

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR SOBRE LA NUEVA
GENERACIÓN DE MATERIALES DENTALES CAD/CAM.

TRABAJO *IN VITRO*

MARÍA CRISTINA HERRÁEZ GALINDO
SEVILLA, 2022

«La verdadera ciencia enseña, por encima de todo, a dudar y a ser ignorante»

(Miguel de Unamuno)

AGRADECIMIENTOS

Finalizar este proyecto profesional es para mí una gran alegría, y por ello quisiera agradecer el apoyo prestado a cada una de las personas que han participado de alguna u otra forma en hacerlo realidad:

A mis directores: el Prof. Daniel Torres Lagares, por su pasión, excelencia, dedicación y compromiso, le agradezco enormemente toda la ayuda y oportunidades que me ha brindado a lo largo de estos años; a la Dra. María Rizo Gorrita, por todo su apoyo y disponibilidad, especialmente en los duros momentos de experimentación en el laboratorio. A los dos, gracias.

Al personal del CITIUS y CSIC que ha colaborado en el desarrollo de esta Tesis Doctoral, especialmente a Modesto Carballo Álvarez, por su diligencia al resolver tantas dudas.

A mis amigos de siempre, por comprender mi ausencia, por animarme siempre y por ser esa familia que elegimos donde los logros de cada uno son los de todos.

A la familia CBS, por todo lo que he aprendido de vosotros y por las personas fantásticas con las que tengo la oportunidad de haberme cruzado. Destaco en este grupo a Andreína, mi buena amiga, por su optimismo, franqueza y por esos audiolibros con los que desconectar un poquito de todos los problemas.

A todas las buenas personas que me ha regalado la Odontología, tanto en el ámbito de la Facultad como en el laboral, sois joyitas con las que agradezco estar cada día (aunque a algunos los veo mucho menos de lo que me gustaría); con vosotros los días de trabajo sin duda se hacen infinitamente más amenos.

A mis padres, por la educación que me han dado. Sin vosotros no sería quien soy, gracias por confiar siempre en mí y ayudarme en todos los aspectos de mi vida. Ya sabéis, *vista, suerte y al toro*. Sois unos padres maravillosos y os quiero infinito.

A mi hermana, por estar siempre presente con una sonrisa, por su comprensión y apoyo, por su cariño, por ser mi pilar. Te quiero mucho. Y por supuesto también a Nando, por toda la ayuda de última hora.

Al resto de mi familia, especialmente a mis abuelos, de los que me siento muy orgullosa.

A mi Gor, por transmitirme tranquilidad y felicidad.

Y por último a Ángel, mi gran amor. Qué verdad eso que dices de que *siempre hace más frío justo antes de que amanezca*. Eres mi paz, mi sosiego y mi fuente de positividad. Gracias por tantísima ayuda, y por entender por lo que estaba pasando y tenderme la mano siempre que has podido. Ya sabes que ante todo lo que nos propongamos perseveraremos.

A mi abuelo Manolo,

ÍNDICE

GLOSARIO DE ABREVIATURAS, 12

RESUMEN-ABSTRACT, 16

1. INTRODUCCIÓN, 20

1.1. Sistemas CAD/CAM, 21

- 1.1.1. Introducción histórica, 21
 - A. Primeros escáneres, 22
- 1.1.2. Forma de trabajo, 26
- 1.1.3. Evolución hasta el sistema actual, 28
- 1.1.4. Ventajas y desventajas, 29

1.2. Materiales dentales, 29

- 1.2.1. Introducción histórica, 29
- 1.2.2. Clasificación, 30
 - A. Cerámicas, 30
 - B. Materiales poliméricos, 32
 - C. Composites, 32
- 1.2.3. Materiales dentales para CAD/CAM que serán analizados en el estudio, 33
 - A. IPS e.max CAD, 33
 - B. Vita CAD Temp, 34

1.3. Biocompatibilidad, 38

- 1.3.1. Estudios *in vitro* para analizar los materiales, 40

1.4. Tejido blando periimplantario, 41

- 1.4.1. Importancia del sellado periimplantario, 42
- 1.4.2. Composición del tejido blando periimplantario, 42
 - A. Partes del tejido blando, 42
 - B. Células que lo componen, 43
 - C. Diferencias entre el tejido periimplantario y el tejido peridental, 44
 - D. Proceso de cicatrización, 45
- 1.4.3. Fibroblastos gingivales, 46
 - A. Concepto, 46
 - B. Diferencias con fibroblastos periodontales, 47
- 1.4.4. Adhesión celular al substrato, 48
 - A. Concepto, 48
 - B. Partes implicadas en la adhesión, 48
 - C. Proceso de adhesión, 50

2. **JUSTIFICACIÓN, 53**
3. **OBJETIVOS, 56**
 - 3.1. Objetivo general, 57
 - 3.2. Objetivo específico, 57
4. **HIPÓTESIS, 59**
5. **MATERIAL Y MÉTODO, 61**
 - 5.1. Material, 62
 - 5.1.1. Discos de los materiales analizados en el estudio, 62
 - 5.1.2. Materiales empleados en el cultivo celular y el desarrollo de los estudios en el laboratorio de muestras, 62
 - 5.1.3. Materiales destinados a la visualización de las muestras y caracterización de las superficies, 63
 - 5.1.4. Materiales empleados para el estudio de citotoxicidad y secreción de colágeno, 63
 - 5.2. Método, 64
 - 5.2.1. Desarrollo y producción de los discos, 64
 - 5.2.2. Caracterización de las superficies, 67
 - A. Perfilometría, 67
 - B. Composición, 70
 - C. Morfología de las superficies de los discos, 72
 - D. Humectabilidad, 72
 - 5.2.3. Estudio visual, citomorfométrico y del cubrimiento de los discos cultivados, 75
 - A. Cultivo celular, 76
 - B. Siembra sobre los discos, 83
 - C. Tinción inmunohistoquímica: inmunofluorescencia directa, 84
 - D. Obtención de imágenes, 87
 - E. Análisis visual de las imágenes procesadas, 88
 - F. Procesamiento de las imágenes para análisis citomorfométrico, 89
 - 5.2.4. Estudio de la citotoxicidad del material, 92
 - A. Preparación de los discos, 93
 - B. Cultivo celular, 94
 - C. Técnica paso a paso, 95
 - D. Procesamiento de datos, 98
 - 5.2.5. Estudio de la secreción de colágeno tipo I, 99
 - A. Preparación de los discos, 101
 - B. Cultivo celular, 101
 - C. Técnica paso a paso, 103
 - D. Procesamiento de datos, 107
 - 5.2.6. Análisis estadístico, 108

6. RESULTADOS, 109

- 6.1. Caracterización de las superficies, 110
 - 6.1.1. Perfilometría, 110
 - 6.1.2. Composición, 113
 - 6.1.3. Morfología de las superficies de los discos, 114
 - 6.1.4. Humectabilidad, 116
- 6.2. Análisis visual, citomorfométrico y del cubrimiento de los discos cultivados, 119
 - 6.2.1. Análisis visual del anclaje celular de los materiales, 120
 - 6.2.2. Análisis citomorfométrico y del cubrimiento celular mediante ImageJ, 123
- 6.3. Análisis citotóxico de los materiales, 134
- 6.4. Análisis de las secreciones de colágeno tipo I sobre los materiales, 140

7. DISCUSIÓN, 144

- 7.1. Consideraciones previas, 145
- 7.2. Estudio directo sobre discos, 147
 - 7.2.1. Análisis de la composición de los materiales, 147
 - 7.2.2. Análisis de la morfología de los discos, 148
 - 7.2.3. Perfilometría, 149
 - 7.2.4. Humectabilidad, 150
- 7.3. Estudio de cultivo de fibroblastos gingivales humanos sobre discos, 153
 - 7.3.1. Tipo de célula utilizada, 153
 - 7.3.2. Estudio citomorfométrico, 153
 - 7.3.3. Estudio de toxicidad, 154
 - 7.3.4. Estudio de la secreción de colágeno tipo I, 156
- 7.4. Implicaciones de los resultados obtenidos, 157
- 7.5. Limitaciones halladas en el estudio, 158
- 7.6. Líneas futuras de investigación y repercusión clínica de los resultados obtenidos, 160

8. CONCLUSIONES, 163

- 8.1. Conclusiones específicas, 164
- 8.2. Conclusión general, 165

9. BIBLIOGRAFÍA, 166**ANEXOS, 186**

- I. Anexo I, 187
- II. Anexo II, 201
- III. Anexo III, 216

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Ac: Anticuerpo	DMEM: Medio de Dulbecco Modificado por Eagle (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
AFM: Microscopía de Fuerza Atómica	DMSO: Dimetil-sulfóxido
Ag: Antígeno	DPBS: Tampón fosfato salino de Dulbeccos (<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>)
ANOVA: Análisis de Varianza (<i>ANalysis Of VAriance</i>)	ECM/MEC: Matriz extracelular
BSA: Seroalbúmina bovina	EDS: Espectrómetro de energía dispersiva (<i>Energy Dispersive Spectrometer</i>)
C: Carbono	EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético (<i>Ethylene Diamine Triacetic Acid</i>)
CAD/ CAM: Diseño asistido por ordenador - Fabricación asistida por ordenador (<i>Computer-Aided Design/Computer-Aided Manufacturing</i>)	ELISA: Enzimoimmunoanálisis de Adsorción (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
CAM: Ángulo de contacto medio (<i>Mean Contact Angle</i>)	FG: Fibrinógeno
CITIUS: Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla	FN: Fibronectina
CNC: Control Numérico por Computadora	FSP-1: Proteína específica de fibroblastos (de sus siglas en inglés <i>Fibroblast Specific Protein</i>).
CO ₂ : Dióxido de carbono	H ₂ O ₂ : Peróxido de Hidrógeno
Col: Colágeno	HEPA: High Efficiency Particulate Air
COL1: Colágeno tipo 1	HGFs: fibroblastos humanos gingivales, de sus siglas en inglés <i>human gingival fibroblasts</i> .
CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Sevilla	H ₀ : Hipótesis nula
DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol	HRP: Horseradish Peroxidase
DIC: Contraste de interferencia diferencial (<i>Differential Interference Contrast</i>)	

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ICQ: Inmunocitoquímica	O: Oxígeno
IHQ: Inmunohistoquímica	OD: Densidad Óptica
ImageJ: Image Processing and Analysis in Java	OH: Hidroxilo
ISO: Organización Internacional para la Estandarización (<i>International Organization for Standardization</i>)	PEEK: Poliéter Éter Cetona
IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada	PEKK: Polieterquetoncetona
K: Potasio	PFA: Paraformaldehido
Kv: Kilovoltio	PMMA: Poli(metil-metacrilato)
Li: Litio	Ra: Rugosidad de la media aritmética
LS ₂ : Disilicato de Litio (<i>Lithium Disilicate</i>)	RCF: Fuerza centrífuga relativa (<i>Relative Centrifugal Field</i>)
MAA: Metil éster del ácido de metacrilato	RDI (o ROI de sus siglas en inglés <i>Region Of Interest</i>): Región De Interés
MEB: Microscopio Electrónico de Barrido	RGB: Rojo verde azul (<i>Red Green Blue</i>)
MEM: Medio Esencial Mínimo (<i>Modified Eagle's Medium</i>)	RGD: Ácido arginilglicilaspartico
mL: Mililitro	rpm: Revoluciones por minuto
MMA: Metil-metacrilato	Sa: Rugosidad media
mN/m: Milinewton por metro	SDH: Deshidrogenasa succinato
MPa: Megapascal	SE: Electrón secundario (<i>Secondary Electron</i>)
MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio	SEM: Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo
MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol	SFB: Suero Fetal Bovino
Ng: Nanogramo	SFE: Eneergía Libre de Superficie (<i>Surface Free Energy</i>)
Nm: Nanómetros	SLA: Estereolitografía
	SLS: Sinterizado selectivo mediante láser

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

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

TIFF: Tagged Image File Format

TMB: 3,3',5,5'-tetra-metil-benzidina

UV: Ultravioleta

UV-C: Rayos ultravioletas tipo C

VA: Voltiamperio

VN: Vitronectina

wt %: Porcentaje de contenido de masa (*weight percentage*)

XTT: 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida

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

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

μm : Micra

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

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

RESUMEN

- **Introducción:** La implantología moderna ha evolucionado a grandes pasos durante los últimos años, dando un vuelco al concepto de éxito sobre implantes. Cada vez cobran una mayor importancia los tejidos blandos y su mantenimiento. Muchos son los pacientes que requieren una solución estética en poco tiempo, algo que podemos conseguir gracias a los sistemas CAD/CAM. El Vita CAD-Temp® (PMMA) y el IPS e.max® CAD (LS₂) son ambos materiales fresados a través de este sistema.
- **Objetivos:** Comparar PMMA y LS₂ a nivel del comportamiento de fibroblastos gingivales humanos (HGFs) al crecer en contacto con estas superficies (proliferación, crecimiento, morfología y secreciones de colágeno tipo 1), así como valorar su nivel de citotoxicidad.
- **Hipótesis:** La hipótesis nula afirma que ambos grupos de estudio presentan el mismo comportamiento fibroblástico temprano al contactar con sus superficies. Además de esperar obtener valores de humectabilidad, citotoxicidad y producción de colágeno semejantes sobre ambas superficies.
- **Material y Método:** Se realizó un estudio *in vitro* comparativo utilizando discos de ambos materiales en los que fueron cultivados HGFs. Tras su procesamiento fueron analizados distintos parámetros celulares a las 24 horas de la siembra, así como el estudio de la superficie de los discos (perfilometría) junto a su composición y humectabilidad. Además, se llevó a cabo el estudio de citotoxicidad en tres etapas celulares (24, 48 y 72 horas) y de producción de COL1 (a las 24 y 72 horas).
- **Resultados:** Los valores obtenidos fueron recopilados y analizados estadísticamente, hallando resultados semejantes en la práctica totalidad de los valores citomorfométricos analizados a excepción de la longitud del citoesqueleto y la redondez (ambos mayores en el PMMA).

La viabilidad de ambos materiales fue creciendo exponencialmente con el paso del tiempo, obteniéndose a las 72 horas los valores más altos (sin diferencias significativas entre grupos), siendo en ambos materiales >85%. Finalmente, la secreción de COL1 se vio reducida en el rango de 72 horas, obteniéndose diferencias significativas entre grupos.
- **Conclusiones:** La hipótesis nula fue rechazada, ya que se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas a nivel de crecimiento (mayor

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- expansión del citoesqueleto sobre PMMA), citotoxicidad (superior en el PMMA) y secreción de COL1 (superior al contacto con LS₂). Serán necesarios estudios complementarios que nos ayuden a concretar la información obtenida y extrapolarla a la práctica clínica.
- **Palabras clave:** fibroblasto gingival humano, disilicato de litio, pol(metilmetacrilato), pilar transepitelial, viabilidad.

ABSTRACT

- **Introduction:** Modern implantology has greatly evolved in recent years, redefining the concept of success on implants. Soft tissues and their maintenance are becoming increasingly important. There are many patients who require an aesthetic solution in a short time, achievable thanks to CAD/CAM systems. Vita CAD-Temp® (PMMA) and IPS e.max® CAD (LS₂) are both materials milled through this system.
- **Aim:** Comparing the behavior of human gingival fibroblasts (HGFs) when growing in contact with PMMA and LS₂ (proliferation, growth, morphology and secretions of type 1 collagen), as well as measuring up their level of cytotoxicity.
- **Hypothesis:** The null hypothesis states that both study groups present the same early fibroblastic behavior when in contact with their surfaces, also expecting to obtain similar wettability, cytotoxicity and collagen production values on both surfaces.
- **Material and Methods:** A comparative *in vitro* study was carried out using discs of both materials in which HGFs were cultured. After processing, different cellular parameters were analyzed 24 hours after seeding, as well as the study of the surface of the discs (profilometry) together with their composition and wettability. In addition, the cytotoxicity study was carried out in three cell stages (24, 48 and 72 hours) and of COL1 production (at 24 and 72 hours).
- **Results:** The values obtained were compiled and statistically analyzed, finding similar results in virtually all the cytomorphometric values analyzed, except for the length of the cytoskeleton and roundness (both greater in the PMMA).

The viability of both materials grew exponentially over time, obtaining the highest values (more than 85 % in both materials) at 72 hours, with no significant differences between groups. Finally, the secretion of COL1 was reduced in the 72 hours range, obtaining significant differences between groups.

- **Conclusions:** The null hypothesis was rejected, since statistically significant differences were obtained at the growth level (greater expansion of the cytoskeleton on PMMA), cytotoxicity (higher on PMMA) and COL1 secretion (higher on contact with LS₂).

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Complementary studies will be necessary to help us specify the information obtained and extrapolate it to clinical practice.

- **Key words:** human gingival fibroblasts, lithium disilicate, polymethyl methacrylate, dental implant abutment, viability.

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Sistema CAD/CAM.

La prostodoncia es la rama de la Odontología especializada en el diagnóstico, plan de tratamiento, rehabilitación y mantenimiento de la función oral, el confort, la apariencia y la salud de los pacientes en condiciones asociadas a la ausencia de un diente y/o de los tejidos orales. Para ello se requiere un sustituto que sea duradero, seguro, cómodo y estético [1]. Esta necesidad llevó al desarrollo del sistema CAD/CAM (Computer-Aided Design/Computer-Aided Manufacturing), el cual permite reducir el tiempo de sillón del paciente, lo que aumenta su confort, además de lograr grandes resultados estéticos con materiales como los que veremos más adelante [2].

1.1.1. Introducción histórica.

En 1972 [3,4] François Duret registró una patente que venía como consecuencia del tema de su Tesis Doctoral (“*le rayon laser en dentisterie et prothèse*”). Este fue el comienzo de la impresión óptica, que creó la posibilidad de diseño y fabricación computarizada de la prótesis [3] con el que diseñó el sistema Sopher®, patentado en 1992 (Sopher Bioconcept S.A., Vienne, Francia) [5,6].

Esto supuso una revolución, ya que el método clásico de impresiones, diseño en cera y posterior confección de la prótesis que aparece en el diagrama siguiente (Fig. 1) podía quedar relegado.

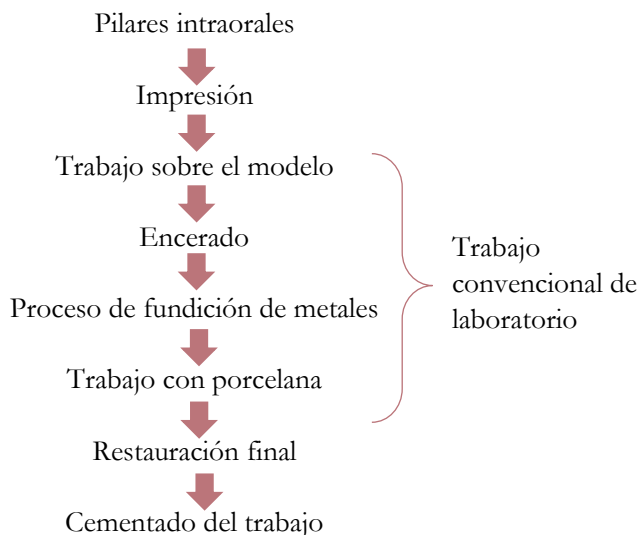


Figura 1: Diagrama representativo del flujo tradicional de trabajo en clínica y laboratorio dental.
Figura basada en el trabajo de Miyazaki y cols [7].

Después de eso Werner Mörmann y Marco Brandestini desarrollaron el primer sistema comercial, al que denominaron CEREC® (Sirona Dental Systems Inc., Alemania) por sus siglas en inglés “*Chairside Economical Restoration of Esthetic Ceramics*” [3,5,8]. A este sistema le siguió el del Dr. Andersson en los años ochenta, al que denominó Procera® (Portland, Oregon, Estados Unidos), que fue el primer sistema en que se empezaron a producir elementos no metálicos para aportar mayor estética [3,5,9].

A. Primeros escáneres.

Los primeros escáneres difieren un tanto de la concepción actual del sistema, ya que con los años ha ido evolucionando. Podemos hablar de cuatro generaciones de CAD/CAM [7]:

- Primera generación: esta primera generación fue la que introdujeron Duret y su equipo. En este primer formato se realizaba una impresión digital óptica para luego realizar un modelo y encerado digital (CAD) para un posterior maquinado y fresado numéricamente controlado por ordenador (CAM) (Fig.2).

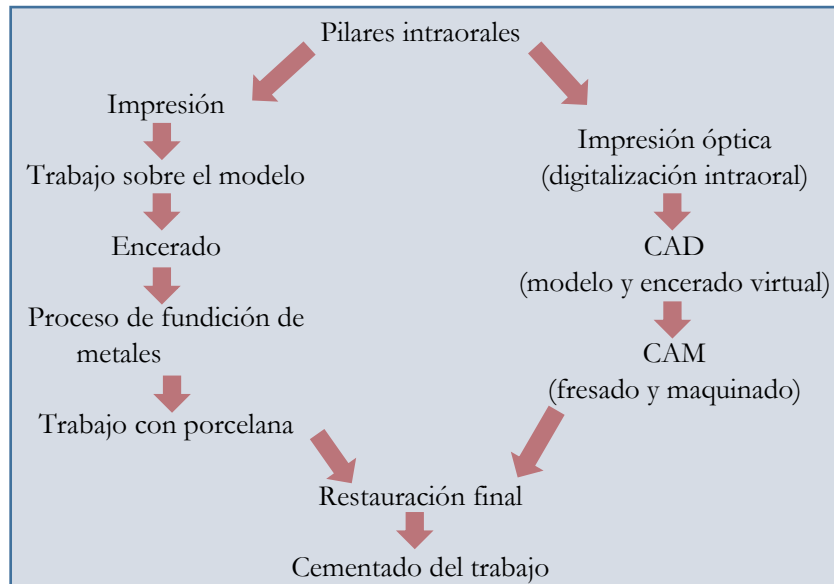


Figura 2: Diagrama representativo del flujo de trabajo del sistema CAD/CAM de primera generación propuesto por Duret y su equipo. Figura basada en el trabajo de Miyazaki y cols [7].

- Segunda generación: las fases planteadas en la primera generación se comenzaron a combinar en cualquier momento con las convencionales, ya que en esta época el sistema aún no era muy fidedigno, por lo que la adaptación de las rehabilitaciones de más de un diente no resultaba posible (Fig. 3).

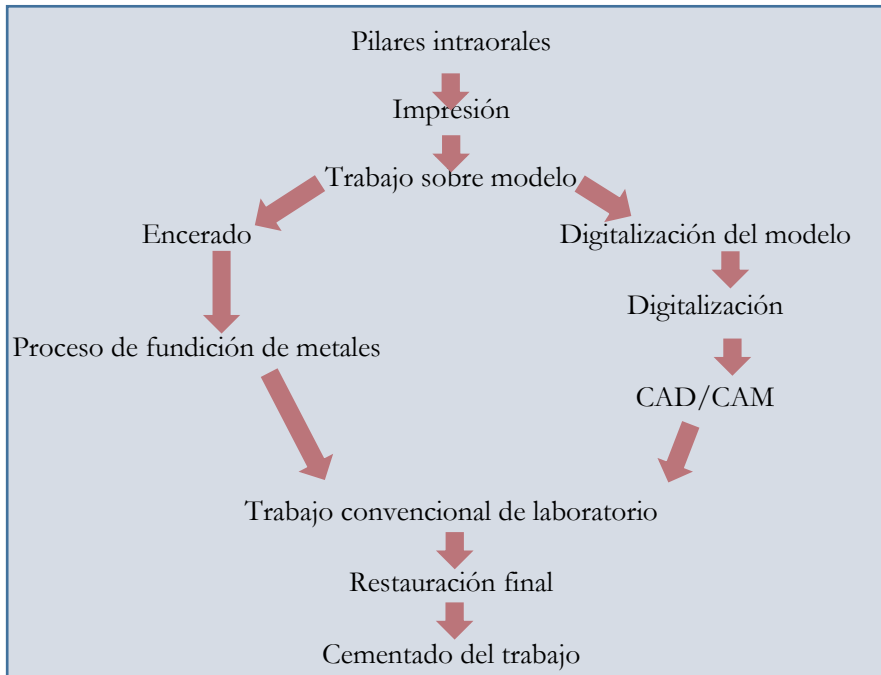


Figura 3: Diagrama representativo del flujo de trabajo del sistema CAD/CAM de segunda generación como parte del trabajo de laboratorio dental. Figura basada en el trabajo de Miyazaki y cols [7].

- **Tercera generación:** la dificultad para digitalizar los copings de impresión o pilares de dientes tallados llevó a los clínicos a realizar un modelo convencional en escayola que luego era digitalizado directamente o modelado y digitalizado. Este modelo de trabajo se sigue llevando a cabo hoy día en muchas clínicas donde no cuentan con escáneres intraorales (Fig. 4).

