dahl, J.E. Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by Millipore filter, agar overlay, and MTT tests. *J. Prosthet. Dent.* **2000**, *84*, 229–236.
59. Wataha, J.; Craig, R.; Hanks, C. Precision of and new methods for testing in vitro alloy cytotoxicity. *Dent. Mater.* **1992**, *8*, 65–70.
60. Imirzalioglu, P.; Alaaddinoglu, E.; Yilmaz, Z.; Oduncuoglu, B.; Yilmaz, B.; Rosenstiel, S. Influence of recasting different types of dental alloys on gingival fibroblast cytotoxicity. *J. Prosthet. Dent.* **2012**, *107*, 24–33, doi:10.1016/S0022-3913(12)60013-4.
61. Nakonieczny, D.S.; Ziębowicz, A.; Paszenda, Z.K.; Krawczyk, C. Trends and perspectives in modification of zirconium oxide for a dental prosthetic applications—A review. *Biocybern. Biomed. Eng.* **2017**, *37*, 229–245.
62. Forster, A.; Ungvári, K.; Györgyey, Á.; Kukovecz, Á.; Turzó, K.; Nagy, K. Human epithelial tissue culture study on restorative materials. *J. Dent.* **2014**, *42*, 7–14, doi:10.1016/j.jdent.2013.11.008.
63. Yamano, S.; Ma, A.K.-Y.; Shanti, R.M.; Kim, S.-W.; Wada, K.; Sukotjo, C. The influence of different implant materials on human gingival fibroblast morphology, proliferation, and gene expression. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **2011**, *26*, 1247–1255.
64. Cho, Y.D.; Shin, J.C.; Yoon, H.I.; Ku, Y.; Ryoo, H.M.; Kim, D.J.; Kim, D.G.; Han, J.S. Characterization of Human Gingival Fibroblasts on Zirconia Surfaces Containing Niobium Oxide. *Materials* **2015**, *8*, 6018–6028, doi:10.3390/ma8095288.

65. Elshahawy, W. Chapter 15: Biocompatibility. In *Advances in Ceramics Electric and Magnetic Ceramics, Bioceramics, Ceramics and Environment*, 1st eds.; InTech Open: London, UK, 2011; pp. 359–374.
66. Milleding, P.; Karlsson, S.; Nyborg, L. On the surface elemental composition of non-corroded and corroded dental ceramic materials in vitro. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2003**, *14*, 557–566.
67. Milleding, P.; Haraldsson, C.; Karlsson, S. Ion leaching from dental ceramics during static in vitro corrosion testing. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *61*, 541–550, doi:10.1002/jbm.10109.
68. Sulaiman, T.A.; Abdulmajeed, A.A.; Shahramian, K.; Hupa, L.; Donovan, T.E.; Vallittu, P.; Närhi, T.O. Impact of gastric acidic challenge on surface topography and optical properties of monolithic zirconia. *Dent. Mater.* **2015**, *31*, 1445–1452. doi 10.1016/j.dental.2015.09.010.
69. Seabra, A.B.; Durán, N. Nanotoxicology of Metal Oxide Nanoparticles. *Metals* **2015**, *5*, 934–975.
70. Van Landuyt, K.; Nawrot, T.; Gebelen, B.; De Munck, J.; Snauwaert, J.; Yoshihara, K.; Scheers, H.; Godderis, L.; Hoet, P.; Van Meerbeek, B. How much do resin-based dental materials release? A metaanalytical approach. *Dent. Mater.* **2011**, *27*, 723–747, doi:10.1016/j.dental.2011.05.001.
71. Ivković, N.; Božović, D.; Ristić, S.; Mirjanić, V.; Janković, O. The residual monomer in dental acrylic resin and its adverse effects. *Contemp. Mater.* **2013**, *1*, 84–91, doi:10.7251/COMEN1301084I.
72. Brunot-Gohin, C.; Duval, J.-L.; Verbeke, S.; Belanger, K.; Pezron, I.; Kugel, G.; Laurent-Maquin, D.; Gangloff, S.; Egles, C. Biocompatibility study of lithium disilicate and zirconium oxide ceramics for esthetic dental abutments. *J. Periodontal Implant. Sci.* **2016**, *46*, 362–371, doi:10.5051/jpis.2016.46.6.362.
73. Sun, T.; Liu, R.; Liu, X.; Feng, X.; Zhang, Y.; Lai, R. The Biocompatibility of Dental Graded Nano-GlassZirconia Material after Aging. *Nanoscale Res. Lett.* **2018**, *13*, 61, doi: 10.1186/s11671-018-2479-4.
74. Kramer, P.R.; Janikkeith, A.; Cai, Z.; Ma, S.; Watanabe, I. Integrin mediated attachment of periodontal ligament to titanium surfaces. *Dent. Mater.* **2009**, *25*, 877–883, doi:10.1016/j.dental.2009.01.095.
75. Iyer, P.; Walker, K.J.; Madihally, S.V. Increased matrix synthesis by fibroblasts with decreased proliferation on synthetic chitosan-gelatin porous structures. *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109*, 1314–1325, doi:10.1002/bit.24396.
76. Häkkinen, L.; Larjava, H.; Fournier, B.P. Distinct phenotype and therapeutic potential of gingival fibroblasts. *Cytotherapy* **2014**, *16*, 1171–1186, doi:10.1016/j.jcyt.2014.04.004.
77. Somerman, M.; Archer, S.; Imm, G.; Foster, R. A Comparative Study of Human Periodontal Ligament Cells and Gingival Fibroblasts in vitro. *J. Dent. Res.* **1988**, *67*, 66–70, doi:10.1177/00220345880670011301.
78. Palaiologou, A.A.; Yukna, R.A.; Moses, R.; Lallier, T.E. Gingival, dermal, and periodontal ligament fibroblasts express different extracellular matrix receptors. *J. Periodontol.* **2001**, *72*, 798–807, doi:10.1902/jop.2001.72.6.798.
79. Nor, N.H.M.; Berahim, Z.; Azlina, A.; Mokhtar, K.I.; Kannan, T.P. Identification and Characterization of Intraoral and Dermal Fibroblasts Revisited. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **2017**, *12*, 675–681, doi:10.2174/1574888X12666170929124621.
80. Kournetas, N.; Spintzyk, S.; Schweizer, E.; Sawada, T.; Said, F.; Schmid, P.; Geis-Gerstorfer, J.; Eliades, G.; Rupp, F. Comparative evaluation of topographical data of dental implant surfaces applying optical interferometry and scanning electron microscopy. *Dent. Mater.* **2017**, *33*, e317–e327, doi:10.1016/j.dental.2017.04.020.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).