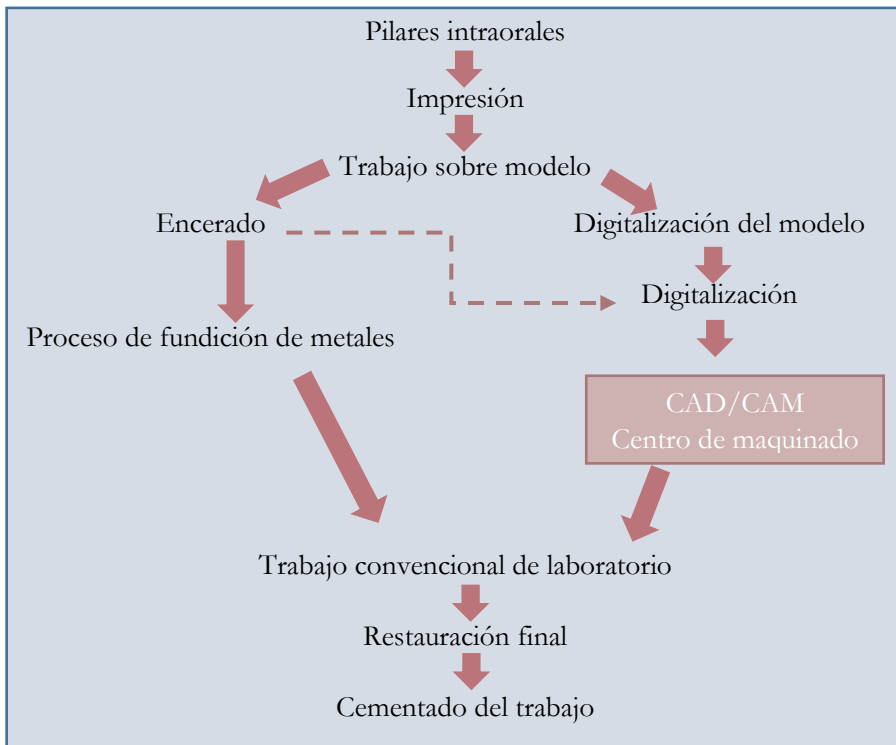


Figura 4: Diagrama representativo del flujo de trabajo del sistema CAD/CAM de tercera generación usando centro de fresado. Figura basada en el trabajo de Miyazaki y cols [7].

- Cuarta generación: las alergias a metales y el encarecimiento del oro dio lugar a que Andersson y colaboradores comenzaran a realizar copings de titanio, lo que promovió grandes avances en el sistema CAD/CAM. empezaron a incorporarse también algunas cerámicas que se unían a la estructura de titanio, obteniendo los primeros resultados estéticos (Fig. 5).

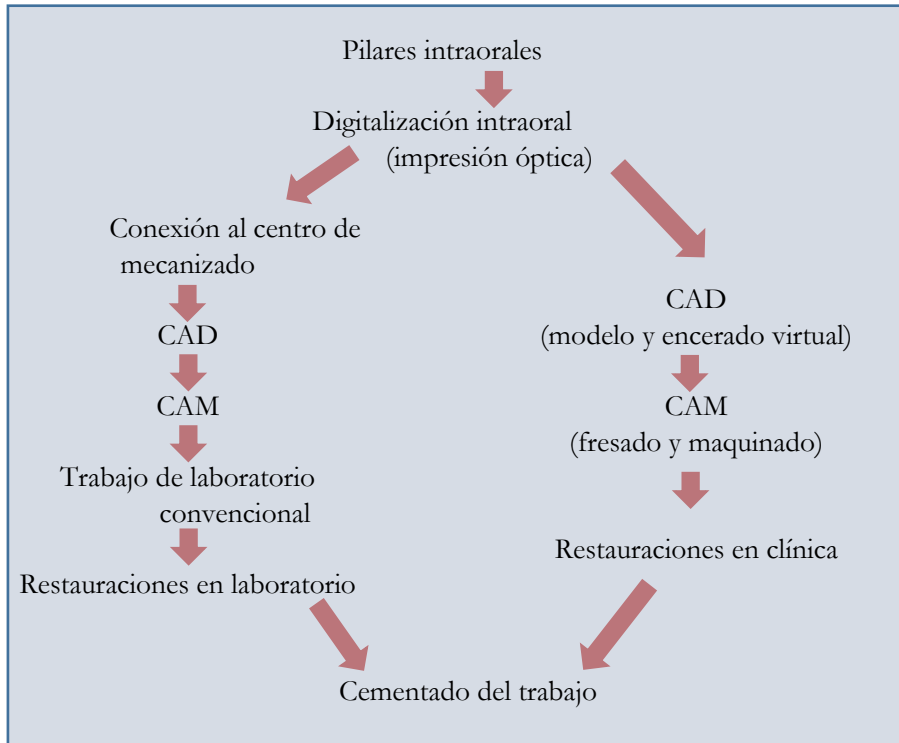


Figura 5: Diagrama representativo del flujo de trabajo del sistema CAD/CAM de cuarta generación usando un digitalizador intraoral. Figura basada en el trabajo de Miyazaki y cols [7].

1.1.2. Forma de trabajo.

Este sistema se divide en tres partes: en una primera una unidad de adquisición de datos consigue convertir toda esa información en una impresión virtual, la segunda consiste en el diseño y computación de los parámetros de fresado a través de un trabajo virtual con un software de diseño. Finalmente, el tercer paso consiste en el fresado de las piezas [10].

La tendencia actual es ir acercándose cada vez más al sistema completamente digital, de tal forma que en un primer momento se toma una impresión con un escáner intraoral y directamente se envía el archivo STL al laboratorio, para el posterior diseño y confección de la pieza o pilar a desarrollar [10].

Sin embargo, en muchas ocasiones, debido a escáneres intraorales más antiguo o porque no se cuenta con este dispositivo, se siguen realizando técnicas combinadas donde las impresiones son tomadas de manera convencional, para luego escanear las impresiones en el laboratorio y seguir el proceso (técnica *all lab*)

INTRODUCCIÓN

o bien positivar y articular los modelos que luego son digitalizados en el laboratorio (técnica de escáner de impresión) [3].

Todas estas opciones explicadas utilizan la llamada “técnica substractiva”, consistente en el fresado de un bloque sólido de material restaurador. Para lograr esto, la información obtenida mediante el CAM es transmitida al CAD en formato preparado para una maquinado controlado mediante sistema CNC (control numérico por computadora). Esto logra que, con la mínima intervención humana (lo que elimina errores y logra sistematizar los procesos), se consiga una preparación tridimensional. De esta forma se consiguen resultados más precisos, aunque debe ser exhaustiva toda la evolución para impedir la aparición de errores acumulados [1].

Otra técnica introducida hace relativamente poco tiempo es la aditiva, mediante la cual, una vez finalizado el diseño CAD, este es segmentado en múltiples capas que la maquinaria es capaz de ir reproduciendo mediante el añadido de material hasta conseguir el resultado final.

Dentro de este grupo podemos distinguir varios sistemas, donde destacamos:

- Sinterizado selectivo mediante láser (SLS): este método se utiliza para confeccionar piezas metálicas como las coronas. Consiste en producir un modelo 3D mediante el sinterizado o derretido del polvo de metal a través de un láser.
- Estereolitografía (SLA): este proceso consiste el paso de un foco de luz ultravioleta sobre una piscina de polímero líquido, de manera que se van generando capa a capa los distintos materiales. Una de sus indicaciones es la confección de guías quirúrgicas.
- Impresiones 3D: se extruye material desde una boquilla y pronto se va solidificando hasta lograr la impresión completa. Se pueden utilizar materiales termoplásticos como las resinas o las ceras, los cuales son calentados y se van condensando dando la forma. Algunas indicaciones son: modelos, prótesis acrílicas o frascos de cultivo.

Un diagrama resumen de los tres procesos presentados se muestra en la siguiente Figura 6.

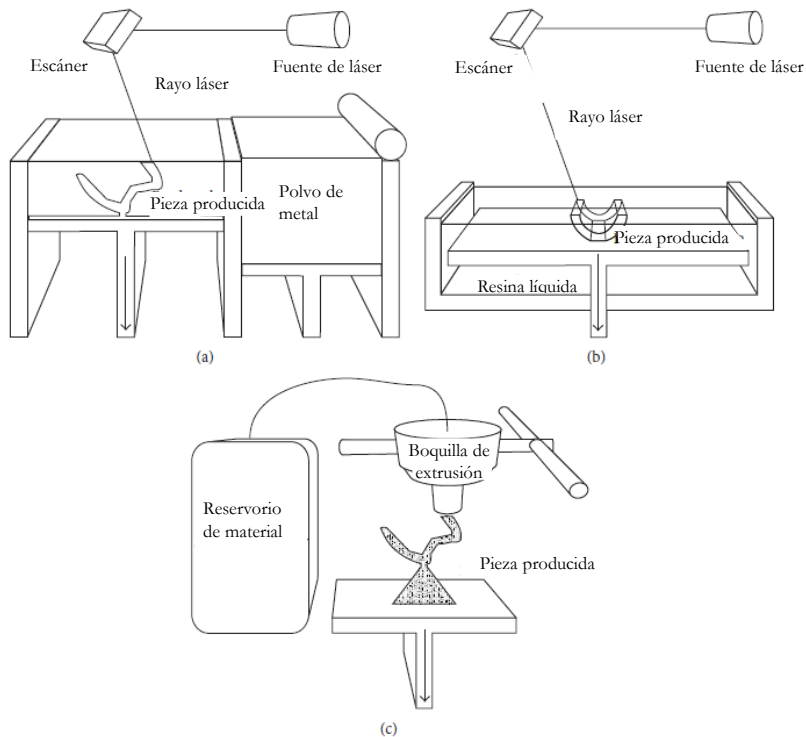


Figura 6: Diagrama esquemático de diferentes técnicas aditivas. (a) Sinterizado selectivo mediante láser, (b) estereolitografía y (c) impresión 3D. Las flechas indican la dirección de movimiento de las plataformas. Figura tomada del trabajo de Abduo y cols [1].

1.1.3. Evolución hasta el sistema actual.

Hoy día este tipo de sistemas ha evolucionado a pasos agigantados desde el primer modelo presentado por Duret que hemos mostrado anteriormente en este texto. La revolución digital logra cada día solventar casos más complejos, siendo la tendencia actual la de prescindir de la mayoría de elementos analógicos como el articulador.

Cada vez son más los clínicos que se decantan por comenzar el proceso desde el escaneo intraoral en clínica, envío de archivos STL hasta el diseño y fresado total del trabajo planteado en laboratorio. Esta forma de trabajo se ha convertido en un método dinámico, que, sin embargo, sigue teniendo hoy día algunas limitaciones a nivel de escaneo intraoral. Por el contrario, la parte de diseño y fresado (en la que se centrará nuestro proyecto) es la que menos limitaciones encuentra [11,12].

1.1.4. Ventajas y desventajas.

A. Ventajas [1,3,10]:

- Elimina muchos errores acumulativos producidos mediante el sistema tradicional de diseño de cera e impresión analógica.
- El modelaje y la producción están automatizados, por lo que se reducen tiempo y costes de fabricación.
- Incorporación de nuevos materiales protésicos gracias al sistema, mejorando las propiedades físicas y estéticas de los que ya estaban presentes en el mercado.
- Elimina la contracción por polimerización.
- Visualización *in situ* de la impresión digital tomada.
- Posibilidad de articular digitalmente la oclusión del paciente.
- Eliminación de problemas potenciales durante el montaje de articulador convencional, así como reducción del discomfort que le supone al paciente.
- Menor tiempo de clínica y laboratorio.
- Posibilidad de colocar pilar/restauración en el mismo día.
- Ahorro económico en materiales de impresión y cubetas, así como en el transporte de las impresiones.
- Mejor adaptación y ajuste de los elementos diseñados.

B. Desventajas [1,3,10]:

- Gran inversión económica inicial.
- Necesidad de curva de aprendizaje y entrenamiento específico.
- Limitación de algunos escáneres actuales para impresiones de arcada completa.

1.2. Materiales dentales.

1.2.1. Introducción histórica.

En el campo de la Odontología, clásicamente se han ido utilizando materiales que no sólo aportasen funcionalidad, sino también estética. En un principio, los metales como el oro o algunas aleaciones formaban parte de la práctica diaria, utilizándose a veces como parte de la estructura de coronas o puentes, para luego ser recubiertos de un material más estético y menos resistente [5].

Las cerámicas se han utilizado en la Odontología desde hace más de 200 años [3,13-15]. Fue el 11 de mayo de 1791 cuando Nicolas Dubois de Chémant (dentista francés), patentó en Inglaterra lo que llamó “*teeth of mineral paste*” (diente de pasta mineralizada) siguiendo las ideas del también francés Alexis Duchâteau (farmacéutico). En 1889 Charles H. Land fue el primero en patentar una corona

completamente de porcelana. Sin embargo, aunque se demostraron sus propiedades mecánicas, estéticas y de estabilidad química, se vio que la fragilidad provocada por su naturaleza quebradiza obligó a usar este material siempre como revestimiento de una estructura metálica (desarrollada por primera vez en los años cincuenta por Abraham Weinstein) [3,5,7,16,17].

Este tipo de reconstrucción ha sido durante muchos años el *gold standard* para las rehabilitaciones fijas sobre dientes o implantes. Sin embargo, algunas limitaciones como el encarecimiento del oro o la aparición de alergias a algunos de estos metales obligaron a la búsqueda de alternativas que aportasen buenos resultados [5].

No fue hasta 1965 que MacLean y Hughes desarrollaron la primera corona sin metal, producida a partir de alúmina con núcleo reforzado de porcelana, la cual poseía una resistencia a la flexión de entre 120–150 MPa. Después de esto, muchos otros materiales de base cerámica se han ido desarrollando con el tiempo [3].

Por otro lado, dentro del grupo de los materiales provisionales, han destacado materiales de resina clásicos (polimetil, polietileno, composite bis-acrílico...), los cuales se han utilizado también en la producción de rehabilitaciones protésicas fijas [18,19]. Clásicamente, la mayoría de estos materiales eran auto o fotopolimerizables [18,20].

1.2.2. Clasificación.

El espectro de materiales utilizado en el sistema CAD/CAM es muy extenso, y no solo incluye polímeros acrílicos, sino que también recoge entre sus posibilidades a materiales cerámicos y composites [21,22].

A. Cerámicas:

Se han propuesto muchas clasificaciones para las cerámicas dentales, basadas en su microestructura entre otras características [23], aunque nos centremos en la clasificación más actual (Fig. 7):

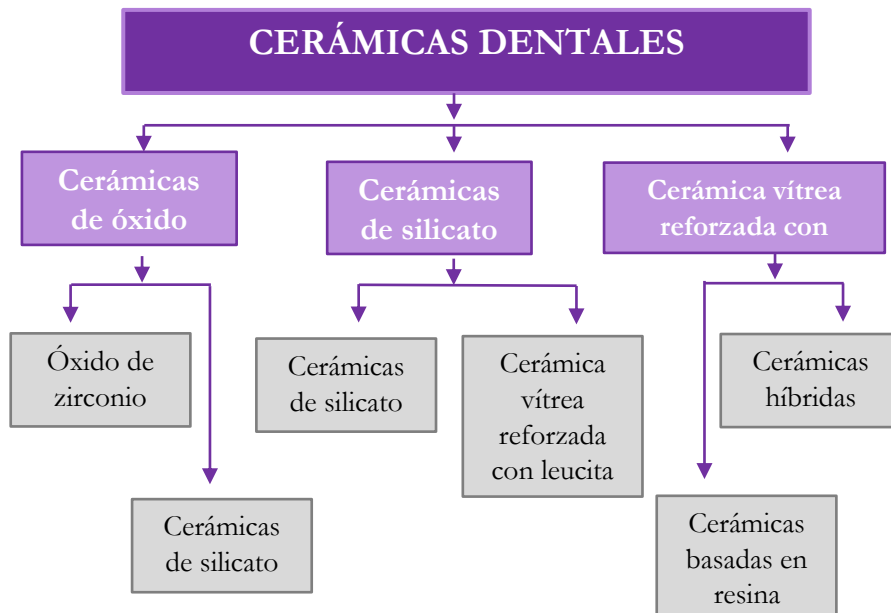


Figura 7: Diagrama esquemático de la clasificación de las cerámicas dentales. Figura tomada del trabajo de Skorulska y cols [21].

Las cerámicas de matriz de resina son un material relativamente nuevo que se caracterizan por condiciones de fresado favorables y una mayor capacidad de carga y módulo de elasticidad. La estética es muy favorable, ya que el infiltrado de matriz de resina aporta propiedades muy similares a la del esmalte natural. [15,19,21,23,24].

Por otro lado, las cerámicas de silicato, también conocidas como cerámicas vítreas, ya que son materiales de tipo composite donde la fase vítrea es la matriz y la cerámica se encuentra en forma de microrrelleno de refuerzo [15,21,25].

Este grupo también es conocido como cerámicas vítreas, ya que son materiales de tipo composite donde la fase vítrea es la matriz y la cerámica se encuentra en forma de microrrelleno de refuerzo [2,15,21]. Su composición puede variar según el fabricante, aunque todas ellas suelen presentar dióxido de silicio (SiO_2), óxido de potasio (K_2O), óxido de sodio (Na_2O) y óxido de aluminio (Al_2O_3) [15]. A este grupo pertenecen el disilicato de litio y las cerámicas feldespáticas entre otras [21,25,26].

Por último, las cerámicas de óxido presentan unas altas propiedades mecánicas, pero en contraposición muestran peores propiedades estéticas debido a la baja translucidez. A este grupo pertenecen materiales como el Policristal

Tetragonal de Zirconia de Itrio (Y-TZP) [21,27]. Algunos ejemplos de los grupos cerámicos mencionados para fresado con CAD/MAN aparecen en la figura 8.



Figura 8: Imagen tomada de Lambert y cols donde se muestran diferentes tipos de bloques de cerámicas que se pueden encontrar en la actualidad en el mercado [23].

B. Materiales poliméricos.

En este grupo destacan los materiales derivados del PMMA, que se trata de un polímero transparente infiltrado con pigmentos [28], son materiales que pueden usarse durante un periodo de entre seis meses y un año. También podemos encontrar otros polímeros utilizados en el sistema CAD/CAM como el PEEK (poliéter éter cetona), el cual un módulo de elasticidad menor al PMMA.

C. Composites.

Son materiales compuestos por una matriz de resina formada por monómeros con rellenos inorgánicos incorporados. Estos rellenos mejoran las propiedades de las resinas, modificando las propiedades físicas y mecánicas según el porcentaje de carga. Se ve reducida la contracción polimérica y se mejora el acabado, la estética y la resistencia [19,21,29] (Fig. 9).

El Vita CAD Temp (VITA Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemania) es muchas veces clasificado como composite por algunos autores [19,21], ya que en el catálogo de la página web se describe al material como un polímero de acrilato con relleno de micropartícula [30], sin embargo, siguiendo las características específicas facilitadas por el fabricante, podemos asegurar que la mayor parte de su composición es PMMA. Este micro relleno puede inducir también que se clasifique en este grupo, por lo que según el contexto podríamos hablar de un composite o de un polímero.



Figura 9: Imagen tomada del libro “Handbook of Bioceramics and Biocomposites” donde se muestran diferentes tipos de bloques de materiales de resina que se pueden encontrar en la actualidad en el mercado [31].

1.2.3. Materiales dentales para CAD/CAM que serán utilizados en el estudio.

A. **IPS e.max CAD.**

El desarrollo de las tecnologías ha llevado a la búsqueda constante de un material definitivo como la porcelana que tuviera todas las ventajas (estética, biocompatibilidad, baja conductividad térmica...) y que fuera capaz por sí mismo de soportar una restauración completa. Todas estas ventajas las cumplen las cerámicas vítreas, grupo al que pertenece el disilicato de litio incorporado al mercado en 1998 [32,33,34].

Las propiedades estéticas y biocompatibles de las cerámicas, han generado el estímulo necesario para lograr superar sus limitaciones mecánicas. Esta búsqueda ha obtenido como resultado la incorporación de las cerámicas vítreas, sistemas de restauración que se han vuelto especialmente populares dada su mejora en propiedades mecánicas, translucidez e integridad del material [35-37]. Llegando a suponer una de las elecciones predilectas de los clínicos para rehabilitar [38].

Este material está compuesto aproximadamente en un 70% de su volumen por la fase cristalina incorporada en una matriz vítrea con un núcleo de disilicato de litio. En su proceso de producción, esta cerámica se comercializa en bloques compuestos en un 40 % por cristales de metasilicato de litio (Li_2SiO_3) en fase azul o de cristalización intermedia, ya que se encuentran presinterizados (proceso de aplicación de calor para proporcionar propiedades físicas deseadas (Kreidler)) y presentan un color azulado (Fig. 10). Durante esta fase los bloques pueden ser fresados fácilmente en la unidad CAM ya que presentan una fuerza a la flexión de 130 ± 30 MPa [32,33,36,39].

Una vez fresadas las piezas, estas son horneadas a una temperatura de unos 850 °C ante condiciones de vacío durante 20-25 min, proceso durante el cual se disuelve el metasilicato de litio, dejando los cristales de disilicato de litio

($\text{Li}_2\text{Si}_2\text{O}_5$), pasando a alcanzar una resistencia a la flexión muy superior a la anterior: $360 \pm 60\text{MPa}$ [2,32,38-41].



Figura 10: Distintas presentaciones de bloques de IPS e.max® CAD (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) disponibles actualmente en el mercado.

Una vez finalizadas todas las fases de producción del material, nos encontramos con las estructuras diseñadas en un material altamente resistente y estético. Se comercializa en varios colores como vemos en la imagen (Fig. 1) según los requerimientos de cada caso.

Sus indicaciones son variadas, yendo desde la confección de carillas, hasta inlays, onlays, coronas de recubrimiento total, coronas sobre implantes o pilares transepiteliales [33,41].

B. Vita CAD Temp.

El polimetil metacrilato (poly [1-(methoxy carbonyl)-1-methyl ethylenel]) según la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) [42] llegó al mercado odontológico en 1930 [20] de la mano de los químicos británicos Rowland Hill y John Crawford [19], convirtiéndolo en el material resinoso más antiguo de nuestro campo [21].

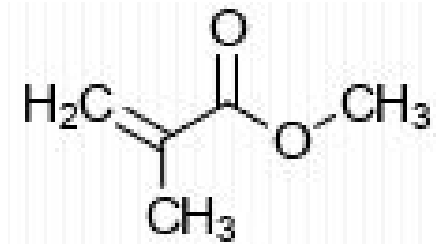


Figura 11: estructura del metil-metacrilato (MMA) antes de añadirse el radical libre. Imagen tomada del artículo de Pituru y cols [19].

Se trata de un polímero sintético que se produce al añadir un radical libre y polimerizar un monómero [19,42]. El metil-metacrilato ($C_5O_2H_8$) o MMA (Fig. 11) es el metil éster del ácido de metacrilato (MAA), y se encuentra en forma líquida incolora. El MMA es el componente de mayor volumen usado para sintetizar el polímero y se ha demostrado que su exposición está asociada a daños en el organismo [19,43,44] como irritación de la mucosa [42,45], inflamación tisular, efectos genotóxicos, alteraciones en el ciclo celular, citotoxicidad e incluso apoptosis [19,33,42,46-51].

La reacción de polimerización se activa por el radical libre que se une al MMA, en lugar de una reacción química estándar. En la fase de propagación, la polimerización que se ha continúa a través de la unión de monómeros seguida de terminación mediante el desplazamiento de los electrones libres al final de la cadena [42].

La representación del MMA con un radical libre añadido para dar lugar al polímero que conocemos como poli(metil-metacrilato) ($C_5O_2H_8$)_n tras su polimerización aparece reflejada en la Figura 12 [19,42,52,53]. Dado que el monómero es incoloro y líquido, el PMMA se presenta en formato polvo inoloro, unido a pigmentos, además de fibras sintéticas acrílicas o de nailon para mejorar las propiedades físicas y estéticas del producto, logrando el máximo parecido a los tejidos orales que se pretenden simular (como mucosa, encías o dientes) [42].

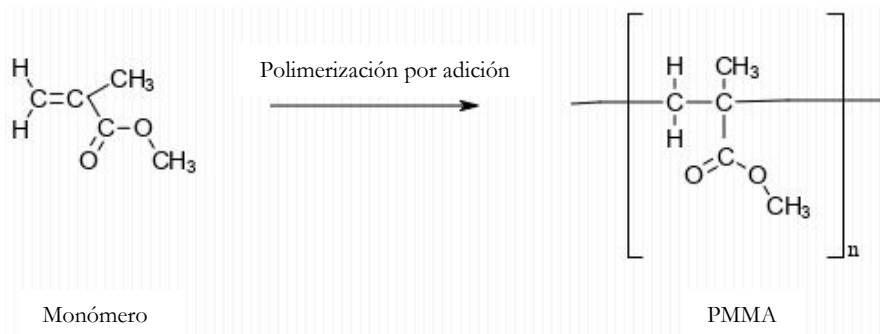


Figura 12: Estructura del metil metacrilato al añadirse un radical libre, que, tras el proceso de polimerización, genera la estructura de PMMA que se muestra. Imagen tomada del artículo de Pituru y cols [19].

El PMMA ha destacado por sus propiedades estéticas adecuadas, fácil manipulación y bajo coste [20,54-56] y por ello cuenta con diversas aplicaciones no sólo clínicas (coronas y rebases provisionales), sino a nivel de laboratorios (férulas y dispositivos de ortodoncia removible) y de confecciones ya industrializadas (fabricación de dientes artificiales de tablilla) [42].

De manera tradicional se ha comercializado en un formato polvo-líquido, estando el compuesto en el polvo, mientras el líquido contiene el monómero (líquido incoloro) y algunos pigmentos que aportan la estética requerida [19,42]. Esta forma de presentación cuenta con importantes desventajas, donde destaca la producción de alergias de contacto en la mucosa oral producida por la liberación de monómero al medio [57-59]. Esta liberación da lugar a la pérdida de propiedades mecánicas y la falta de estabilidad dimensional. Además, es importante destacar que durante una parte del proceso de polimerización, este tipo de resina acrílica es capaz de absorber agua en su interior, lo que afecta a la estabilidad dimensional y a las propiedades mecánicas (dureza, resistencia transversa y límite de fatiga alterado), dando lugar a fracturas y fisuras [19,20,60]. Por otro lado, es un material con baja conductividad térmica, lo que, en casos de ser usado como base de prótesis completas, altera la percepción del gusto de los pacientes [19].

El monómero que queda sin polimerizar corre el riesgo de diluirse en la saliva, lo que puede afectar a la biocompatibilidad, teniendo la potencial capacidad de causar eritema, erosión de la mucosa oral y sensación de quemazón en la mucosa y la lengua [20].

El monómero liberado da lugar a la formación de radicales libres que produce estrés oxidativo, lo que induce a una variedad de factores de transcripción que permiten la expresión de varios genes específicamente asociados a los procesos inflamatorios [19] cuyas consecuencias han sido anteriormente descritas.

INTRODUCCIÓN

Todas estas limitaciones unidas a la contracción del material al polimerizar, han hecho que, apoyados en el sistema CAD/CAM se produzcan materiales derivados y reforzados como el Vita CAD Temp (Fig. 13).



Figura 13: distintas presentaciones de bloques de Vita CAD-Temp® (VITA Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemania) disponibles actualmente en el mercado.

Este material está compuesto según el fabricante por PMMA, un infiltrado de dióxido de silicio y pigmentos [30]. La introducción de materiales suplementarios ha demostrado con anterioridad la mejora de las propiedades mecánicas (fuerza de impacto, fatiga cíclica, fuerza ala flexión), físicas (conductividad térmica, absorción de agua, estabilidad dimensional) y biológicas (biocompatibilidad y efecto antimicrobiano) [42].

El Vita CAD Temp se comercializa en bloques o discos prepolimerizados (Fig. 14), las cuales luego son fresadas utilizando diseños adaptados a cada paciente o estandarizados. Esta metodología hace que desaparezca casi por completo la liberación de monómero al medio, además de eliminar la contracción por polimerización que podía tener lugar durante la mezcla y la aplicación del producto [18].

Se han visto mejoradas también las propiedades ópticas y la estabilidad del color, además de haber conseguido simplificar en gran manera la producción de prótesis y aditamentos provisionales mediante el fresado de los bloques [18].

Este material se comercializa como provisional de larga duración y, al ser diseñado y confeccionado mediante el sistema CAD/CAM, cuenta con la ventaja de que, en caso de desgaste o fractura prematuro, podría volver a fresarse el mismo aditamento previamente diseñado [18]. Según el fabricante, las propiedades mecánicas con las que cuenta son un módulo de elasticidad >2800 MPa y una resistencia a la flexión de >80 MPa [30], propiedades que han sido corroboradas por diversos autores y que presentan unos valores muy positivos para materiales provisionales.



Figura 14: Diferencia entre la presentación en bloques y pastillas del Vita CAD-Temp® (VITA Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemania) según la indicación de uso disponibles actualmente en el mercado.

1.3. Biocompatibilidad.

Un biomaterial se trata de un material no vivo que se utiliza para la confección de un dispositivo médico, por lo que su desarrollo está pensado para entrar en contacto con el sistema biológico donde se vaya a ubicar. A este grupo de materiales pertenecen desarrollos de la ingeniería de los materiales como las cerámicas, las aleaciones metálicas, los polímeros y los composites que se usan en la cavidad oral [14,61,62].

INTRODUCCIÓN

La biocompatibilidad, por otro lado, depende de varias disciplinas como la biología, la ciencia de los materiales, la química, la física y la medicina. Teniendo eso en cuenta, la biocompatibilidad es la encargada de determinar el potencial tóxico de un material o dispositivo médico tras estar en contacto con el cuerpo, lo que implica también a las posibles reacciones sistémicas que puedan generar [63,64].

Podría definirse como la habilidad de un biomaterial de cumplir con la función deseada en relación a la terapia médica que se esté aplicando, sin que con ello llegue a producir ningún efecto indeseable a nivel local o sistémico dentro del beneficiario de la terapia, generando siempre la respuesta tisular o celular más beneficiosa en cada situación específica y optimizando los comportamientos clínicos del tratamiento [62].

Este término está conectado a los tres niveles de evaluación biológica que se tienen en cuenta para garantizar la bioseguridad de los dispositivos médicos que se aplican (Fig. 15). Esto implica que el estudio de materiales siempre debe comenzar por ensayos *in vitro* antes de llegar al paso final en que se evalúa el proceso sobre humanos [63].

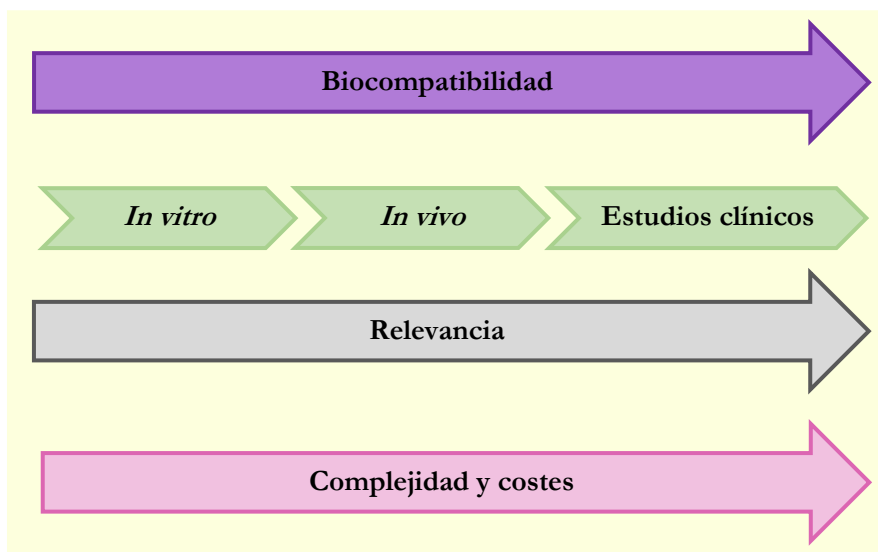


Figura 15: Relación existente entre la biocompatibilidad de un material y su aumento proporcional en relevancia, complejidad y costes del estudio. Imagen inspirada en la figura del libro "*Cell Culture Technology*" [63].

En Odontología cobra especial importancia la biocompatibilidad de los materiales, ya que se mantienen en contacto con los tejidos durante un tiempo prolongado de tiempo. Para conocer si un material es biocompatible o no, el

primer paso lógico en la investigación ha de ser un análisis de la citotoxicidad *in vitro* [65].

1.3.1. Estudios *in vitro* para analizar los materiales.

En la actualidad existe una gran variedad de tipos de materiales que pueden ser estudiados de esta forma (Fig. 16). Conocer la interacción de estos materiales con el cuerpo humano supone un proceso complejo y delicado que se debe llevar a cabo para conocer las interacciones que puedan tener lugar al interaccionar con los tejidos que lo rodean. Algunos factores que son estudiados con este fin son los siguientes [63]:

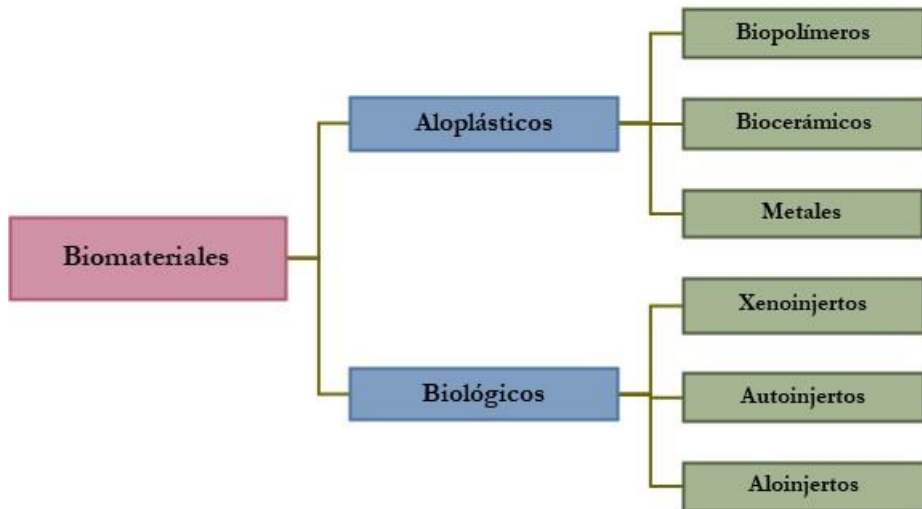


Figura 16: Clasificación de los biomateriales en aloplásticos y biológicos y sus subdivisiones. Diversas combinaciones son posibles usando estos materiales para dar lugar a la formación de composites. Imagen inspirada en la figura del libro “*Cell Culture Technology*” [63].

- **Porosidad:** se tratan de los espacios que aparecen en los materiales donde pueden alojarse las células. Este concepto puede ser analizado mediante la tecnología SEM.
- **Degradación:** está sobre todo asociado a dispositivos médicos que sirvan para rehabilitar una articulación, ya que la degradación del material supondría el fracaso de la misma. Depende de múltiples factores, que se

resumen en factores químicos y celulares (degradación celular por parte de macrófagos o fibroblastos entre otros).

- **Humectabilidad:** la adhesión celular se produce gracias a moléculas adhesivas que se activan al contacto con el material. La adhesión es un proceso que suele aparecer a los pocos segundos del contacto de manera espontánea. Generalmente las proteínas de adhesión suelen tener una unión más fuerte a superficies hidrófobas que hidrofílicas. Para conocer la humectabilidad del material se debe medir el ángulo de contacto de una manera dinámica o estática (gota sésil) (Fig. 17) [63,66-71].

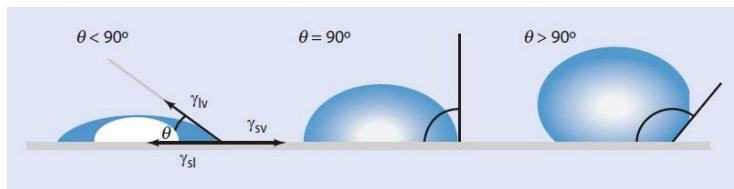


Figura 17: Ilustración de la medida del ángulo de contacto al crear la línea tangente en la interfase del líquido en el estudio de la humectabilidad [66]. Imagen tomada del libro “*Cell Culture Technology*” [63].

- **Dureza:** se ha demostrado que la dureza del substrato donde se apoyan las células influye en características como la motilidad y el esparcimiento de las mismas, siendo superficies duras como la de los materiales presentados, donde mejores características presentan los fibroblastos [72-74].
- **Rugosidad:** es sabido que la micro y nano topografía de la superficie del substrato resultan claves y determinan el contacto celular. En función a estos parámetros de análisis de desniveles en la superficie el crecimiento celular podrá ser más o menos acelerado, modificando también la disposición celular y la dirección de su crecimiento [63,67,75,76].

1.4. Tejido blando peri-implantario.

Un implante dental puede ser considerado como un órgano artificial que sustituye a un diente natural, por lo que deben ser capaces de proporcionar una correcta función al contacto con el organismo. Para lograrlo, es crucial evitar las complicaciones mecánicas y biológicas que pudieran afectar a su estabilidad [77].

1.4.1. Importancia del sellado peri-implantario.

Durante mucho tiempo, la osteointegración ha ocupado la mayoría de los estudios implantológicos de índole científica. Sin embargo, hoy día es sabido que este proceso es complicado de mantener en ausencia de una correcta mucointegración [78].

El tejido blando que rodea la parte transmucosa de los implantes dentarios es la encargada de separar la zona ósea periimplantaria del resto de la cavidad oral [68,79]. Este collar de tejido blando recibe el nombre de mucosa periimplantaria [79]. El cuerpo humano está sometido a factores externos potencialmente dañinos de manera constante (luz ultravioleta, microorganismos...). La piel es la primera barrera del cuerpo ante todo este tipo de factores; en el caso de los implantes y los dientes, se tratan de organismos que traspasan ese tejido protector.

La adhesión de este tejido al implante se encarga de formar un sellado responsable de prevenir el desarrollo de procesos inflamatorios y patológicos como la pérdida ósea marginal, la mucositis o la periimplantitis. La estabilidad de estos tejidos aporta unas condiciones de salud que propician el mantenimiento de la osteointegración y la supervivencia a largo plazo de los implantes [77,79,80], así como la capacidad de lograr tejidos blandos estéticos similares a los que se generan alrededor de un diente natural [80,81].

1.4.2. Composición del tejido blando peri-implantario.

A. Partes del tejido blando.

Este tejido blando se divide en una parte de tejido epitelial y otra de tejido conectivo [82]. El tejido epitelial, por un lado, se trata de un epitelio oral queratinizado estratificado que alcanza grandes similitudes con el epitelio del diente a nivel histológico. Por otro lado, el tejido conectivo subyacente, presenta algunas diferencias que veremos expuestas más adelante [81,82].

El tejido conectivo que rodea los implantes recibe el nombre de mucosa periimplantaria [83] y se puede dividir a su vez en dos partes: zona adherida al hueso y zona adherida al pilar transepitelial (o el implante). El primero es idéntico a nivel histológico al de la encía del diente y consigue inmovilizar la estructura, mientras el segundo es mucho más débil [77]. Las características de la mucosa periimplantaria se establecen durante el proceso de cicatrización de la herida, que ocurre después del cierre de los colgajos mucoperiostiuos tras la instalación del implante o después de la conexión del pilar emergente. La cicatrización de la mucosa establece una unión de tejido blando (unión transmucosa) con el implante [83] (Fig. 18).

La unión transmucosa está sujeta a cambios que pueden ser producidos por movimientos en los labios, las mejillas, la lengua y los maxilares. En casos

donde este tejido sea demasiado débil o fino, este sellado puede verse interrumpido, propiciando la colonización de microorganismos patógenos [77,83].

El ancho biológico de la mucosa peri-implantaria ronda alrededor de los 2 mm de epitelio y 1–1.5 mm de tejido conectivo que separa el epitelio de la cresta ósea. Este concepto es igual al de los dientes naturales, tratándose de las dimensiones comprendidas entre la adhesión de tejido conectivo más apical y la zona del epitelio de unión [68,77,82,84].

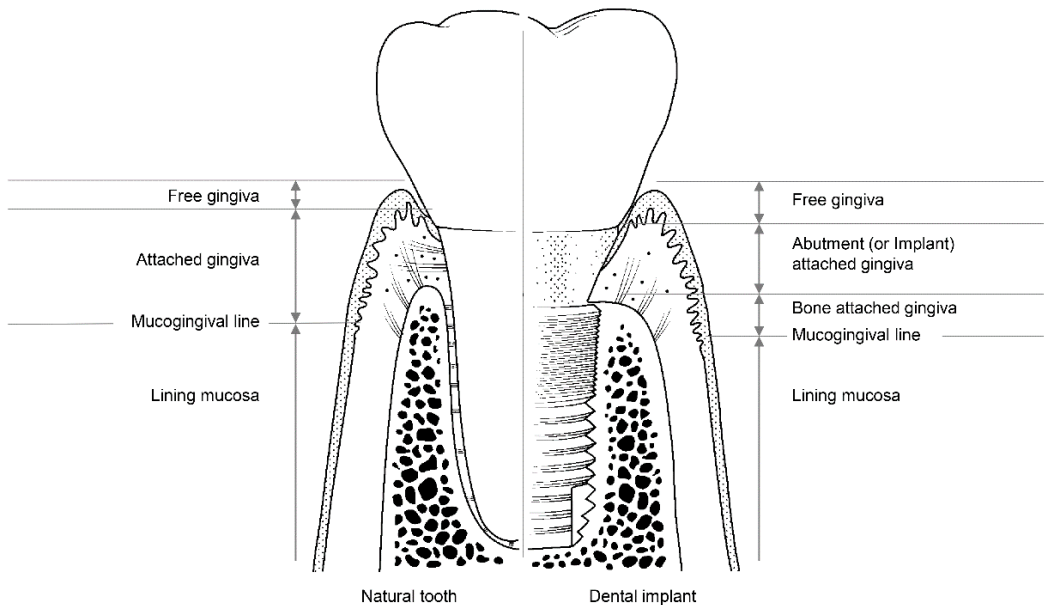


Figura 18: Ilustración que hace referencia a las distintas divisiones del tejido blando que rodea al diente natural (izquierda) y al implante dental (derecha). Siendo las del diente (de arriba abajo): encía libre, encía adherida, línea mucogingival y mucosa yugal; y en el implante: mucosa libre, mucosa adherida al pilar/implante, mucosa adherida al hueso, línea mucogingival y mucosa yugal. Imagen tomada del estudio de Kim y cols [77].

B. Células que lo componen.

La capa de tejido conectivo está compuesta por proteínas fibrosas incluidas en una matriz tisular muy hidratada con componentes como proteoglicanos, ácido hialurónico y glicoproteínas entre sus componentes [85].

Dentro del tejido conectivo existe una variedad de células, entre las que se incluyen fibroblastos, células endoteliales, células inmunológicas y neuronas [81]

En imágenes al microscopio electrónico, se ha comprobado que, de todo el ancho de tejido conectivo, del 85 % (frente al 60 % en caso de periodonto) es ocupado por fibras colágenas elásticas circulares, mientras el resto está conformado por fibroblastos adheridos al pilar [77]. Esto hace, que al ser los fibroblastos las principales células productoras de colágeno, se tratan de unas células clave para ser analizadas.

C. Diferencias entre el tejido peri-implantario y el periodental.

A pesar de que ambos tejidos son muy similares tanto a nivel celular como histológico, una de las principales diferencias es la disposición de las fibras colágenas, las cuales en el diente se encuentran dispuestas en forma de un entramado con diferentes angulaciones, anclándose algunas de ellas al cemento del diente. En el implante, sin embargo, estas fibras presentan una disposición paralela que llega hasta la cresta ósea y el periostio hasta la zona del implante que entra en contacto con el tejido blando o el pilar transepitelial [83,84,86]. Esta disposición que facilita en caso de perderse el sellado, una vía directa al hueso, y por tanto al implante para posibles microorganismos patógenos [82,86] (Fig. 19). Estas fibras son capaces de otorgar flexibilidad al tejido [84], además se ha visto que en la mucosa periimplantaria suele haber una mayor concentración de fibras colágenas, en contraposición a menor número de fibroblastos que en la encía del diente [83].

Además, esta disposición puede ocasionar la migración apical del tejido en casos de sellado débil, lo que puede a su vez propiciar pérdida ósea marginal [84].

Por último, otra de las grandes diferencias entre ambos tejidos es la irrigación sanguínea, ya que en el caso de la mucosa peri-implantaria sólo procede del hueso, mientras que, en el caso de los dientes, parte de ella procede también del ligamento periodontal. Esto puede afectar a la fragilidad de este tejido (Atsuta).

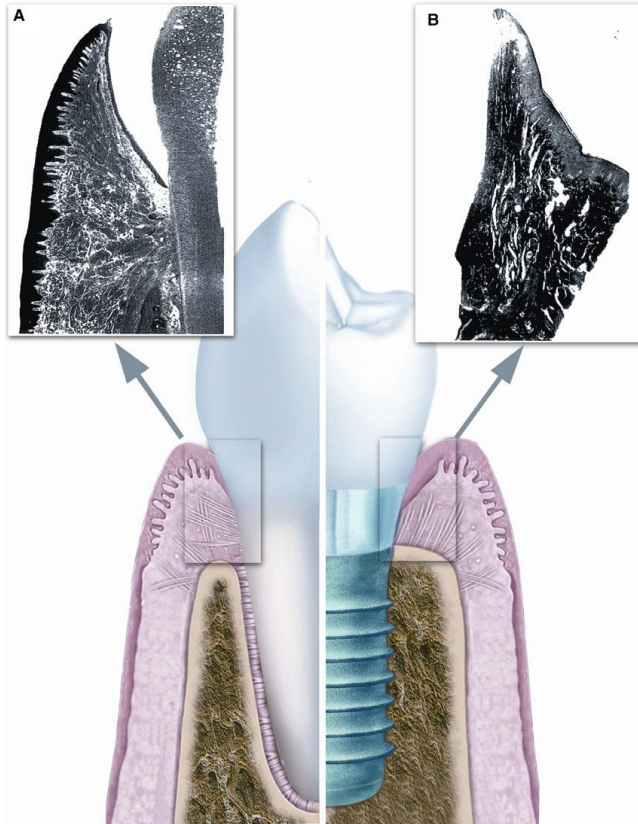


Figura 19: Ilustración que hace referencia a la anatomía del tejido duro y blando que rodea al diente natural (izquierda) y al implante dental (derecha). Además, en la zona más superior de la imagen se puede observar la diferencia del tejido blando en un corte histológico de diente (A) e implante (B). Imagen tomada del artículo de Ivanovski y cols [82].

D. Proceso de cicatrización.

Cuando un implante es colocado, el tejido blando de la zona sufre una irritación o herida que debe pasar por un proceso regenerativo [87,88]. Todo epitelio lesionado es capaz de restablecer su integridad gracias a su capacidad regenerativa determinada genéticamente. En cualquier herida, la tendencia del tejido es la de avanzar el crecimiento y remodelación de los bordes hasta que ambos vuelven a contactar, deteniendo así la señal de crecimiento [89].

La cicatrización comienza con la fase inflamatoria o transitoria, la cual dura de forma general entre tres y cinco días. Esta etapa se caracteriza por la vasoconstricción inicial para favorecer la formación del coágulo en las primeras horas tras la colocación del implante. Seguidamente se produce una vasodilatación que permite la migración de leucocitos a los tejidos intersticiales. Los neutrófilos se encargan entonces de degradar todos los productos de desecho que puedan

encontrarse en los bordes de la herida, así como contribuir a la destrucción de posibles cuerpos extraños de la zona como pueden ser las bacterias [79,89-91].

La fase fibroblástica comienza con la formación del entramado de hebras de fibrina derivada de la coagulación, sobre el que se asientan los fibroblastos que han migrado desde los bordes de la herida. Los fibroblastos se encargan de producir tropocolágeno y fibronectina. Esta última, es una proteína que se encarga entre otras cosas de estabilizar la fibrina y de actuar como factor quimiotáctico de los fibroblastos, con el fin de ayudar a los macrófagos a la fagocitosis de las hebras de fibrina una vez se ha producido la cicatrización completa de la zona (fibrinolisis). El tropocolágeno secretado por la matriz extracelular fibroblástica se va depositando y se entrecruza para formar colágeno, el cual crea una malla irregular que está enriquecida de ácido hialurónico, glucosaminoglicanos y cantidades crecientes de fibronectina [79,80,87,89,92,93].

Además de los fibroblastos, durante esta fase participan multitud de células (miofibroblastos, macrófagos, células endoteliales) que luego son eliminadas por el organismo cuando está finalizando la etapa de cicatrización (etapa de remodelación o maduración). Esta fase comienza aproximadamente a las dos semanas y puede durar hasta un año según diversos factores como el tamaño de la herida. En ella la matriz extracelular es sustituida por una más madura y resistente físicamente. Además, tiene lugar la migración de los queratinocitos a través de la matriz de colágeno tipo I y III que se ha ido generando y la destrucción de las fibras a unas más resistentes a fuerzas tensiles [80,89,93].

A las cuatro semanas de cicatrización el epitelio de unión peri-implantario migra apicalmente y llega a ocupar el 40 % del total de tejido blando que rodea al pilar transepitelial del implante. Esta migración se completa en 6 – 8 semanas, momento en que los fibroblastos terminan de formar una capa densa en la zona [79].

1.4.3. Fibroblastos gingivales.

A. Concepto.

Los fibroblastos son células de origen mesenquimatoso [94] cuya función es depositar y degradar fibras elásticas y colágeno de la matriz extracelular en los tejidos conectivos del cuerpo. Juegan un papel crucial en la homeostasis y el proceso de cicatrización de los tejidos, alcanzando morfologías heterogéneas en función a su procedencia [95-98].

Se trata de la célula predominante en el tejido conjuntivo (alrededor del 65 % del total) y se encarga de producir fibras diversas que se mantienen en el interior del tejido conectivo, además de participar en la formación de la matriz de tejido conectivo. Su anatomía característica es en forma de huso o estrella, con un

núcleo ovalado en su interior tal y como vemos en la siguiente imagen [83] (Fig. 20).

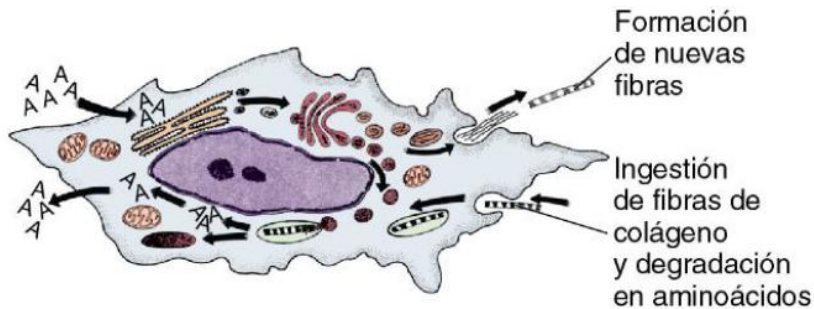


Figura 20: Ilustración de un fibroblasto humano que hace referencia a su capacidad de síntesis y degradación de colágeno. Imagen tomada de *"Principios de Histología y Embriología Bucal con Orientación Clínica"* [99].

Estas células no están completamente diferenciadas, lo que les otorga la capacidad de diferenciarse en otros tipos como en osteoblastos, según las necesidades del organismo y sin tener en cuenta muchas veces su origen embriológico [95]

B. Diferencias con fibroblastos periodontales.

Los fibroblastos gingivales se diferencian en varias características de los periodontales. Por un lado, son capaces de secretar colágeno para generar una matriz de tejido conectivo suave que sea capaz de proteger el hueso alveolar del medio de la cavidad oral, lo que mantiene la integridad del tejido al generar y mantener componentes de la matriz extracelular. Los otros, sin embargo, son responsables de mantener las fibras periodontales que anclan al hueso y al diente.

Las secreciones de colágeno en el caso de los fibroblastos, al contrario de lo que se pueda imaginar son menores [95-97]. Por otro lado, atendiendo a la morfología, podemos decir que los fibroblastos gingivales presentan una anatomía más elongada.

Los marcadores celulares también son algo distintos, siendo la proteína específica de fibroblastos (FSP-1) el marcador específico que distingue entre fibroblastos epiteliales al estar presente en el citoplasma de los fibroblastos, pero no en las células epiteliales [95].

1.4.4. Adhesión celular al sustrato.

A. Concepto.

Introducir un dispositivo biomédico o un biomaterial (implantes, prótesis, fármacos...) en el organismo, da como resultado la creación de interfases entre el material y los tejidos que lo rodean. Al entrar en contacto la superficie del material con el medio celular se producen una serie de reacciones químicas y biológicas, dando lugar a la formación de uniones temporales (más débiles) o fuertes. [75,76,90,100].

Este proceso recibe el nombre de adhesión, que se trata de manifestación de las fuerzas de atracción que existen entre los átomos de la superficie del biomaterial y la estructura de tejido donde se ubique, generando uniones de tres tipos: primaria (química), quasi-química (unión por hidrógeno) y secundaria (fuerzas de van der Waals) [75,101,102].

Las primeras de ellas dependen de las proteínas celulares, dando lugar a uniones reversibles o irreversibles que dependen de la lisis de algunas de sus uniones internas. Los otros dos tipos de uniones son más débiles (especialmente fuerzas de van der Waals), produciéndose las uniones de tipo quasi-químicas derivadas de las reacciones químicas que tienen lugar, las cuales liberan moléculas de agua que se disocian en grupo OH o se unen a las superficies mediante uniones por hidrógeno [75,102].

B. Partes implicadas en la adhesión.

El citoesqueleto es una parte de la célula que está compuesto de filamentos cohesionados que mantienen su propio ensamblaje a través de las moléculas de proteínas. Se sabe que está implicado en la producción, coordinación y dirección de los movimientos de las células. Está compuesto por microfilamentos (encargados de la adhesión al sustrato), donde destacan la actina y la miosina entre otras, los filamentos intermedios (encargados de producir soporte mecánico) y microtúbulos (presentes en todo tipo de células eucariotas) que generan la morfología de la célula. [67,103-107].

Las interacciones celulares dependen de la organización del citoesqueleto, la expresión de los receptores de integrina transmembrana y de la naturaleza de la matriz extracelular (ECM), esta última cumple un papel crucial en las uniones fibroblásticas [108].

Las células son capaces de modificar la adhesión inicial a través de la secreción de nuevos componentes de la ECM o a través de la manipulación de la ECM nativa, que incluye fuerzas de tracción.

INTRODUCCIÓN

La matriz extracelular está compuesta por una gran variedad de proteínas y polisacáridos que son secretadas de manera local por las células. Una vez producido el proceso de secreción, varios componentes de la ECM llevan a cabo un embalaje para organizar una matriz que mantenga un íntimo contacto con las superficies de las células (Fig. 21) [103].

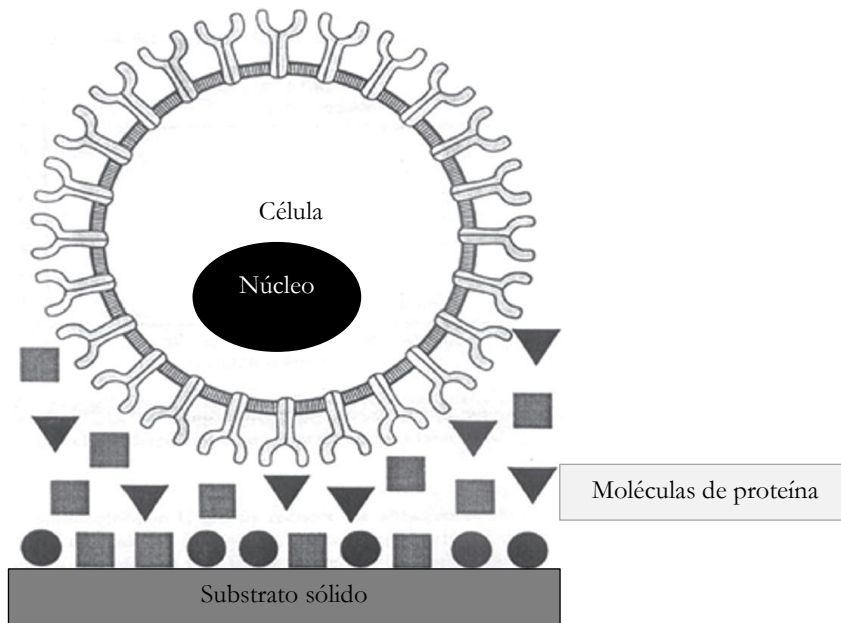


Figura 21: Ilustración esquemática donde se muestra los mecanismos fundamentales involucrados en la interacción biomaterial – célula donde participan las proteínas de adsorción (representadas como círculos, cuadrados y triángulos) junto a las proteínas de tipo integrinas [109]. Imagen tomada de “Advanced Structural Ceramics” [62].

Las células vivas no son capaces de interactuar de forma directa con los biomateriales, es por eso que se adhieren a la capa de proteínas adsorbida sobre el material (al entrar en contacto con los fluidos fisiológicos en el organismo vivo o con el medio de cultivo en el caso de los estudios *in vitro*). Algunas de las proteínas que más activamente influyen en este proceso son la fibronectina (FN), la vitronectina (VN) y el fibrinógeno (FG), las cuales son conocidas como proteínas de matriz soluble. Además de ellas y la ECM influyen otros complejos como las lamininas o el colágeno [106].

Se describen a continuación algunas de las moléculas principalmente encargadas de la adhesión de los fibroblastos gingivales a las estructuras con que entran en contacto [103,104,106]:

- **Fibronectina:** son flicoproteínas adhesivas capaces de expresarse en múltiples tipos celulares. Su forma soluble circula por algunos fluidos del organismo como la sangre, mientras que se reorganiza en una forma no soluble en la matriz extracelular. Es en esta forma cuando se encuentra implicada en diversas funciones entre las que destaca la adhesión.
Se considera que juega un papel imprescindible en el mantenimiento de la forma y el orden de los tejidos, ya que participa en la mediación de las interacciones entre la célula y la matriz.
- **Colágenos:** la producción de colágeno supone una parte esencial de la formación de tejido conectivo nuevo, un proceso que, como ya se ha comentado, tiene lugar al colocar un dispositivo como los pilares o aditamentos protésicos de los implantes. Los fibroblastos gingivales son capaces de producir colágeno tipo I y III, siendo el primero uno de los de más pronta aparición, además de tratarse de uno de los componentes principales del tejido conectivo gingival.
- **Integrinas:** pertenecen a una de las principales familias de receptores de adhesión celular. Cada una de ellas es un heterodímero, lo que consiste en que se subdivide en una forma alfa y otra beta. Ambas partes son proteínas transmembrana que se adhieren a través del citoesqueleto. Son capaces de interactuar con la ECM a través de sus dominios extracelulares.
- **Vinculina:** es una proteína de la membrana y el citoesqueleto. Forman una unión entre las moléculas de adhesión de las integrinas y el citoesqueleto de actina, dando lugar a placas de adhesión [110].

C. Proceso de adhesión.

Durante la adhesión, las fibras de estrés del citoesqueleto se unen a las glicoproteínas del sustrato a través de una cascada de proteínas que se denomina integrina transmembrana. Las integrinas cruzan la membrana celular para unirse a proteínas extracelulares, interactuando así con elementos del citoesqueleto. Las integrinas se dividen en dos tipos, las de cadena alfa y las de cadena beta, contribuyendo ambas a la unión de las proteínas de la matriz [108,111,112] (Fig. 22).

Son capaces de reconocer zonas concretas de la matriz extracelular, siendo una de las adhesiones más sencillas las que tienen lugar mediante la secuencia de aminoácidos arginina-glicina-ácido arginilglicilaspártico (RGD) [105]. Además, es común que interactúen con el citoesqueleto para unir células a la matriz

extracelular. En el caso de los fibroblastos, estas uniones a la superficie del sustrato se complementan con uniones mediante hemidesmosomas [108]-

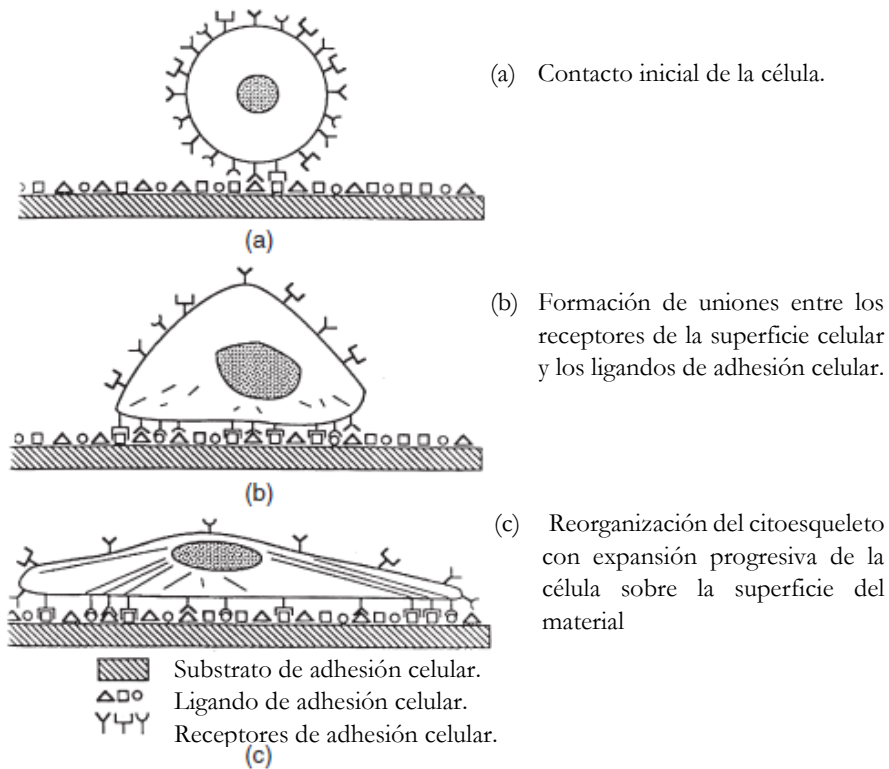


Figura 22: Ilustración que muestra el proceso físico de adhesión celular que tiene lugar sobre la superficie de un biomaterial: (a) aproximación inicial de la célula al material implantado; (b) formación de uniones físico-químicas entre la superficie celular y las proteínas adheridas; y (c) expansión celular sobre la superficie del material [109]. Imagen tomada de “*Advanced Structural Ceramics*” [62].

Se ha podido comprobar que factores como el sustrato pueden llegar a alterar la adhesión celular. Es por eso que las propiedades fisicoquímicas y geométricas de los materiales pueden influir en las interacciones entre las células y el sustrato.

También se ha visto que en superficies hidrofílicas los fluidos biológicos interactúan de mejor forma, permitiendo la adsorción proteínica y activación de los correspondientes receptores celulares que se producen en la naturaleza. Por otro lado, se ha visto que en superficies hidrófobas existe una tendencia a la contaminación por carbono, produciendo burbujas que pueden llegar a interferir con la adsorción y la activación de los receptores de adhesión celulares [70].

JUSTIFICACIÓN



2. JUSTIFICACIÓN

Desde la aparición de los implantes dentales de la mano de Brånemark hasta la actualidad, el concepto de éxito de los mismos ha ido variando. En un principio la preocupación de los clínicos se centró en la osteointegración de los implantes, por lo que, durante mucho tiempo, las cualidades óseas de los pacientes fueron consideradas como la principal variable a tener en cuenta.

Desde hace unos pocos años, los estudios han demostrado la importancia de los tejidos blandos peri-implantarios, los cuales forman una estructura fundamental que protege a los implantes de diversos factores perjudiciales que podrían afectar a su supervivencia. Este descubrimiento llevó a la generalización del uso de pilares transepiteliales, diseñados para conectar la zona endoósea con la rehabilitación protésica.

Durante un largo tiempo el titanio fue considerado como el material ideal para el desarrollo de estas estructuras, sin embargo, la demanda estética de los pacientes (principalmente en aquellos casos de implantes ubicados en el sector anterosuperior), unida a la aparición del sistema CAD/CAM, han conseguido revolucionar por completo el mundo de los materiales odontológicos. Muchos de estos materiales que se usan hoy día son derivados de clásicos que ya han demostrado sus ventajas a largo plazo.

Esta creciente demanda estética también ha llevado a los profesionales a introducir en su práctica clínica diaria la colocación de rehabilitaciones provisionales sobre implantes, las cuales son confeccionadas con materiales con requerimientos similares a los definitivos (como citotoxicidad, adaptación del tejido blando...), sirviendo para el mantenimiento de los tejidos blandos peri-implantarios, dando lugar a la consiguiente mejora o mantenimiento de la estética de la zona.

Esta situación derivó en nuestra decisión de evaluar el comportamiento de dos materiales de larga historia en el área de la Odontología: el poli(metilmetacrilato) (PMMA) usado como material provisional y el disilicato de litio (LS₂). Este último es considerado un *gold standard* dentro de los materiales definitivos estéticos, dadas sus excelentes características mecánicas y físicas (alta resistencia y translucidez entre otras).

Conocer el panorama actual de la implantología moderna y su digitalización nos llevó al desarrollo de esta Tesis Doctoral, en la cual se compararán dos materiales que ya se encuentran disponibles en el mercado: el IPS e.max® CAD (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein y el Vita CAD-Temp® (VITA Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemania).

La comparativa se realizará en términos de análisis del comportamiento de fibroblastos gingivales humanos al contacto con sus superficies, analizando para ello diversos parámetros celulares, así como análisis de los materiales en término de humectabilidad o nivel de citotoxicidad entre otros aspectos.

OBJETIVOS



3. OBJETIVOS

En este proyecto se comparan dos materiales producidos a través del sistema CAD/CAM:

- El IPS e.max® CAD (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) un tipo de disilicato de litio utilizado como material definitivo.
- El Vita CAD-Temp® (VITA Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemania) compuesto por poli(metil-metacrilato) con relleno de micropartículas de dióxido de silicio que se usa como material provisional.

Ambos materiales, comúnmente empleados en la implantología actual, se encuentran en contacto con el tejido blando periimplantario, por lo que la comparación se centra en alcanzar la respuesta a los siguientes dos tipos de objetivos:

3.1. Objetivo general.

El objetivo principal es el de examinar el comportamiento de fibroblastos gingivales humanos al contacto con las superficies de ambos materiales. Este comportamiento es evaluado a través de su crecimiento, viabilidad y secreción de colágeno *in vitro* durante la primera etapa de desarrollo celular.

3.2. Objetivos específicos.

La manera en que se alcanza el objetivo general previamente descrito es a través de:

- a) Estudiar la perfilometría de ambos materiales a través de un análisis SEM.
- b) Analizar la composición y morfología de la superficie.
- c) Evaluar el nivel de hidrofilia o hidrofobicidad de los materiales al contacto con agua y diiodometano.
- d) Analizar la citomorfometría fibroblástica en contacto con ambas superficies pasadas 24 horas desde su cultivo. Se calcularán los siguientes parámetros citomorfométricos: conteo celular, circularidad, tamaño medio del núcleo, área media ocupada por

HIPÓTESIS

el núcleo, longitud mayor del citoesqueleto, perímetro celular y área celular media.

- e) Analizar la viabilidad celular mediante el test de citotoxicidad MTT.
- f) Estudio del funcionamiento fibroblástico mediante el análisis de la secreción de COL1 en diferentes etapas tempranas del desarrollo celular.

HIPÓTESIS



4. HIPÓTESIS

Para el desarrollo del estudio planteado se utilizarán dos tipos de materiales. Por un lado, el Vita CAD-Temp® (VITA Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemania), material provisional compuesto por poli(metil-metacrilato), y por otro el IPS e.max® CAD (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein), material definitivo compuesto de disilicato de litio; ambos comercializados para ser fresados a través del sistema Computer-Aid Design/Computer-Aid Manufacturing (CAD/CAM).

La hipótesis nula (H_0) que se plantea es que al comparar ambos grupos de estudio podrán obtenerse valores *in vitro* similares en cuanto a rugosidad y humectabilidad, morfología fibroblástica (patrones citomorfométricos), citotoxicidad (en relación al contacto de los materiales con fibroblastos gingivales humanos), así como secreción de colágeno tipo I por parte de los HGFs al contacto con la superficie de ambos substratos.

MATERIAL

Y MÉTODO



5. MATERIAL Y MÉTODO

El presente estudio fue realizado en las instalaciones del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla en conjunción con las del Instituto de Ciencias de los Materiales de Sevilla (ICMS), centro adscrito al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Fueron utilizados dos materiales desarrollados para ser confeccionados mediante el método CAD/CAM (Computer-Aided Design/Computer-Aided Manufacturing), siendo uno de ellos el disilicato de litio, *gold standard* en estética y el otro polimetilmetacrilato, material provisional de referencia. Se analizaron sus superficies y nivel de citotoxicidad en relación a fibroblastos gingivales, así como el comportamiento de estos últimos sobre ambos tipos de superficies.

5.1. Material

A continuación, serán nombrados los distintos materiales de los que nos servimos para el desarrollo del estudio.

5.1.1. Discos de los materiales analizados en el estudio.

- Discos de IPS e.max® CAD (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein).
- Discos de Vita CAD-Temp® (VITA Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemania).
- Sistema CAD/CAM InLab MC XL® (Sirona, Bensheim, Alemania).

5.1.2. Materiales empleados en el cultivo celular y el desarrollo de los estudios en el laboratorio de muestras.

- Fibroblastos gingivales humanos (Innoprot, Bizcaia, España).
- Frascos de T75 (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos).
- Puntas de pipeta (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos).
- DMEM (Biowest, Nuaille, Francia).
- Cabina de seguridad Thermo Scientific™ (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).
- Incubadora CO₂ Nuair US Autoflow NU-4750-E (Nuair, Plymouth, Minnesota, Estados Unidos).
- Antibióticos (glutamina, penicilina, estreptomina) (Biowest, Nuaille, Francia).
- Micropipetas Gilson™ Fisher Scientific (Pittsburgh, Pensilvania, Estados Unidos).
- DPBS al 1x (Biowest, Nuaille, Francia).

- Tripsina/EDTA
- Tubos de centrifuga de 15 mL (Nerbe Plus GmbH, Winsen, Alemania).
- Azul de tripán (HyClone, Ge-Healhcare, Chicago, Estados Unidos).
- Cámara de Neubauer (OPTIK-Labor, Görlitz, Alemania).
- Tanque de nitrógeno líquido VE XC47/11-6 (Chart Industries, Inc., Ball Ground, Georgia, Estados Unidos).
- Suero fetal bovino (SFB) (Biowest, Nuaille, Francia).
- Centrifuga de laboratorio Beckman X-22R (Beckman Coulter, Indianapolis, Indiana, Estados Unidos).
- Dimetil-sulfóxido (DMSO) (Fisher Scientific, Hampton, Nuevo Hamps-hire, Estados Unidos).
- DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) (Vectashield, Vector Laboratories Inc., California, Estados Unidos).
- faloidina Acti-stain 488 Fluorescent Phalloidin (Cytoskeleton, Inc., Denver, Colorado, Estados Unidos).
- Cubre objetos de Menzel-Gläser (Menzel GmbH, Braunschweig, Alemania).

5.1.3. Materiales destinados a la visualización de las muestras y caracterización de las superficies.

- Microscopio invertido (Olympus CKX41, Tokio, Japón).
- Perfilómetro óptico 3D de no contacto Sensofar S Neox (Sensofar Medical, Terrasa, España).
- Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE-SEM) FEI TENE0 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).
- Metalizador Scancoat Six (HHV Ltd, Crawley, Reino Unido).
- Goniómetro OCA15pro de Dataphysics (DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Alemania).
- Microscopio confocal Zeiss LSM 7 DUO (Carl Zeiss, Jena, Alemania).

5.1.4. Materiales empleados para el estudio de citotoxicidad y secreción de colágeno.

- Tubos de microcentrifuga de polietireno de 1,5 mL y 5 mL (Deltalab, Rubí, Barcelona, España).
- MEM (Medio Esencial Mínimo) (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos).
- Kit MTT ab211091 (abcam, Cambridge, Reino Unido).

MATERIAL Y MÉTODO

- Placas de 48 y 96 pocillos Nunclon Delta Surface (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).
- L-Glutamina 100x, 200nM (Biowest, Nuaille, Francia)
- Agitador orbital Grant Bio PS-M3D 3D (Keison Products, Chelmsford, Essex, Reino Unido)
- Lector de microplacas Synergy HT
- Kit ELISA de Colágeno Tipo I Humano MyBioSource (San Diego, California, Estados Unidos).
- Pipeta multicanal Gilson™ Fisher Scientific (Pittsburgh, Pensilvania, Estados Unidos).
- Microcentrífuga Microfuge® 18 (Beckman Coulter, Indianapolis, Indiana, Estados Unidos).
- Agitador térmico PHMT Thermo-Shaker (Grant Instruments, Shepreth, Cambridge, Reino Unido).

5.2. Método

En el presente trabajo se comparan dos materiales de estudio (disilicato de litio y PMMA) en relación a las características de sus superficies (composición de los materiales, humectabilidad, rugosidad y morfología de los discos de trabajo). Posteriormente fueron llevados a cabo el cultivo y siembra de fibroblastos gingivales humanos sobre discos de ambos materiales y de un control para, de este modo, poder comparar características citomorfométricas a las 24 horas de la siembra, así como realizar un ensayo de la citotoxicidad de los materiales en relación a estas células y contabilizar la secreción de colágeno que producen los fibroblastos en contacto con estas superficies.

5.2.1. Desarrollo y producción de los discos.

Para el desarrollo del estudio fueron analizados un material cerámico y un material polimérico confeccionados mediante CAD/CAM para el Departamento de Estomatología de la Universidad de Sevilla:

- Disilicato de litio: IPS e.max® CAD (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein).
- Polimetilmetacrilato: Vita CAD-Temp® (VITA Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemania).

El primero de ellos se trata de un material definitivo, mientras el otro resulta ser un material provisional de larga duración, encontrándose los detalles aportados por el fabricante en la tabla 1. Tanto el disilicato de litio como el polimetilmetacrilato se comercializan en forma de bloques, los cuales fueron

fresados hasta conformar los discos sobre los cuales se llevó a cabo el experimento *in vitro*.

Tabla 1: Resumen de las principales características de los materiales utilizados en el estudio en relación al fabricante.

Nombre	Tipo de material	Fabricante	Ref./Nº lote	Presentación bloques comerciales
Vita CAD-Temp® monoColor (PMMA)	Polymethacrylate	VITA Zahnfabrik, Bad Säckingen, Germany	1M27/51750	Bloques de 15,5 x 19 x 39 mm
IPS e.max® CAD (LS ₂)	Vitreous ceramic lithium disilicate	Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein	HT A1/C1 4 /V28352	Bloques de 12,4 x 14,5 x 18 mm

Para el estudio fueron necesarios un total de noventa discos de cada material (Fig. 23): se utilizaron dos discos para la caracterización de la superficie, ocho para el estudio citomorfométrico, cuarenta y ocho para el análisis citotóxico y treinta y dos para la evaluación de la secreción de colágeno producida sobre cada tipo de superficie.

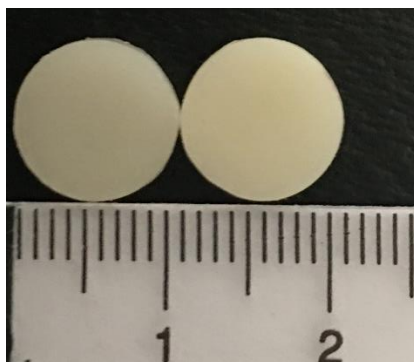


Figura 23: Imagen ejemplo de los discos utilizados, a la izquierda IPS e.max CAD y a la derecha Vita CAD Temp.

Los bloques de ambos materiales se fresaron usando el sistema InLab MC XL® (Sirona, Bensheim, Alemania) con el diseño previamente elaborado mediante el Software de laboratorio InLab SW 16.1 (Sirona, Bensheim, Alemania). Este sistema trabaja a 42,000 rpm y 320 voltiamperios (VA), estando irrigado con agua

MATERIAL Y MÉTODO

y líquido refrigerante específico, el Dentatec (Sirona, Bensheim, Alemania). Todos los discos fueron fresados con un tamaño estandarizado de 10 mm de largo y 2 mm de ancho con una forma circular. Para ello nos valimos de la alta precisión del sistema InLab, el cual presenta un valor de tolerancia $\pm 25 \mu\text{m}$, tratándose este del intervalo de valores dimensionales de los discos.

Se ajustaron distintas fresas para cada material:

- Step Bur 12S (Sirona, Bensheim, Alemania) y Cylinder Pointed Bur 12S (Sirona, Bensheim, Alemania) para el fresado de los bloques de PMMA.
- Step Bur 12S, 12 y 20 junto a Cylinder Pointed Bur 12S, 20 y 12EF (Sirona, Bensheim, Alemania) para el fresado de los bloques de LS₂.

Una vez concluida la fase de fresado, los discos de LS₂ se cristalizaron usando para ello el sistema Programat® P700 (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein), que se trata de un horno de cerámica que trabaja a unas condiciones de vacío y utiliza un rango de temperatura que oscila entre 840 y 850 °C. El proceso de cristalización dura entre 20 y 30 minutos, siendo este un procedimiento mediante el cual se consigue que el disilicato de litio pase de un estado cristalino intermedio a convertirse en una cerámica vítrea de disilicato de litio.

El PMMA, por otra parte, al tratarse de un composite polimérico, no necesita pasar por procesos de sinterización y/o cristalización tal y como indican las recomendaciones del fabricante.

Una vez estuvieron listos todos los discos de ambos materiales, fueron sumergidos durante 5 minutos en etanol al 70 %. Posteriormente se procedió a su esterilización mediante una onda corta (200-280 nm) de rayos UV-C durante 30 minutos cada una de las partes en un flujo laminar en una cabina de seguridad Thermo Scientific™ (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) (Fig. 24) para productos biológicos de Clase II MSC-Advantage™ (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) equipada para ello de una lámpara de vapor de mercurio con acción germinicida. Una vez hecho esto se colocaron dentro de una placa de Petri estéril hasta comenzar el experimento.



Figura 24: Imagen de la cabina de flujo laminar utilizada en la esterilización de los discos (Thermo Scientific™ Clase II MSC-Advantage™).

5.2.2. Caracterización de superficies

Una vez fresados todos los discos, reservamos dos de cada material para llevar a cabo el análisis de su superficie mediante los métodos que se describen a continuación. El modelo experimental queda esquematizado en el diagrama de flujo que aparece más adelante (Fig. 26) y será explicado detenidamente en los siguientes puntos.

A. Perfilometría.

Fue analizada la rugosidad de las superficies de los discos, para la cual se utilizó el perfilómetro óptico 3D de no contacto Sensofar S Neox (Sensofar Medical, Terrassa, España). Basándonos en la norma ISO 25178:2012, se realizaron medidas utilizando para ello una técnica de microscopía confocal-interferométrica [114]. Se empleó un objetivo 20x EPI ubicado a una longitud focal de 4,50 mm con una resolución óptica tipo Green de 0,32 μm .

Las mediciones se llevaron a cabo en cinco localizaciones aleatorias de cada uno de los discos, habiendo preestablecido previamente unas dimensiones de 0,87 x 0,66 mm² y una corrección cut-off de 250 μm . El software con el que se trabajó fue el SensoMAP Premium 7.4 (Fig. 25) (Sensofar Metrology, Terrassa, Barcelona, España), empleando como parámetro la rugosidad tridimensional (S_a) para los resultados de este análisis.



Figura 25: Perfilómetro óptico 3D Sensofar S Neox. Imagen obtenida a través del Centro de Investigación e Innovación de la Universidad de Sevilla [115].

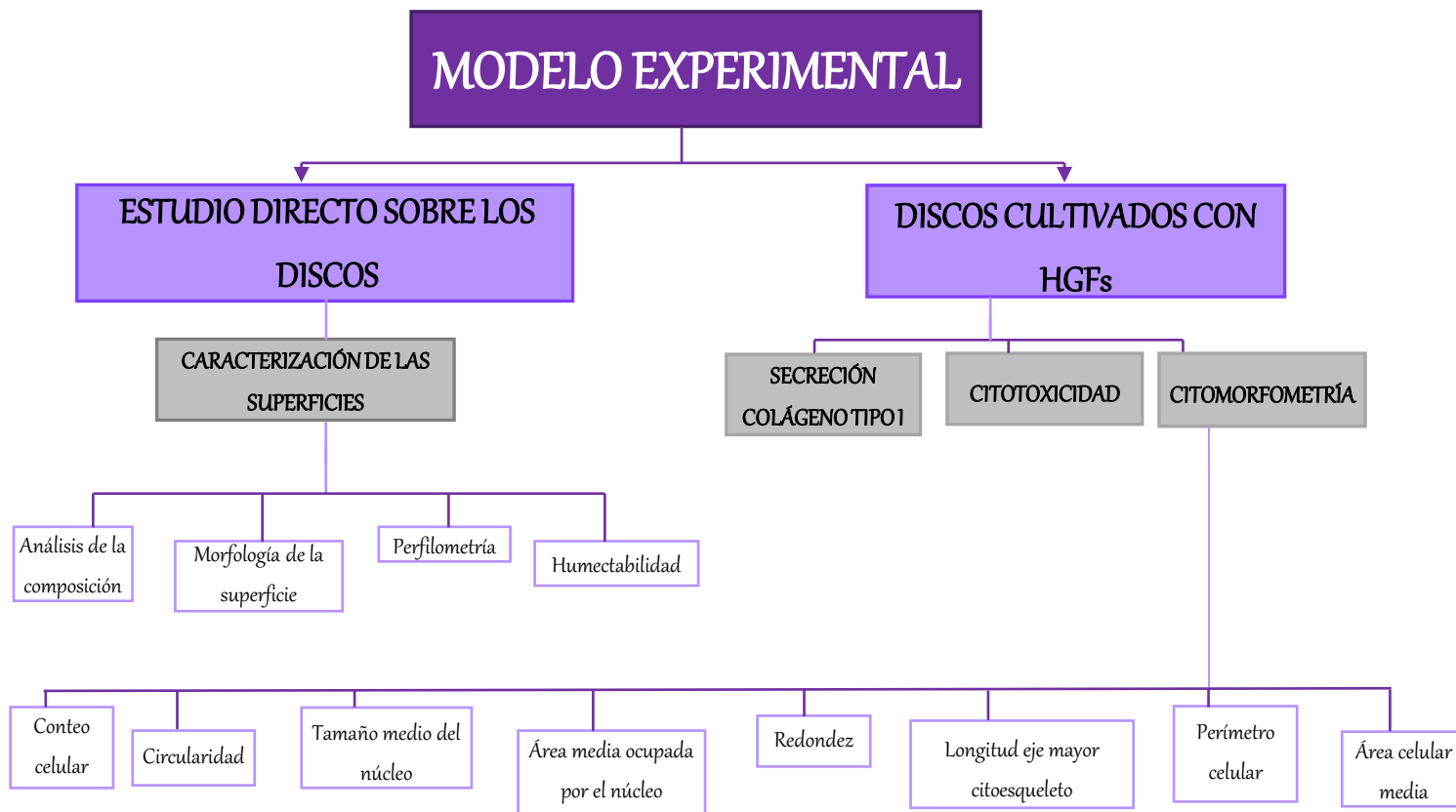


Figura 26: Diagrama representativo de la metodología seguida en el experimento.

B. Composición.

Para analizar la composición de los discos de ambos materiales de estudio, se utilizó el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE-SEM) FEI TENE0 (Fig. 27) en modo de trabajo de alto vacío (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Este tipo de microscopios recogen la información de la muestra a través de un haz de electrones en movimiento. Aquellos electrones que rebotan sobre la muestra son captados por un sensor de electrones, lo que permite su posterior análisis químico [116]. En el caso del presente estudio, el microscopio utilizado estaba equipado un cañón de emisión tipo Schottky y un detector tipo SDD EDAX (AMETEK, Inc., Devon-Berwyn, Pensilvania, Estados Unidos), ambos destinados al microanálisis de elementos ligeros.

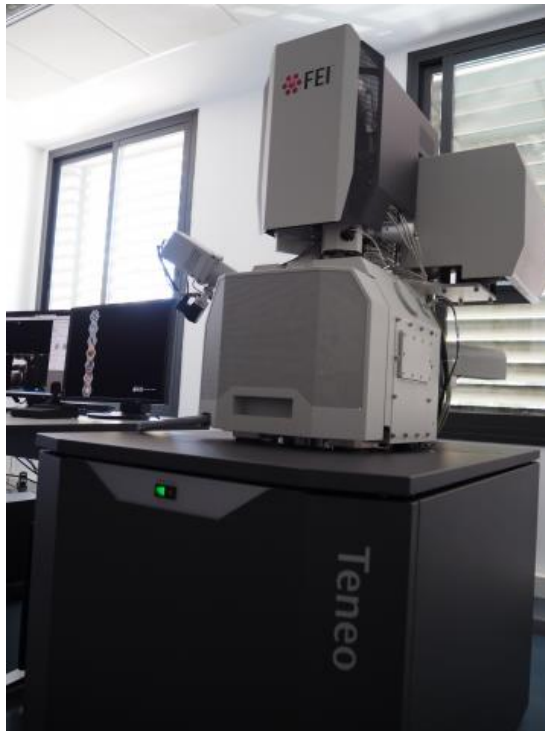


Figura 27: Imagen del microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE-SEM) FEI TENE0 usado para ver la composición de los discos [117].

Para poder realizar el análisis de los elementos que componen la muestra, es necesaria la emisión de rayos X una vez completada la interacción de los electrones del haz con los de la muestra. El microscopio de barrido empleado

incluía también un espectrómetro de dispersión de energía de rayos X (EDS, Energy Dispersive Spectrometer).

Para poder llevar a cabo este análisis fue necesaria la limpieza de las muestras, utilizando para ello etanol, posteriormente se secaron ambas superficies y se aplicó una cinta de carbón adhesiva conductora. Esta cinta conductora de energía eléctrica es necesaria para que la muestra emita electrones que luego captará el detector, ya que la muestra por sí sola no tiene propiedades conductoras. Una vez hecho esto se colocó sobre un portamuestras de aluminio.

El metalizador usado fue Scancoat Six (Fig. 28) (HHV Ltd, Crawley, Reino Unido), donde, mediante el procedimiento de pulverización catódica o *sputtering*, se fue depositando un recubrimiento de oro (electroconductor) sobre las superficies.



Figura 28: Imagen del metalizador Scancoat Six usado para aplicar la superficie de oro.

Las imágenes obtenidas se analizaron con el software EDAX TEAM versión 4.4.1 (AMETEK, Inc., Devon-Berwyn, Pensilvania, Estados Unidos), donde fueron analizadas áreas de 130 μm durante veinte segundos. Con este microanálisis obtuvimos resultados expresados en porcentaje de contenido de masa (wt %) de los elementos presentes en la superficie de los discos analizados.

C. Morfología de la superficie de los discos.

Para analizar la morfología de la superficie se utilizó también el microscopio electrónico de barrido (MEB) FEI TENEQ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) donde se detectó el electrón secundario (SE) usando para ello el detector Everhart-Thornley (ETD). Con este procedimiento se obtuvieron imágenes a un voltaje de aceleración de 2 Kv y a una magnificación de 200x con las que se obtuvo la información topográfica de los discos de ambos materiales. De cada una de estas imágenes se obtuvo el valor de la rugosidad media del material (S_a) a través de cinco mediciones aleatorias de las rugosidades presentes en la superficie de los discos de estudio.

D. Humectabilidad.

Además de las otras características de las superficies de los biomateriales analizados, es importante tener en cuenta la humectabilidad, que consiste en el análisis de la preferencia de un líquido para mantenerse en contacto sobre un sólido, estando a su vez rodeados de otro fluido (líquido o gas) [118]. Para conocer la humectabilidad de los dos materiales del estudio fue necesario calcular el ángulo de contacto promedio de los mismos.

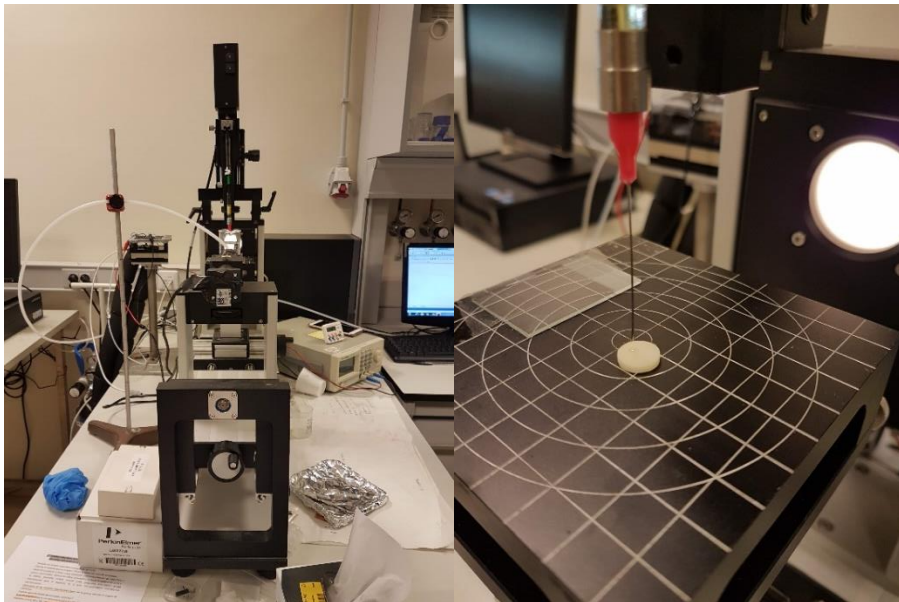


Figura 29: Imágenes tomadas del proceso de determinar la humectabilidad de los materiales estudiados en el goniómetro (vista frontal y vista detallada del proceso de gota sésil).

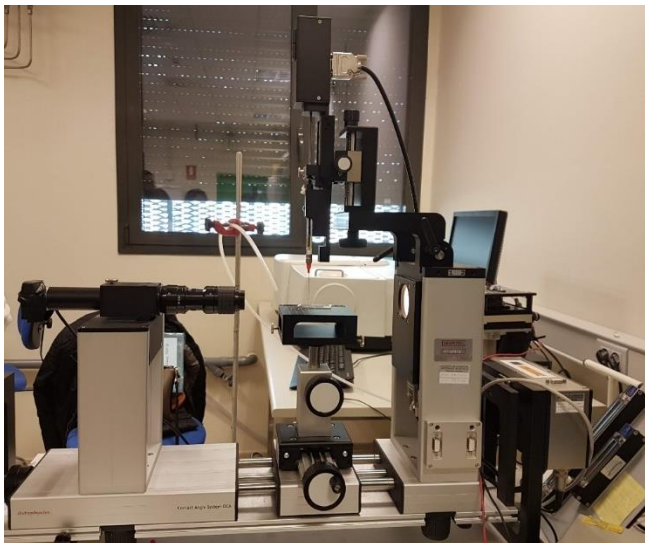


Figura 30: Imagen tomada del proceso de determinar la humectabilidad de los materiales estudiados en el goniómetro (vista lateral).

Para ello nos ayudamos del goniómetro OCA15pro de Dataphysics (Figs. 29 y 30) (DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Alemania), que cuenta con un microdispensador con una jeringa de 100 μL de volumen. Para el estudio se utilizó el método de gota sésil, que consiste en la aplicación de una gota (1 μL de volumen) sobre la superficie del sólido a analizar [119,120,121]. De esta forma, empleando el software SCA 20 versión 2.0. (DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Alemania) incluido en el goniómetro, se pudo fotografiar el momento justo del contacto entre líquido y sólido, permitiendo su evaluación en escala de grises.

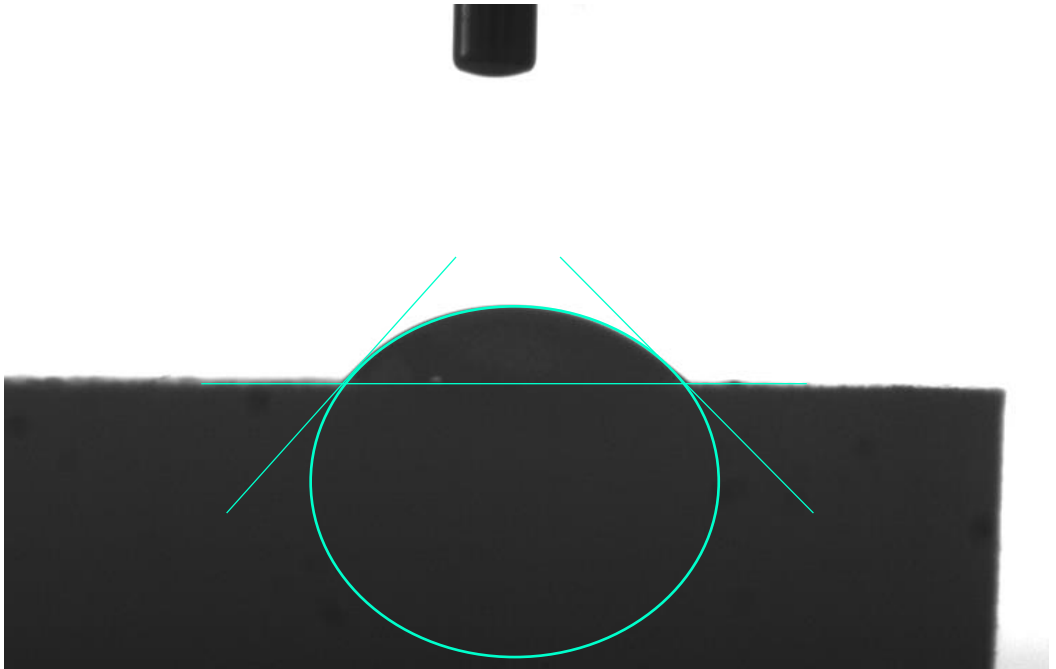


Figura 31: Ejemplo de ángulos de contacto formados mediante la técnica de gota sécil.

Automáticamente el software calcula el ángulo que se forma entre el líquido y el sólido al calcular su tangente formada en la interfase de triple confluencia gas-líquido-sólido. Se emplearon para el estudio un líquido polar (agua destilada desionizada) y un líquido que sirviera como componente dispersiva o no polar (diyodometano) [119,120], dado que cuentan con polaridades conocidas y diferentes entre sí como podemos ver en la siguiente tabla (Tabla 2).

Tabla 2: Valores de la tensión superficial, la componente polar y la componente dispersiva de los líquidos utilizados en el proceso.

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

Se aplicaron un total de tres gotas cada una de 1 μL de volumen sobre los discos de cada material de estudio, los cuales se posicionaron sobre el goniómetro tal y como podemos ver en la Fig. 31. Se esperaron cinco segundos antes de realizar la medición para permitir que la gota se estabilizara sobre la superficie (sin llegar a que permaneciese el tiempo suficiente como para permitir que el líquido se evaporara). Fue calculado entonces el ángulo de contacto del lado derecho e izquierdo de cada gota depositada sobre las superficies de estudio. Para establecer el promedio de los ángulos de cada lado se utilizó el método de Young-Laplace [121]. Las mediciones fueron llevados a una temperatura ambiente de 21 °C.

Con las mediciones de los ángulos de contacto de las seis gotas de líquido aplicadas sobre cada uno de los materiales, se calculó la media y la desviación estándar. Seguidamente, se pudo calcular la energía de superficie de cada material ayudados del modelo de Owens Wendt Rabel Kaebel (OWRK), que utiliza la siguiente fórmula (Fig. 32) [61, 101,119]:

$$\frac{(\cos \Theta + 1) \gamma_{\text{gas/liquid}}}{2 \sqrt{\gamma_{\text{gas/liquid}}^{\text{d}}}} = \sqrt{\gamma_{\text{gas/solid}}^{\text{d}}} + \frac{\sqrt{\gamma_{\text{gas/liquid}}^{\text{p}}}}{\sqrt{\gamma_{\text{gas/liquid}}^{\text{d}}}} \sqrt{\gamma_{\text{gas/solid}}^{\text{p}}}$$

Siendo:

- Θ = ángulo de contacto medio para agua y diyodometano.
- $\gamma_{\text{gas/liquid}}$ = energía superficial del líquido.
- $\gamma_{\text{gas/solid}}$ = energía superficial del sólido (dato desconocido).
- d = componente dispersivo.
- p = componente polar.

Figura 32: Ecuación del modelo de Owens Wendt Rabel Kaebel (OWRK) para calcular la energía de superficie.

5.2.3. Estudio visual, citomorfométrico y del cubrimiento de los discos cultivados.

Una vez concluida la caracterización de las superficies de los discos, se continuó el experimento con el cultivo de fibroblastos. Para ello se establecieron tres grupos de estudio:

- Grupo control: fibroblastos gingivales humanos cultivados sobre poliestireno.

MATERIAL Y MÉTODO

- Grupo LS₂: fibroblastos gingivales humanos cultivados sobre discos de cerámica vítrea de disilicato de litio.
- Grupo PMMA: fibroblastos gingivales humanos cultivados sobre discos de polimetilmetacrilato.

Se llevó a cabo entonces un estudio comparativo entre estos grupos experimentales donde se analizaron parámetros celulares (circularidad, número de células, tamaño medio del núcleo, circularidad del núcleo, longitud media del citoesqueleto...) así como el nivel de citotoxicidad y de secreción de colágeno tipo I. Todos estos análisis fueron llevados cabo a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la siembra de fibroblastos.

A. Cultivo celular.

Para el desarrollo de la parte celular del presente experimento utilizamos fibroblastos gingivales humanos (HGFs) (Innoprot, Bizcaia, España), los cuales fueron criopreservados en el primer pase por el distribuidor.

Una vez recibido el vial a una concentración de 5×10^5 células/mL se procedió a la descongelación progresiva del mismo. Para ello se utilizó en un primer lugar un cajón con hielo seco o nieve carbónica (dióxido de carbono en estado sólido) y una vez atemperado se introdujo en un baño a 37 °C (Fig. 33) (Ovan, Badalona, Barcelona, España) durante uno o dos minutos. Un tiempo excesivo puede llevar a que se generen efectos tóxicos por el crioprotector [122].



Figura 33: Baño térmico utilizado para atemperar a 37 °C.

Cuando el vial estuvo descongelado por completo se procedió a diluir 2 mL del volumen con células con 8 mL de medio de cultivo completo 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, Nuaille – Francia) (Fig. 34) por cada 500 mL de DMEM en un falcon de 15 mL de volumen (Nerbeplus GmbH, Luhe, Alemania).



Figura 34: Antibióticos y medio utilizados durante esta fase del experimento.

El falcon fue centrifugado en una centrífuga de laboratorio Beckman X-22R (Beckman Coulter, Indianapolis, Indiana, Estados Unidos) en unas condiciones de 300 RCF durante 5 minutos a una temperatura de 22 °C. Con este procedimiento se consigue separar el sobrenadante del pellet celular. Este último se resuspendió en 2 ml de medio completo.

Posteriormente, para poder cuantificar la concentración celular, fue usada la cámara de Neubauer (también conocida como hemocitómero) (OPTIK-Labor, Görlitz, Alemania) como técnica de conteo celular. Para llevar a cabo este procedimiento fueron recogidos 20 μ L de azul de tripán y otros 20 μ L del medio con las células resuspendido. Ambos volúmenes se introdujeron en un tubo de microcentrífuga y se resuspendieron con ayuda de una pipeta. Se recogieron entonces 10 μ L para colocarlos en la cámara de Neubauer (Fig. 35). Esta se trata de un portaobjetos especial protegida por un cubreobjetos convencional, donde se concentra la muestra por capilaridad.



Figura 35: Solución de azul de tripán y cámara de Neubauer usados para medir la concentración celular.

Al microscopio se pudo observar una cuadrícula dibujada con un total de dieciséis cuadrados en cada borde de la cuadrícula del portaobjetos (Fig. 36). Gracias a la tinción se podían distinguir las células viables. Se realizó un recuento manual de las células de la gradilla y mediante la siguiente fórmula se extrapolo el volumen total de células en el falcon (Fig. 37).

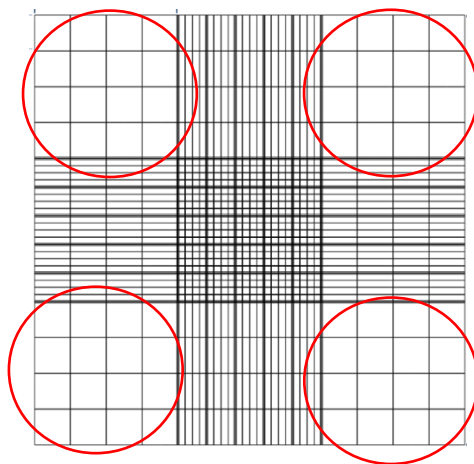


Figura 36: Imagen de la cuadrícula de la cámara de Neubauer que se observa al microscopio durante el conteo celular. Quedan marcadas en rojo las cuatro zonas de los bordes, a través de donde es posible el conteo celular.

MATERIAL Y MÉTODO

$$n^{\circ} \text{ céls/mL} \frac{x}{4} * 1000 * \text{vol total falcon}$$

Figura 37: Fórmula utilizada para calcular el volumen de células.

Siendo x el número total de células de los cuadros contados, 4 por las cuadrículas usadas para contar. Finalmente se multiplica por el volumen total del falcon, en este caso 2 mL, donde fueron resuspendidas las células.



Figura 38: Imágenes del exterior e interior del incubador de CO2 Nuair US AutoFlow NU-4750-E.

Con el resultado se fue sembrando un volumen ajustado de 5×10^5 céls/mL en cada uno de los frascos de T75 (frasco o contenedor de 250 mL de volumen). En cada uno de los frascos nos encontramos con un volumen total de 10 mL, donde 1 mL se correspondía con el volumen celular y los restantes 9 mL se correspondían con el volumen de medio. Tras la siembra de las células se dejó el frasco en un incubador de CO₂ Nuairé US Autoflow NU-4750-E (Nuairé, Plymouth, Minnesota, Estados Unidos) (Fig. 38) al 5 % CO₂, 95 % aire a 37 °C durante 2-3 horas para que, transcurrido ese tiempo, pudiera comprobarse la adhesión inicial en un microscopio invertido de contraste de fases (Olympus CKX41, Tokio, Japón) (Fig. 39).



Figura 39: Microscopio óptico Olympus CKX41, imagen lateral y frontal respectivamente.

Se fue cambiando el medio de cultivo cada 48 horas aproximadamente y una vez alcanzada al menos el 90 % de confluencia, tal y como recomienda el fabricante, las células fueron levantadas con ayuda de alícuotas de tripsina al 1x de Trypsin-EDTA 10x (Biowest, Nuaille – Francia). Este proceso de subcultivo o pasaje celular tuvo lugar a la semana aproximadamente de la siembra. Se desarrolló retirando en un primer lugar el medio de cultivo, para luego lavar la zona con DPBS 1x (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, Biowest, Nuaille, Francia) (Fig. 40) previamente atemperado a 37 °C, que sería retirado antes de llevar a cabo la tripsinización o levantamiento de la monocapa. Este procedimiento consiste en la separación de las células del sustrato de cultivo (en este caso los frascos) ayudados de la tripsina, proteasa de la degradación de las adhesinas celulares, lo que lleva a disrumpir las conexiones célula-célula o célula-matriz [123].

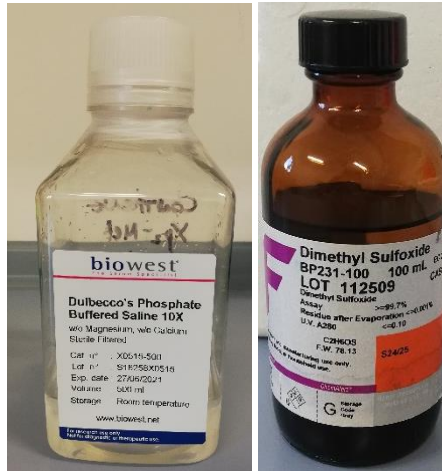


Figura 40: Frascos de DPBS (izquierda) y DMSO (derecha), utilizados durante el cultivo y la criopreservación fibroblástica.

Durante el tiempo de acción de la tripsina al 0,25 %, el frasco se mantuvo en la incubadora. Pasado este tiempo se comprobó en el microscopio óptico invertido que las células estuvieran despegadas del sustrato antes de introducir DPBS al 1x en cada frasco con el fin de inactivar la tripsina.

Seguidamente se recogió el contenido del frasco y se traspasó a un falcon de 15 mL para llevar a cabo el proceso de centrifugado. Del mismo modo ya descrito, se resuspendió el pellet con medio de cultivo completo, destinando una parte a la nueva siembra sobre frasco T75, reservando el resto del volumen para su criopreservación.

Con el volumen reservado se fueron creando alícuotas en criotubos de 2 mL (ClearLine, DD Biolab, Barcelona, España). En ellos fue colocado por cada 1 mL de medio con células, 0,9 mL de Dimetil-sulfóxido (DMSO) (Fisher Scientific, Hampton, Nuevo Hampshire, Estados Unidos) (Fig. 40). Este agente crioprotector es un solvente hidrosoluble que atraviesa la célula e impide la formación de cristales de hielo en su interior durante el proceso de criopreservación [116,122].

Este proceso debe ser escalonado, al igual que el proceso de descongelación, donde se debe reducir el tiempo de exposición del DMSO a las células, ya que este compuesto puede llegar a ser tóxico [122]. La criopreservación comienza con un proceso de pre-congelación donde los criotubos fueron colocados en un primer lugar en un refrigerador a 4 °C (fase de preenfriamiento), luego a un congelador a -20 °C (congelación rápida) y finalmente a un ultracongelador a -90 °C donde se mantuvieron durante 24 horas hasta ser pasadas

a un tanque de nitrógeno líquido VE XC47/11-6 (Chart Industries, Inc., Ball Ground, Georgia, Estados Unidos) (Fig. 41) a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Figura 41: Secuencia fotográfica del procedimiento de recogida de los criotubos de células criopreservadas en el tanque de nitrógeno líquido.

B. Siembra sobre los discos.

Para sembrar células sobre los discos de estudio previamente limpiados con etanol al 70 % y tras haber pasado por la desinfección mediante flujo laminar en una cabina de seguridad biológica clase II A MSC Advantage (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), los discos fueron fijados con esmalte a una mini placa de Petri estéril, la cual se colocó a su vez sobre una placa de Petri de mayor tamaño.

MATERIAL Y MÉTODO

Las células usadas en el experimento se encontraban entre el séptimo y noveno pase. Siempre que se llevó a cabo una fase de manejo de los fibroblastos en la cabina biológica de flujo laminar, la superficie de trabajo de la cabina, así como todos los materiales que fueran a ser utilizados, se desinfectaron con ayuda de etanol absoluto.

Estas cabinas reciben este nombre porque la esterilidad de la zona de trabajo depende del flujo laminar de aire, es decir, aquel carente de turbulencias donde se puedan retener partículas indeseadas. Este aire es estéril gracias a unos filtros denominados filtros HEPA (*high efficiency particulate air*) que se colocan para que se retengan todas las partículas mayores a $0,2 \mu\text{m}$ [116,122].

Fueron utilizados dos discos de cada uno de los materiales por cada experimento, sumando un total de dieciséis, ya que el experimento se repitió cuatro veces. En cada uno de los discos se cultivaron $40 \mu\text{L}$ de volumen con una concentración de 1×10^4 células previamente calculada. A continuación, se comprobó la adhesión celular inicial de los controles (poliestireno de las placas de Petri) con ayuda del microscopio invertido. Comprobado esto se colocó medio hasta el borde los discos cuidadosamente con una pipeta.

Una vez hecho esto se cerraron las placas de Petri y se colocaron en la estufa de CO_2 Galaxy 170 (New Brunswick Scientific Co., Inc., Enfield, Connecticut, Estados Unidos) durante las 24 horas previas a la tinción inmunohistoquímica.

C. Tinción inmunohistoquímica: inmunofluorescencia directa.

La técnica de tinciones inmunohistoquímicas (IHQ) o inmunocitoquímicas (ICQ) se basa en detectar y localizar antígenos (Ag) de la célula o tejido utilizando para ello un anticuerpo específico. En el presente fue utilizada la técnica de inmunofluorescencia múltiple donde el antígeno se uniera de forma directa al anticuerpo, ya que se pretendía detectar más de una estructura celular al mismo tiempo, pudiendo visualizarlas al microscopio confocal.

Para ser capaces de detectar esta unión Ag-Ac se utilizan unas moléculas fluorescentes o fluorocromos que se conjugan con los anticuerpos. Estas moléculas son capaces de absorber y emitir una radiación luminosa a una longitud de onda determinada [116] En el caso del presente estudio fueron utilizados dos fluorocromos cuyo espectro de absorción y emisión de luz aparecen detallados en la siguiente tabla (Tabla 3):

Tabla 3: Espectros de absorción y emisión máximos de los fluorocromos utilizados en el experimento.

Fluorocromo	Longitud de onda (λ) absorción máx. (nm)	Longitud de onda (λ) emisión máx. (nm)
DAPI	360	460
Faloidina	485	535

Este estudio analizó el núcleo y el citoesqueleto de los fibroblastos, para el primero la tinción fluorescente utilizada fue DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) (Vectashield, Vector Laboratories Inc., California, Estados Unidos) (Fig. 42). Este fluorocromo presenta gran afinidad por las regiones ricas en Adenina-Timina (A-T) del ADN, a las que se une mediante interacciones electrostáticas, lo que lo convierte en un excelente marcador nuclear. Al unirse al ADN del núcleo se genera la fluorescencia, que podemos percibir mediante la emisión de un intenso color azul al ser excitada mediante láser de argón [124,125].

Para la tinción del citoesqueleto el fluorocromo empleado fue la faloidina Acti-stain 488 Fluorescent Phalloidin (Cytoskeleton, Inc., Denver, Colorado, Estados Unidos) (Fig. 42), el cual emite una tinción de color verde al visualizarlo en el microscopio tras ser excitado. Este fluorocromo se trata de una toxina heptapéptida de origen micrótico (*Amanita phalloides*) que es capaz de unirse de forma específica y con alta afinidad a la forma polimérica de la actina (Actina F). De esta forma es capaz de unirse a los filamentos actínicos del citoesqueleto.

MATERIAL Y MÉTODO



Figura 42: Imágenes de las tinciones DAPI (izquierda) y faloidina (derecha) usadas para la visualización del crecimiento celular temprano al microscopio.

Transcurridas las 24 horas de incubación celular sobre los discos y las superficies controles, el medio fue aspirado para lavar seguidamente la superficie con 500 μL de DPBS. Seguidamente, se fijó la superficie celular con 15 μL de paraformaldehído al 4% en DPBS (AppliChem GmbH, Darmstadt, Alemania) y se dejó actuar durante 10 minutos.

Después de ese tiempo, se retiró el producto y se volvió a lavar la superficie de los discos con DPBS. Antes de colocar los fluorocromos, se aplicaron 5 μL de del detergente Tritón X-100 0,1% en DPBS (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos) con el fin de permeabilizar la membrana extracelular de los fibroblastos y que luego pudieran penetrar las tinciones en el interior de la célula. Pasados cinco minutos se aspiró la superficie y se volvió a lavar con DPBS.

Después del lavado se colocaron 15 μL seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos) al 1%, agente bloqueante que se usó para evitar la unión inespecífica a otros componentes celulares que no fuesen los del estudio. Pasados veinte minutos desde su aplicación se retiró el producto y se procedió a la aplicación de las tinciones IHQ.

En primer lugar, se aplicaron 15 μL de faloidina en cada disco; esta fue reconstituida en un primer lugar con metanol puro y posteriormente con DPBS. Se dejó actuar durante treinta minutos, manteniendo los discos en oscuridad y a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo se lavó la superficie de los discos con DPBS en tres ocasiones, para luego aplicar 15 μL de DAPI (incorporado en el medio Vectashield® (Vector Laboratories, Inc., Newark, California, Estados Unidos)). El sobrante fue retirado con ayuda de un papel absorbente, para luego poder

colocar un cubre objetos de Menzel-Gläser (Menzel GmbH, Braunschweig, Alemania). Este tipo de cubreobjetos es circular y, en el caso del presente estudio, tenía 8 mm de diámetro.

Una vez hecho esto se procedió a despegar los discos de las placas de Petri y a recortar la zona de las placas que fueron utilizadas como controles, obteniendo de este modo discos de poliestireno circulares. Los discos fueron colocados sobre un portaobjetos Menzel-Gläser (Menzel GmbH, Braunschweig, Alemania) y conservados a 4 °C de temperatura durante 24 horas. Después de eso se fijaron los bordes de los cubreobjetos con esmalte de uñas para la posterior visualización en el microscopio confocal. Se pueden observar los pasos del experimento resumidos a continuación (Fig. 43):

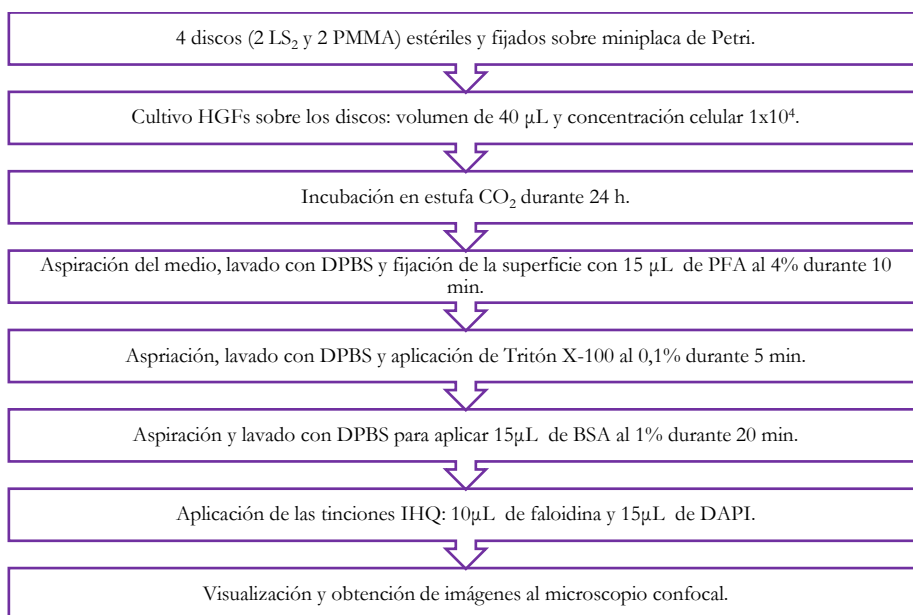


Figura 43: Diagrama de los pasos seguidos para obtener las imágenes usadas en la citomorfometría.

D. Obtención de las imágenes

Para obtener las imágenes de las muestras se usó el microscopio confocal Zeiss LSM 7 DUO (Carl Zeiss, Jena, Alemania) (Fig. 44). Este tipo de microscopio escanea las muestras con un haz de láser y elimina la señal de fluorescencia que emite la muestra fuera del plano de foco, obteniendo una imagen de gran resolución (Montuenga). El microscopio Zeiss LSM 7 DUO trabaja con una unidad de epifluorescencia Excite 120PC.



Figura 44: Microscopio confocal Zeiss LSM 7 DUO.

Las imágenes fueron tomadas de manera segmentada según cinco regiones de interés o RDI (ROI por sus siglas en inglés) en cada disco: noroeste, noreste, centro, sudoeste y sudeste. El área de cada región de interés fue determinada con la siguiente fórmula: $A = \pi r^2$. De esta forma se obtuvo que cada RDI era de $6,28 \text{ mm}^2$ y que el área total analizada fue de $31,4 \text{ mm}^2$ en cada disco.

Para la visualización del citoesqueleto se utilizó un filtro de excitación FITC con una longitud de onda de 480 nm y una emisión recogida de 535 nm . Para los núcleos se utilizó un filtro DAPI con una excitación de 353 nm y una emisión de 458 nm , tal y como indica el fabricante. Los objetivos empleados fueron Plan-Apochromat de $20\times/0,8$ y $40\times/1,30$ Oil DIC (Differential Interference Contrast), usando para su visualización y análisis el software Zen Lite 2012 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemania).

Ninguna de las muestras estuvo expuesta al láser un tiempo superior a cinco minutos, con el fin de evitar el fotoblanqueamiento o extinción irreversible de la fluorescencia de un fluorocromo por exposición excesiva al láser.

E. Análisis visual de las imágenes procesadas

Las imágenes obtenidas en el microscopio confocal fueron en un primer momento visualizadas antes de su procesamiento. De esta manera, se pudo comprobar el volumen celular y morfología de las estructuras celulares (núcleo y citoesqueleto) para así poder contrastar estos datos con los obtenidos tras procesar las imágenes.

Estas estructuras son las que posteriormente serán analizadas para obtener los datos citomorfométricos que a continuación se explicarán. De esta forma, se

compararon los tres grupos de estudio (control, LS₂ y PMMA) a las 24 horas de la siembra sobre sus superficies.

F. Procesamiento de las imágenes para análisis citomorfométrico.

Las imágenes obtenidas mediante la microscopía confocal se guardaron en formato .tif (TIFF, *Tagged Image File Format*) con una resolución de 2048 x 2048 píxeles a 8-bit. Una vez se coleccionaron todas ellas, se utilizó el programa informático ImageJ (*Image Processing and Analysis in Java*) v1.50e (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Estados Unidos) para su procesamiento.

Por un lado, se utilizaron las imágenes obtenidas con un objetivo 20x para procedió a cuantificar el número de células halladas sobre los discos, y por otro, con las imágenes obtenidas con un objetivo de 40x se evaluaron tanto la morfología de los fibroblastos como la distancia del eje mayor de los citoesqueletos de los fibroblastos. Todas las imágenes fueron pasadas en un primer momento a 8-bit siguiendo los pasos siguientes: Image – Type – 8-bit.

Antes de comenzar el procesamiento de las imágenes se calibraron cada una de ellas en base a la escala aportada por el microscopio. Una vez hecho esto, cada imagen obtenida a 20x se separó en canales RGB (rojo, verde y azul de sus siglas en inglés *red, green, blue*). Para ello fueron utilizados los comandos *Image → Colors → Make composite*; seguido de *Image → Color → Split channels*. Seguidamente se procedió a tomar la imagen azul para establecer un umbral automático a partir de una imagen binaria con el fin de identificar los núcleos. Para lo que se usaron los comandos *Image → Adjust → Threshold → Auto* [126].

Seguidamente se aplicaron los comandos *Process → Binary → Watershed* con el fin de separar aquellos núcleos que pudieran encontrarse unidos para que el software fuera capaz de detectarlos de manera independiente. Finalmente se determinó que el tamaño mínimo de un núcleo para que pudiera ser identificado fuera de 5 μm^2 mediante el comando *Analyze → Analyze Particles*. Parte de este proceso puede observarse en las siguientes imágenes (Fig. 45).

MATERIAL Y MÉTODO

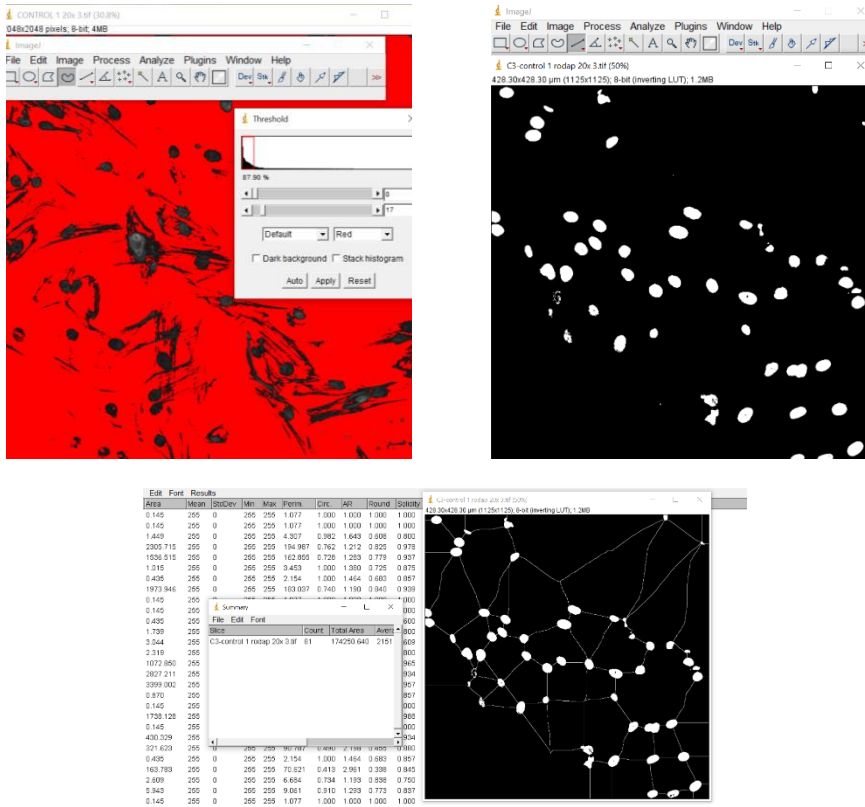


Figura 45: Ejemplo del procesamiento de una imagen a 20x para separar los núcleos del resto de la imagen en el programa informático ImageJ.

De esta sencilla forma computarizada por el software de ImageJ, se utilizó de nuevo el parámetro anterior (*Analyze particles*) para poder analizar los siguientes parámetros del núcleo (además del conteo celular):

- Tamaño medio del núcleo (μm^2).
- Porcentaje del disco cubierto por núcleos (%).
- Circularidad del núcleo.

Por un lado, la circularidad se trata de un parámetro adimensional que viene definido por la fórmula de la figura 46. Es un parámetro del núcleo cuyo valor se encuentra siempre entre 0 y 1, correspondiéndose el valor 0 con aquellas formas alargadas y el valor 1 con aquellas células con forma de círculo. Los valores más cercanos a 0, por tanto, se corresponden con células más alargadas, y los más cercanos a 1, con aquellas más redondeadas [127,128].

$$Circularidad = \frac{4\pi (\text{Área})}{\text{Perímetro}^2}$$

Figura 46: fórmula matemática mediante la cual se obtiene la circularidad del núcleo.

El conteo celular, el tamaño medio del núcleo y el porcentaje del disco cubierto por núcleos, ayudan a controlar el tipo de crecimiento que tiene lugar sobre cada material. El primero es útil si extrapolamos que, a mayor número de células, mejor se comporta el material a su contacto; el tamaño junto al porcentaje del disco cubierto ayuda a conocer la fase celular en la que se encuentra.

Otros parámetros celulares que también se analizaron con este software fueron los siguientes:

- Longitud media del eje mayor del citoesqueleto (μm).
- Perímetro celular (μm).
- Área celular (μm^2).

En el caso del primero de todos ellos, se utilizó la medición de tres células escogidas de manera aleatoria en cada una de las imágenes a 40x*oil*. Para ello se volvieron a utilizar las herramientas previamente descritas para separar las imágenes en colores RGB (*Image* \rightarrow *Colors* \rightarrow *Make composite*; seguido de *Image* \rightarrow *Color* \rightarrow *Split channels*) (Fig. 47) y se utilizó la parte verde de la imagen, que se corresponde con el citoesqueleto. Seguidamente, utilizando la herramienta de regla se fueron obteniendo los datos.

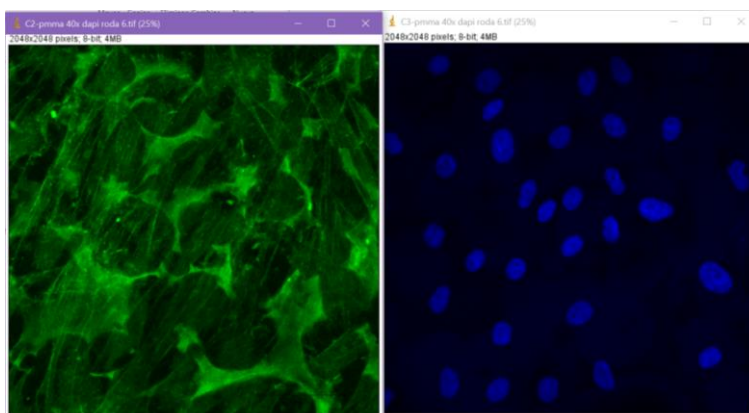


Figura 47: Ejemplo del procesamiento de una imagen a 40x según los canales RGB para poder separar los citoesqueletos (verde) del resto de la imagen con ayuda del programa informático ImageJ.

MATERIAL Y MÉTODO

Finalmente, siguiendo el mismo procedimiento, el área y el perímetro celular fueron medidos utilizando tres células aleatorias de cada imagen a 20x. Estas mediciones fueron llevadas a cabo mediante la herramienta de medición manual.

5.2.4. Estudio de citotoxicidad del material.

En el presente estudio se evaluó el nivel de citotoxicidad de los dos materiales analizados. Para ello nos basamos en la norma ISO 10993-5:2009 de Evaluación biológica de dispositivos médicos parte 5: test de citotoxicidad *in vitro* [129]. Seguir las pautas de esta organización internacional sirve para estandarizar los resultados obtenidos y poderlos así comparar de una forma eficiente.

La Organización Internacional de Estandarización (ISO) presenta en su normativa tres formas *in vitro* de analizar la citotoxicidad de un material. Siendo estas: por extractos, a través del contacto directo con el material de estudio o mediante contacto indirecto. En el presente estudio se eligió el uso del análisis de la viabilidad celular mediante contacto directo.

Se optó por el test de MTT, el cual aparece descrito en el anexo C de la norma ISO 10993-5:2009, el cual se basa en la medición de la viabilidad celular a través de la actividad metabólica de este test colorimétrico.

El MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliobromido) (Fig. 48) es una sal tetrazol de color amarillo soluble que queda reducida metabólicamente por la deshidrogenasa succinato (SDH) mitocondrial presente en las células viables, produciendo el formazán, sal de color azul-violáceo, que no puede cruzar la membrana plasmática y se acumula en las células [129-134]. El formazán se acumula sobre el material a modo de precipitado insoluble que genera cristales violáceos [134].

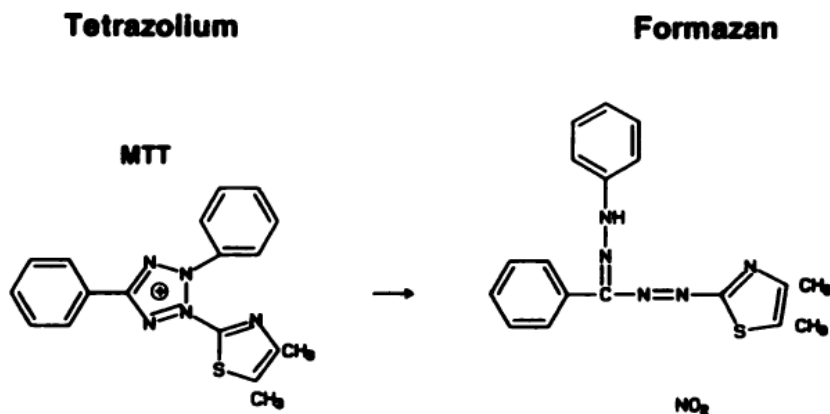


Figura 48: Estructura química del tetrazol (izquierda) y del producto formazán (derecha).
Imagen tomada de Scudiero y cols [132].

Los cristales de formazán son disueltos con ayuda de un detergente, para que una vez disueltos, se puedan realizar mediciones fotométricas, donde se obtiene una relación lineal entre la cantidad de células viables y la intensidad de color recogida (es decir, cantidad de formazán). La viabilidad se determina, por tanto, en función a la actividad de la enzima mitocondrial [134].

A. Preparación de los discos.

Para el desarrollo de esta parte del estudio fueron necesarios cuatro discos de cada material por cada uno de los tramos analizados (a las 24, a las 48 y a las 72 horas). Para ello los discos fueron adaptados en unos tubos de microcentrífuga (Fig. 49) de poliestireno de 1,5 mL. Estos fueron recortados por la zona de su base redondeada, ajustando los discos en el hueco y sellando la periferia con esmalte de uñas para impedir la filtración de las células.

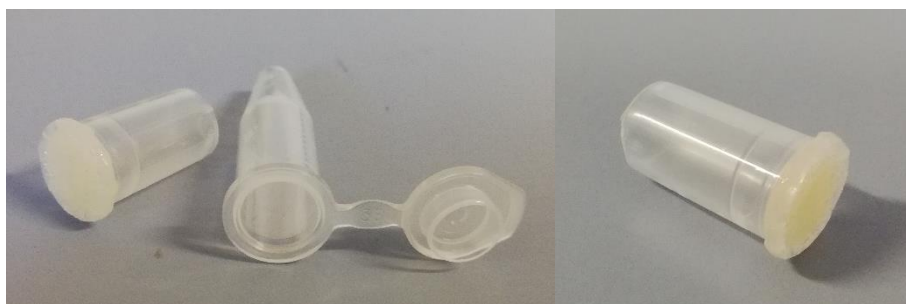


Figura 49: Adaptación de los tubos de microcentrífuga alrededor de los discos de cada material para procurar un aislamiento correcto de los mismos, evitando el filtrado al exterior del medio usado.

Por otro lado, fue utilizada una placa de 48 pocillos de poliestireno para cada uno de los cuatro controles de cada espacio de tiempo estudiado, así como los cuatro blancos (Fig. 50 y 51).

Como en las fases anteriores, los discos fueron desinfectados primero con etanol absoluto y posteriormente esterilizados en la cabina de flujo laminar mediante la exposición a rayos UV-C durante treinta minutos por cada uno de los lados.

	24 h				48 h				72 h				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													<u>Controles</u>
B													
C													<u>LS₂</u>
D													<u>PMMA</u>
E													<u>Blancos</u>
F													

Figura 50: ilustración representativa de la distribución de los discos en los pocillos en la placa de poliestireno para analizar la citotoxicidad. De este modo, aparecen cuatro columnas por cada franja de tiempo (24, 48 y 72 horas) y dentro cada franja podemos ver como las filas A y B se corresponden con los controles sobre el pocillo, la C con los discos de LS₂, la D con los discos de PMMA y, por último, las filas E y F se corresponden con los blancos.

B. Cultivo celular.

Al igual que en la fase de cultivo celular desarrollada para el análisis citomorfométrico de fibroblastos, los fibroblastos fueron sembrados en un primer lugar en frascos de T75, donde se preservaron en medio DMEM completo. Por cada 500 mL de medio se suplementó con 10 % de suero fetal bovino y 1 % de glutamina-penicilina-estreptomina.

Tal y como aconseja la norma ISO [129] los cultivos celulares sobre frascos de T75 (siguiendo la misma sistemática que en la fase de cultivo celular desarrollada para el análisis citomorfométrico de los fibroblastos), fueron levantados mediante tripsina/EDTA al 1 x al llegar al 80 % de confluencia. En este caso las células utilizadas se encontraban entre el segundo y octavo pase. La resuspensión se realizó con medio de cultivo MEM (Medio Esencial Mínimo) (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) (Fig. 51), carente de suplementos o rojo fenol y la suspensión fue centrifugada a 200 g durante tres minutos.



Figura 51: imágenes de MEM (1), placa de 48 pocillos (2) y placa de 96 pocillos (3).

Se calculó una siembra de una densidad celular de 1×10^5 , que se correspondían con 300 μL por cada pocillo (controles) y sobre cada disco. Los cuatro pocillos utilizados como blancos contenían 300 μL de MEM. Podemos observar en la siguiente figura la distribución de los pocillos en la placa de 48 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos).

Las muestras fueron incubadas durante 24 horas en una incubadora de CO_2 a unas condiciones de al 5 % CO_2 , 95 % aire a 37 °C hasta comenzar el experimento.

C. Técnica paso a paso.

Para el análisis de MTT fue utilizado el kit de ensayo de la proliferación celular ab211091 (Abcam, Cambridge, UK), el cual está compuesto por un bote de reactivo de MTT y otro de disolvente. El kit de MTT se mantuvo a -20 °C, siguiendo las indicaciones del fabricante. Para desarrollar el experimento se crearon alícuotas de cada uno de los productos después de ser atemperados. Las alícuotas contenían 5 mL del reactivo y 15 mL del disolvente.

Seguidamente se aspiró el medio de cada uno de los pocillos, para luego añadir 100 μL de reactivo de MTT y otros 100 μL de MEM por pocillo. Hecho esto, se mantuvieron las placas en un agitador orbital Grant Bio PS-M3D 3D (Keison Products, Chelmsford, Essex, Reino Unido) (Fig. 52) durante tres minutos a 360 rpm con el fin de mezclar ambas sustancias.

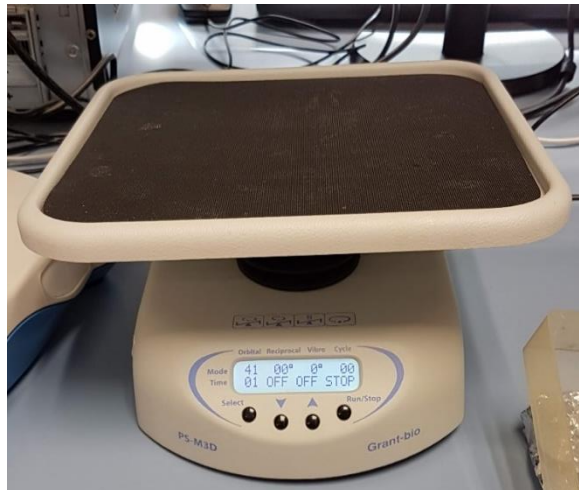


Figura 52: Agitador orbital utilizado en el estudio.

MATERIAL Y MÉTODO

Una vez mezcladas, se envolvieron las placas de 48 en papel de aluminio, con el fin de mantenerlas en oscuridad al tiempo que se mantuvieron en la incubadora de CO₂ durante tres horas. Pasado este tiempo pudimos visualizar al microscopio los cristales de formazán creados en los pocillos de los controles. Se añadieron entonces 300 μ L del disolvente en cada uno de los pocillos para, de este modo, poder diluir los cristales que se habían generados.

Se agitaron entonces las placas durante quince minutos en el mismo agitador orbital (estando cubiertos en todo momento mientras se producía la disolución). Pasado este tiempo pudimos comprobar que el volumen final de cada uno de los pocillos fue de 500 μ L, de los cuales fueron traspasados 250 μ L de cada pocillo de la placa de 48 a una placa de 96. Se mantuvo la misma distribución de muestras, controles y blancos con el fin de no inducir ningún error.

La placa de 96 pocillos (Fig. 51) fue llevada al espectrofotómetro del lector de microplacas Synergy HT (Biotek, Winooski, VT, Estados Unidos) (Fig. 53) para medir la absorbancia a 590 nm tal y como indica la norma ISO [129].

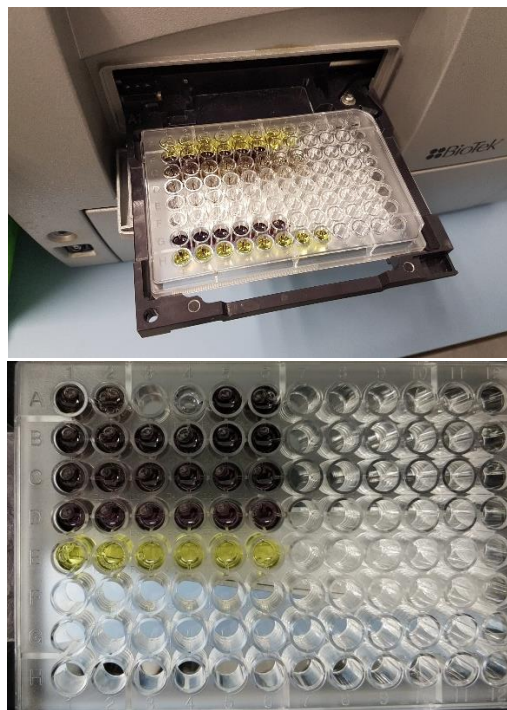


Figura 53: Imágenes la placa de 96 pocillos al ser analizada en el espectrofotómetro.

La espectrofotometría es un método de análisis óptico mediante el cual se mide el nivel de absorbancia de una muestra [135]. Los lectores de placa con espectrofotómetro miden los niveles de absorbancia de un material a través de una

lámpara de flash de xenón y un monocromador (dispositivo óptico que sirve para medir la distribución de longitudes de onda en un rango de 200 a 900 nm). Las moléculas de la muestra absorben una longitud de onda específica que se puede medir al cuantificar la absorbancia, la cual se mide en unidades de densidad óptica (OD) cuyo valor puede oscilar de 0 a 4 OD [136,137]. La densidad óptica se trata de una medida que relaciona la luz transmitida o reflejada y la luz incidente [138].

De este modo, cuanto mayor sea el nivel de absorbancia, mayor será la cantidad de formazán producido y, por tanto, mayor será la viabilidad del material analizado.

El procedimiento se repitió a las 48 h y 72 h, tal y como se puede ver reflejado en el siguiente diagrama resumen del experimento de viabilidad celular con MTT (Fig. 54).

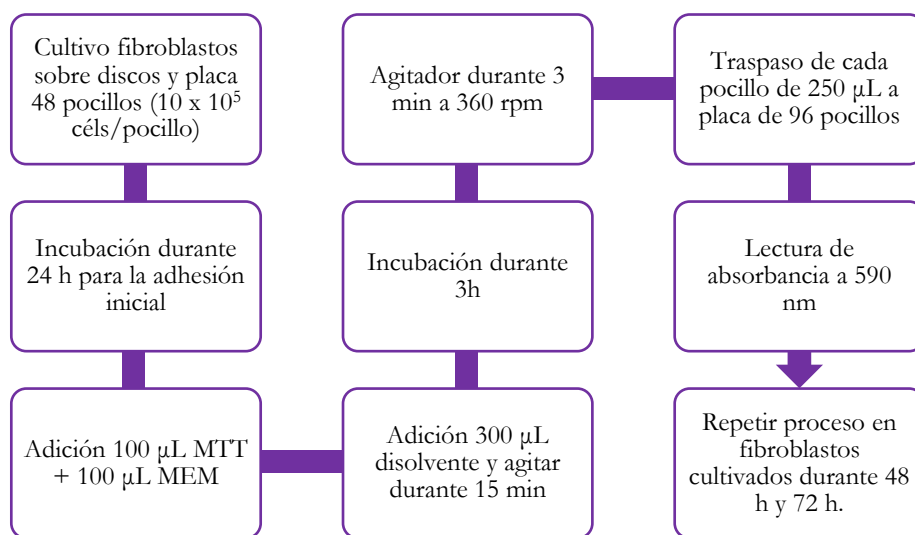


Figura 54: Diagrama de las fases del experimento de citotoxicidad de los materiales con MTT.

D. Procesamiento de los datos.

Para poder medir los niveles de absorbancia fue utilizado el programa informático Gen5 1,11 (Biotek, Winooski, Vermont, Estados Unidos) en conjunción con el espectrofotómetro (Fig. 56). Para poder exportar una tabla con los valores resultado en Excel fueron necesarios insertar los siguientes comandos: *Read plate* → *Plate type: 96* → *Add step* → *Read. Detection Method* → *Absorbance, Wavelengths* → 590 nm, *Full plate* → *seleccionar los pocillos ocupados (A1-H8)* → *Ok*.

MATERIAL Y MÉTODO

Una vez obtenidos los datos se obtuvo la media de los valores de absorbancia, además de que se tuvieron que sustraer los valores de la absorbancia obtenida en los blancos al resto de valores de las muestras y controles para, de esta manera, normalizar los valores.

La norma ISO 10993-5 establece unos valores de viabilidad menores al 70 % de los blancos, se corresponden con el valor de un material citotóxico [129]. Para obtener los valores de absorbancia se le otorgó un valor del 100 % de viabilidad al control, obteniendo los valores del material en base a eso. De esta forma, se considera que cuanto mayor es el valor de porcentaje obtenido, mayor será la citotoxicidad del material analizado.

Para calcular la viabilidad en porcentaje nos basamos en la siguiente ecuación (Fig. 55), la cual divide la absorbancia promedio de las muestras entre la absorbancia promedio normalizada del control y luego multiplicarlo por cien:

$$\% \text{ de Viabilidad} = \frac{\text{promedio del tto.} - \text{Promedio del blanco}}{\text{Promedio del control negativo} - \text{Promedio del blanco}} \times 100$$

Figura 55: Fórmula para obtener el porcentaje de viabilidad del material de estudio [134], donde: promedio del tratamiento es la absorbancia promedio obtenida con el tratamiento; promedio del blanco es la absorbancia promedio obtenida del blanco y promedio del control negativo es la absorbancia obtenida del control negativo.



Figura 56: Espectrofotómetro con lector de microplacas para analizar la absorbancia de los materiales.

5.2.5. Estudio de la secreción de colágeno tipo I.

La técnica ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assays*) es una de las pruebas de laboratorio más comúnmente utilizadas. Este tipo de análisis se basa en la relación antígeno-anticuerpo para medir la concentración de un analito en una determinada solución, obteniendo resultados con gran especificidad y sensibilidad [139].

Para poder valorar la actividad de los fibroblastos del estudio, se utilizó un kit de ELISA específico para la detección de colágeno tipo I (COL1) (Human Collagen Type I ELISA Kit MyBioSource, San Diego, California, Estados Unidos) (Fig. 57).



Figura 57: Kit de ELISA para la detección de colágeno tipo I empleado en el experimento.

Este kit está basado en la técnica de ELISA tipo sándwich doble anticuerpo, siendo esta una técnica con alta especificidad [140]. Para su desarrollo se emplea una placa de micropocillos sensibilizados cada uno de ellos con anticuerpos monoclonales primarios de captación, específicos para detectar un epítipo concreto del antígeno (colágeno liberado al medio de cultivo).

Se coloca entonces el medio donde se encuentra el colágeno liberado por los fibroblastos cultivados con el fin de que se una a los anticuerpos primarios de captación. Posteriormente se lava cada pocillo para eliminar los anticuerpos que no estén unidos al COL1. A continuación, se aplica anticuerpo primario policlonal de detección, el cual está marcado con un complejo biotina. Este segundo anticuerpo debe tener afinidad por un epítipo distinto del antígeno para evitar el solapamiento entre el anticuerpo de detección y el de captación.

El siguiente paso consiste en retirar el sobrenadante y lavar los pocillos con el fin de poder eliminar el exceso de anticuerpos, es decir, aquellos que no se unieron al Ag. Una vez hecho esto, es necesario aplicar un anticuerpo secundario, el cual es específico para el anticuerpo primario de detección. Este paso se consigue obteniendo anticuerpos de especies distintas, con el fin de que este anticuerpo secundario no se una al Ac de captación [141-143]. Para ello, en el caso de este kit, el Ac de captación es de conejo y el de detección procede del ratón.

El anticuerpo secundario está unido mediante enlace covalente a la enzima peroxidasa HRP (por su nombre en inglés *Horseradish Peroxidase*) o peroxidasa de

MATERIAL Y MÉTODO

rábano, dando lugar a la unión adivina-HRP, siendo la adivina el anticuerpo que se unirá al anticuerpo de detección.

Después de eso se vuelven a lavar los pocillos para eliminar de nuevo los anticuerpos que no se unieron, para luego añadir el sustrato cromogénico TMB (3,3',5,5'-tetra-metil-benzidina), buffer ligeramente ácido, dado que contiene peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este sustrato forma un precipitado de color azul al catalizar la peroxidasa. Luego, como consecuencia de la aplicación de ácido sulfúrico, pasa a convertirse en color amarillo.

Este cambio colorimétrico es el que se detecta en el espectrofotómetro. De esta forma, se interpreta una mayor intensidad del color como una mayor concentración de colágeno tipo I en las muestras, es decir, cuanto mayor sea la absorbancia, mayor será la producción de los fibroblastos. A continuación, se muestra un esquema de la técnica de ELISA de sándwich a doble antígeno (Fig. 58).

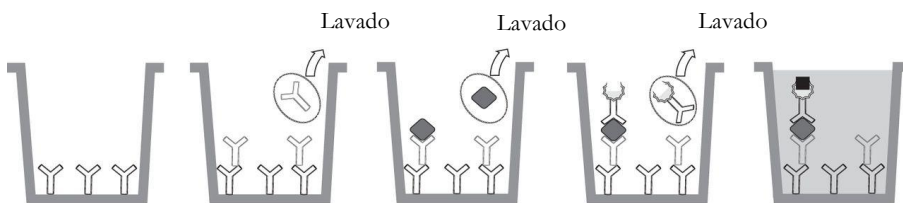


Figura 58: esquema de la técnica ELISA de sándwich a doble antígeno. (1) anticuerpos de captura inmovilizados sobre la placa, (2) adición de un antígeno específico para el anticuerpo y posterior lavado, (3) adición del antígeno y lavado, (4) adición de anticuerpo secundario marcado, (5) se añade el sustrato para que reaccione con la enzima, dando lugar a una señal que permitirá la detección/cuantificación del antígeno de estudio. Imagen tomada del estudio de Kohol TO y cols [144].

A. Preparación de los discos.

Para este análisis fueron utilizados un total de dieciséis discos, cuatro por cada tipo de material y franja de tiempo analizada (a las 24 y a las 72 horas). Este estudio se llevó a cabo por duplicado, utilizando como controles negativos cuatro pocillos de una placa de 48.

Previo al inicio del experimento los discos fueron sumergidos en etanol absoluto para su desinfección, y seguidamente fueron sometidos a treinta minutos por cada cara de rayos UV-C para lograr su esterilización dentro de la cabina de flujo laminar.

B. Cultivo celular.

Los fibroblastos utilizados en este experimento fueron cultivados sobre frascos de T75 utilizando para ello medio de cultivo DMEM suplementado con 1 % de glutamina-penicilina-estreptomicina y 10 % de suero fetal bovino por cada 500 mL de DMEM. Alcanzado el 90 % de confluencia de fibroblastos entre el segundo y cuarto pase, estos se tripsinizaron y se cultivaron sobre los discos, a su vez dentro de una placa de 48 pocillos. Para ello se utilizó una concentración previamente calculada de 3×10^5 céls/mL de MEM. Se utilizó este tipo de medio para evitar que algún componente pudiera interferir en la producción de colágeno.

Los fibroblastos se utilizaron entre el segundo y cuarto pase con el fin de que la producción de colágeno estuviera preservada. La distribución de las muestras en la placa de pocillos se puede observar en la siguiente imagen (Fig. 59). La placa fue mantenida en una incubadora de CO₂ durante el tiempo establecido (24 y 72 horas) para que se produjera el esparcimiento celular necesario antes de poder cuantificar la producción de colágeno tipo I por parte de los fibroblastos.

	24 h				72 h				
	1	2	3	4	5	6	7	8	
A									<u>Controles</u>
B									
C									<u>Discos de LS₂</u>
D									<u>Discos de PMMA</u>
E									<u>Blancos</u>
F									

Figura 59: Ilustración representativa de la distribución de los discos en los pocillos en la placa de poliestireno para analizar la secreción de colágeno tipo I. Se observan cuatro columnas por cada franja de tiempo (24 y 72 horas) y dentro cada franja podemos ver como las filas A y B se corresponden con los controles sobre el pocillo, la C con los discos de LS₂, la D con los discos de PMMA y, por último, las filas E y F se corresponden con los blancos.

Pasado el tiempo de incubación necesario en cada caso, se aspiró el medio de cultivo y se depositó dentro de tubos de microcentrífuga. Una vez hecho esto, los tubos se centrifugaron durante diez minutos a 2000 rpm. El sobrenadante fue recogido y conservado a -20 °C en tubos de microcentrífuga hasta el día del experimento.

C. Técnica paso a paso.

Para preparar el test de ELISA para colágeno tipo I, lo primero que se hizo fue atemperar el kit de ELISA (MyBioSource, Inc., San Diego, Estados Unidos) veinte minutos antes de su uso. Durante este tiempo se fue diluyendo la solución de lavado en una proporción 1:25, usando para ello agua bidestilada.

Para preparar el patrón estándar de COL1 humano fue necesario añadir 1 ml de diluyente al patrón estándar de COL1 liofilizado y mantenerlo durante 30 minutos hasta que se diluyera por completo. Una vez estuvo completamente disuelto se pasó el contenido a un tubo de microcentrífuga estéril. Se obtuvo de este modo la solución stock de 40 ng/mL.

Se prepararon siete tubos de microcentrífuga estériles para llevar a cabo unas diluciones seriadas tal y como se ve en la imagen siguiente (Fig. 60). En primer lugar, se añadieron 300 µL de diluyente a cada uno de los siete tubos, para posteriormente proceder a retirar 300 µL del primer tubo (solución stock) y pasarlos al tubo segundo. El contenido del segundo tubo se mezcló adecuadamente para luego retirar otros 300 µL de su contenido y pasarlos al tercer tubo. Este proceso se repitió hasta el tubo séptimo. De esta forma, se dejó el octavo tubo únicamente con el diluyente.

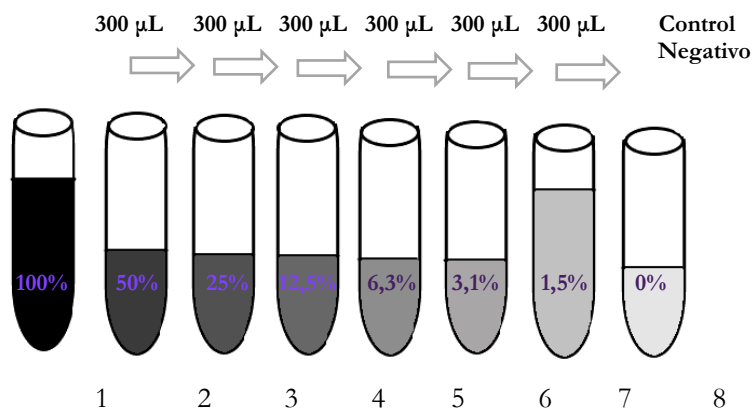


Figura 60: Esquema del método de dilución seguido para llevar a cabo el experimento.

Siguiendo los consejos del fabricante, los valores de concentración y volumen de cada uno de los tubos se detallan en la siguiente tabla (Tabla 4):

Tabla 4: Valores de concentración y volumen de cada tubo.

Tubo	Concentración (%)	Concentración (ng/mL)
1 (solución stock)	100 %	40 ng/mL
2	50 %	20 ng/mL
3	25 %	10 ng/mL
4	12,5 %	5 ng/mL
5	6,3 %	2,5 ng/mL
6	3,1 %	1,25 ng/mL
7	1,5 %	0,625 ng/mL
8 (control negativo)	–	–

Una vez preparadas las diluciones se atemperaron los pocillos del kit que fueran necesarios para llevar a cabo el test ELISA, dejando los otros dentro de la bolsa hermética donde vienen comercializados a 2-8 °C. Los pocillos de la placa contienen un recubrimiento en su base compuesto por el anticuerpo de captación. Mientras se atemperaban los sobrenadantes de las muestras y los blancos anteriormente reservados, se procedió a colocar 100 μ L por pocillo de cada una de las diluciones.

Posteriormente se fueron recogiendo 100 μ L del sobrenadante de cada una de las muestras y blancos para colocarlos en cada pocillo (cada pocillo contenía un volumen de 100 μ L), tal y como se puede apreciar en la imagen siguiente (Fig. 61).

MATERIAL Y MÉTODO

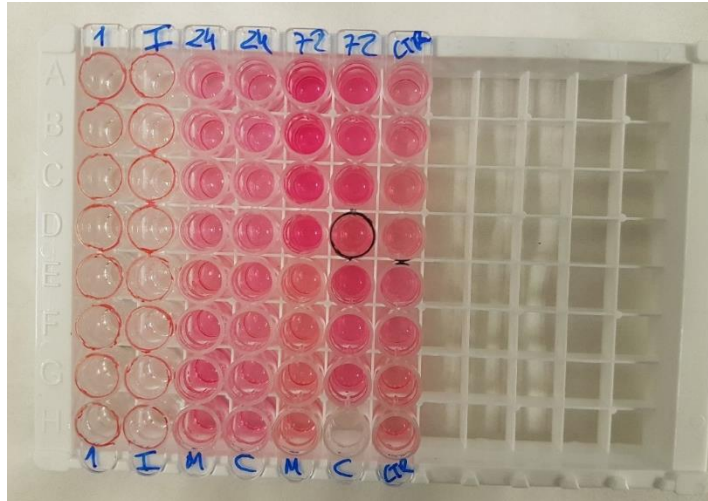


Figura 61: Distribución de los pocillos. En las dos primeras filas se incluyeron 100 μ L de cada dilución en cada pocillo. Las dos filas siguientes contenían el sobrenadante de las muestras a las 24 horas, las dos siguientes el sobrenadante de las muestras a las 72 horas y la última fila el sobrenadante de los controles.

La placa se mantuvo tapada y se incubó a 37 °C durante 90 minutos. Mientras tanto se fue preparando el anticuerpo de detección COL1 biotilado. Para ello fue necesario diluir el líquido del anticuerpo con un diluyente de anticuerpo a una proporción 1:100.

Una vez transcurridos los noventa minutos de incubación se lavó dos veces la superficie de la placa de ELISA, utilizando para ello 350 μ L de solución de lavado por cada pocillo, manteniendo el contenido durante 30 segundos antes de retirarlo, dejando los pocillos lo más secos posible, y volverlo a aplicar. A continuación, se añadieron 100 μ L del anticuerpo biotilado por cada pocillo y se volvió a incubar la placa en una incubadora de CO₂ a 37 °C durante 60 minutos.

Durante ese tiempo se fue preparando el líquido anticuerpo secundario unido a la enzima peroxidasa (complejo Avidina-HRP) al diluirlo en una proporción 1:100 con el diluyente de la enzima conjugada. Pasado el tiempo de incubación se lavó tres veces la placa de pocillos para luego colocar 100 μ L del anticuerpo secundario en cada pocillo. La placa se mantuvo a 37 °C durante treinta minutos, para, transcurrido ese tiempo, lavar cinco veces.

A continuación, se preparó el reactivo de color mezclando los reactivos de color A y B a una proporción 9:1, obteniéndose así el sustrato TMB. Se añadieron 100 μ L del sustrato cromogénico en cada pocillo, ayudados para ello de una pipeta multicanal multicanal Gilson (Gilson Inc., Middleton, Wisconsin, Estados Unidos). Hecho esto, se cubrió la placa con papel de aluminio para proteger al reactivo de la luz. Se mantuvo controlada la placa durante 30 minutos.

Una vez reaccionó el sustrato adquiriendo una tonalidad azul como podemos ver en la Figura 62, se aplicaron 100 μ L de ácido sulfúrico en cada pocillo. En este paso se fue añadiendo el ácido en el mismo orden que el TMB ayudados para ello de la misma pipeta multicanal. Aplicada esta sustancia, el gradiente pasó de azul a amarillo como vemos en la Figura 63.

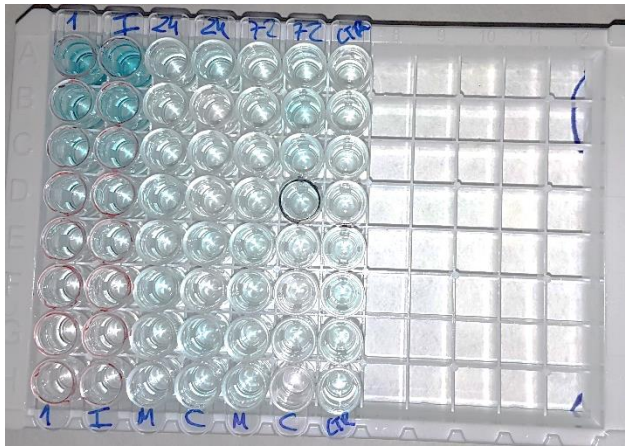


Figura 62: Visualización de la reacción del sustrato, dando como resultado una coloración azul de los pocillos.

Cada vez que se fue aplicando un reactivo sobre los pocillos, se colocó la placa en el agitador térmico PHMT Thermo-Shaker (Grant Instruments, Shepreth, Cambridge, Reino Unido) durante un minuto antes de seguir con el siguiente paso o incubación, de esta forma nos asegurábamos de que se mezclaran adecuadamente las sustancias.

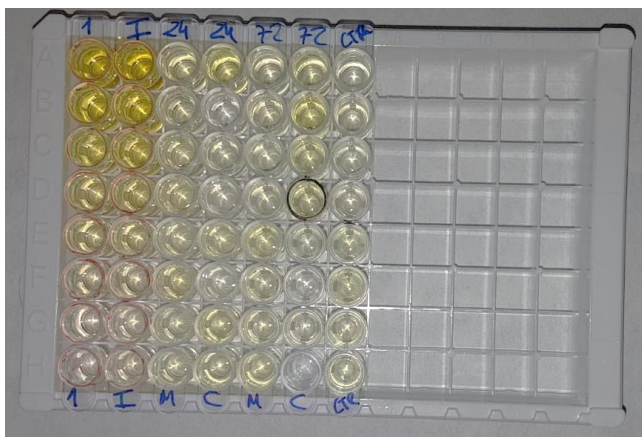


Figura 63: Cambio a color amarillo al aplicar ácido sulfúrico y TMB.

MATERIAL Y MÉTODO

Una vez concluido el ensayo ELISA se procedió a realizar la lectura de absorbancia de los pocillos a 450 nm. Se compararon los niveles de los pocillos que contenían los patrones con los pocillos donde se encontraba el contenido de las muestras. Una mayor intensidad de color estaba directamente relacionada con una mayor concentración de colágeno. Todo el proceso queda resumido en la Figura 64.

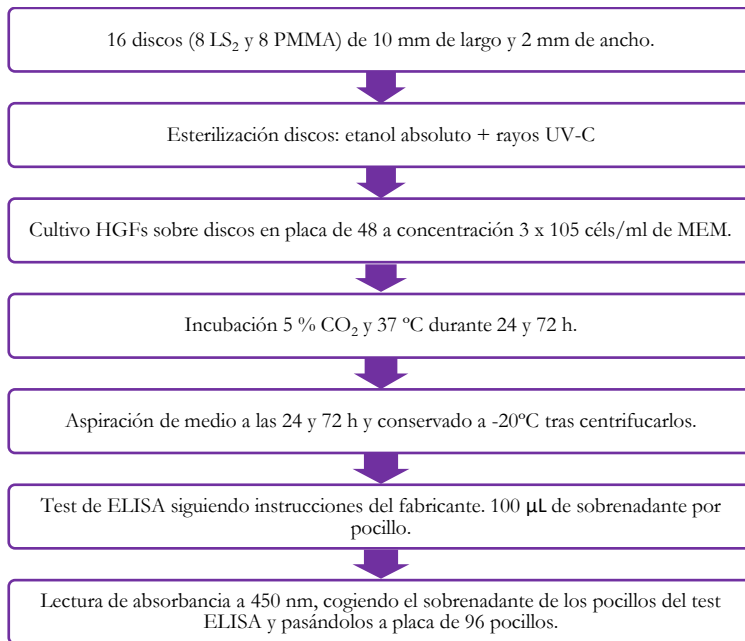


Figura 64: Diagrama de las fases del estudio de secreción de colágeno tipo I.

D. Procesamiento de datos.

Los datos fueron recogidos con el programa informático Gen5 1.11, aplicando unos comandos muy similares a los usados en el análisis de la viabilidad: *Read plate* → *Plate type: 96* → *Add step* → *Read. Detection Method* → *Absorbance, Wavelengths* → 450 nm, *Full plate* → *seleccionar los pocillos ocupados (A1-H8)* → *Ok*.

Se obtuvieron los resultados en un archivo Excel, donde se procedió a sustraer los resultados de los blancos al resto de valores de absorbancia. Con ello se calculó la media de los valores y se elaboró una curva patrón estándar con las concentraciones conocidas y las desconocidas (aquellos valores de absorbancia de las muestras y los controles). Se trazó para ello una línea recta y su ecuación. Cuanto más se aproxime el valor del coeficiente de determinación R^2 a 1, más fiable será la curva patrón.

5.2.6. Análisis estadístico.

Se utilizó el software IBM SPSS Statistics 24.0 (International Business Machines Corp; Nueva York, Estados Unidos) [145,146] para comparar las medias aritméticas (Σ) [147] de los datos obtenidos para poder analizar cada una de las variables estudiadas comparando los tres grupos de estudio (LSs, PMMA y control) en las diferentes etapas analizadas.

En un primer momento se realizó el test Shapiro-Wilk para poder confirmar que hubiese una distribución normal en las variables. Este tipo de distribución se representa mediante una gráfica Q-Q (donde se observa cómo los datos forman unos puntos alineados), debiendo obtenerse un resultado $0 < W \leq 1$. [147]. En aquellos casos en que no se obtuvo una distribución normal se llevó a cabo la prueba Kruskal-Wallis y en el resto de casos (distribuciones normales) se analizó que hubiera homogeneidad en las varianzas ayudados para ello del test de Levene [148].

Las variables que seguían una distribución normal y homogénea ($p \geq 0,05$) se analizaron con la prueba de varianza ANOVA (ANalysis Of VAriance) seguidas de la prueba t de student. Para las variables estudiadas con ANOVA se estableció el índice ω^2 (omega al cuadrado) para poder aclarar la asociación existente entre el material y el parámetro celular analizado mientras que para las estudiadas con Kruskal-Wallis se utilizó épsilon cuadrado (ϵ^2) [149].

La prueba de Bonferroni fue utilizada para comparaciones múltiples. El nivel de significancia estadística establecida fue del 5 % (es decir, $p < 0,05$).

Después se calculó la magnitud del efecto en las comparaciones *post hoc* que fueran estadísticamente significativas. En los casos de variables distribuidas con normalidad se empleó la *d* de Cohen; donde se estableció una $d < 0,5$ para un tamaño de efecto pequeño, valores entre $0,5 - 0,8$ para un efecto mediano y $d > 0,8$ para efectos grandes [149].

Por último, en aquellas distribuciones no normales o no homogéneas se realizaron pruebas no paramétricas (U de Mann-Whitney). La *r* de Rosenthal, como equivalente a la *d* de Cohen, fue utilizada para variables con distribuciones no consideradas normales. Donde $r > 0,1$ se consideraron un tamaño de efecto pequeño, $r > 0,3$ efecto mediano y $r > 0,5$ tamaño grande [148].

RESULTADOS



6. RESULTADOS

En el presente apartado se irán detallando los resultados obtenidos acerca de la caracterización de las superficies de estudio, así como la viabilidad y los niveles de secreción de colágeno tipo I sobre estos materiales analizados.

6.1. Caracterización de superficies.

6.1.1. Perfilometría:

Se obtuvo la rugosidad media (S_a) a partir de las cinco mediciones de rugosidad calculadas sobre cada material, siendo $1.57 \pm 0.34 \mu\text{m}$ para el IPS e-max y $0.38 \pm 0.02 \mu\text{m}$ para el VITA CAD-Temp. Podemos observar las imágenes y las mediciones realizadas sobre los discos de cada material en la representación bi y tridimensional de las siguientes figuras (Figura 65).

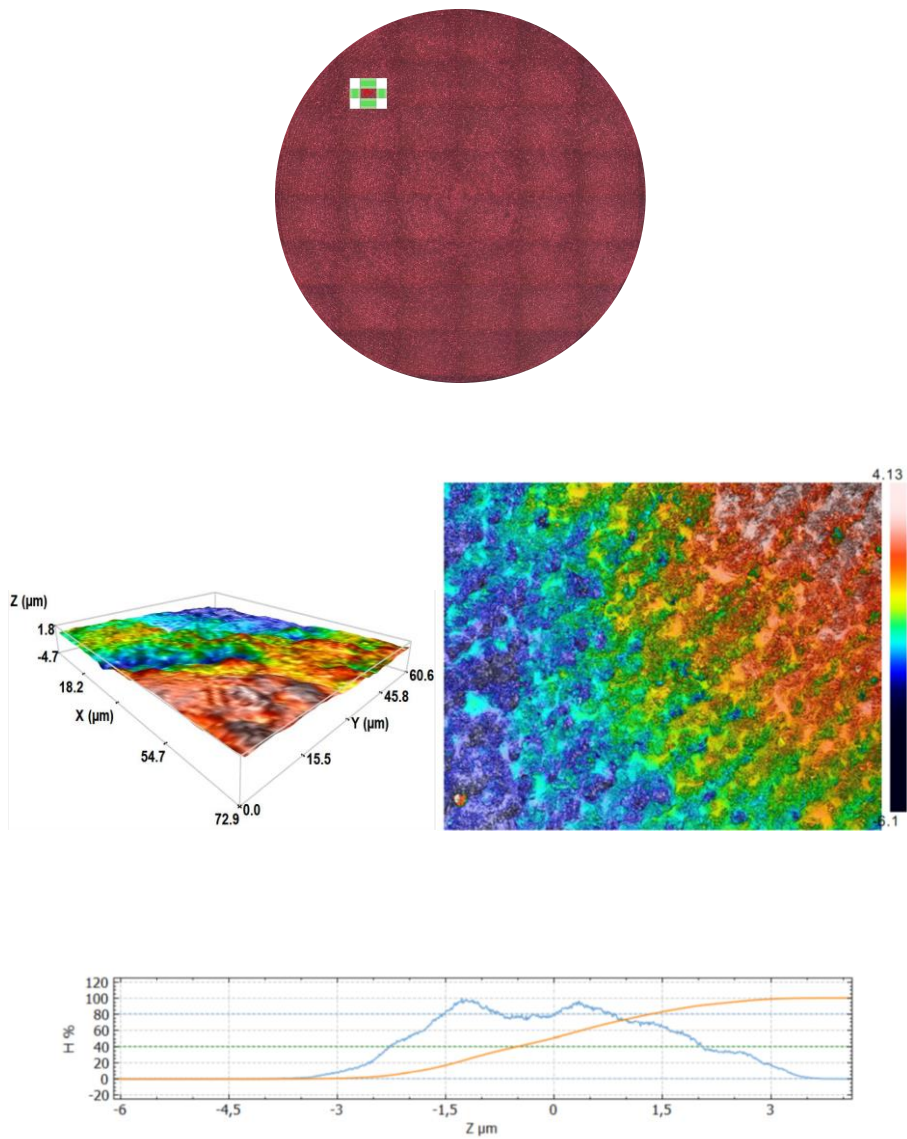


Figura 65: Representación gráfica tridimensional de la rugosidad media (S_a) de los discos de LS₂.



Visualization

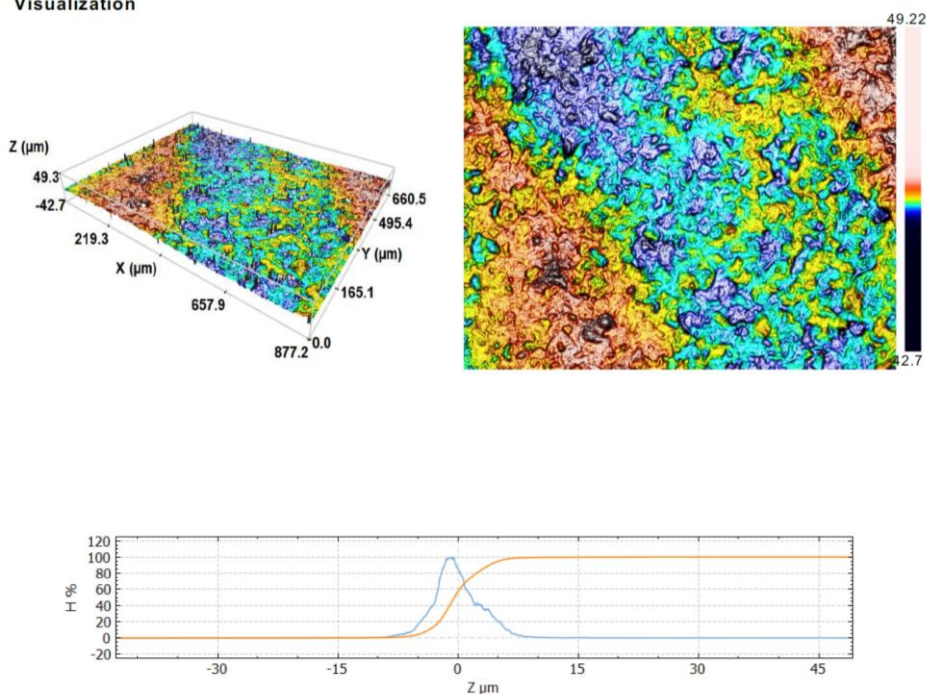


Figura 66: Representación gráfica de la rugosidad media (S_a) de los discos de PMMA.

En las imágenes obtenidas se observan zonas de llanura y zonas de mayor relieve, a pesar de que en ambos materiales presentan una longitud que oscila entre 10-15 μm , estas se distribuyen, sin embargo, de forma distinta en cada una de las superficies estudiadas. Por un lado, en el caso del LS₂ se observa una superficie más irregular, donde las llanuras y salientes se distribuyen de manera aleatorizada; mientras en el caso del PMMA podemos ver una distribución bastante más homogénea que conforma una superficie en surcos circulares concéntricos.

Estos surcos aparecen separados unos de otros a una distancia aproximada de unas 50 μm , donde los salientes presentan una altura de alrededor de 3-4 μm . Estas diferencias topográficas pueden explicar los mayores valores de rugosidad observados en el caso la superficie de LS_2 , ya que muestra una disposición más desorganizada.

6.1.2. Composición:

Los resultados obtenidos en el análisis EDS para el IPS e.max CAD (figura 67) muestra picos elevados de cristalización de silicio, oxígeno y potasio, mientras que los valores de potasio, cinc y el resto de elementos se encuentran localizados por espectrometría dispersiva se encuentra en valores mucho menores. Debido al bajo peso atómico del litio (Li) ($Z = 3$; $A = 6,94$ u), este elemento no fue hallado en el disilicato de litio.

En el caso del VITA CAD-Temp (Fig. 68) el mayor pico se encuentra al localizado en el carbono (C) y el potasio (K), hallándose valores mucho menores en el oxígeno (O). En ambos materiales se pudieron detectar picos de cristalización de potasio y oxígeno.

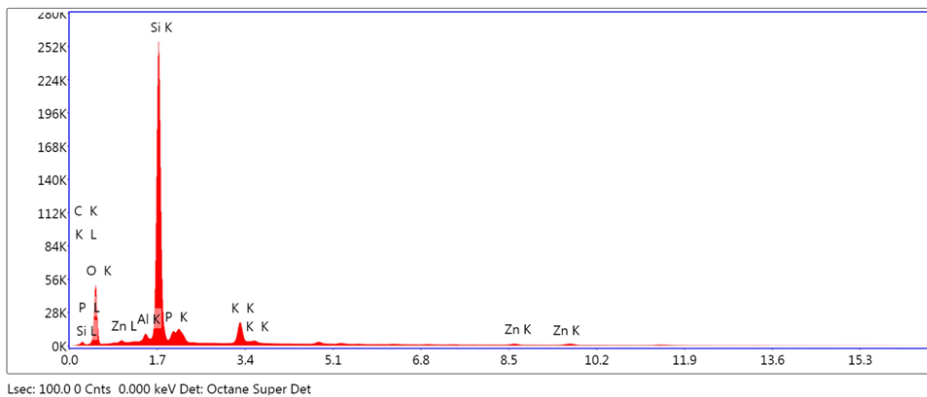


Figura 67: Resultados del análisis EDS para IPS e.max CAD.

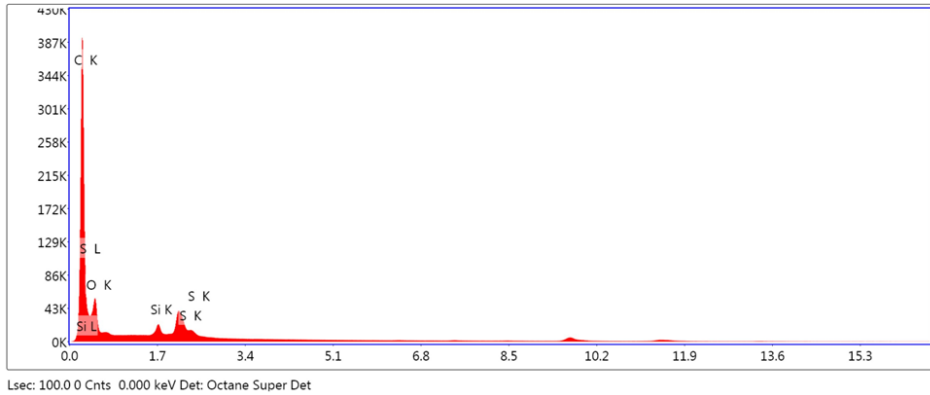


Figura 68: Resultados del análisis EDS para VITA CAD-Temp.

En la siguiente tabla se pueden observar los porcentajes de contenido en masa (wt%) de cada uno de los elementos químicos que pudieron ser detectados en cada uno de los materiales (Tabla 5).

Tabla 5: Porcentajes de contenido en masa (wt%) de los elementos detectados en cada material.

Elemento	C	O	Si	Al	S	P	K	Zn
Material								
Vita CAD-Temp® (wt %)	68,20	29,77	0,55	–	1,49	–	–	–
IPS e.max® CAD (wt %)	8,13	44,21	36,72	1,20	–	4,18	4,63	0,93

6.1.3. Morfología de la superficie de los discos:

Al analizar las imágenes obtenidas mediante el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM), podemos ver que en el caso del disilicato de litio (Fig. 69), la superficie que presenta es heterogénea, donde se observan pequeñas irregularidades en forma de picos y llanuras que se extienden a lo largo de todo el disco. Este tipo patrón irregular es típico del fresado y sinterizado de las piezas.

RESULTADOS

Por otro lado, la superficie de VITA CAD-Temp que observamos en la Figura 70, presenta una superficie homogénea que sigue un patrón donde se intuyen microsurcos concéntricos con forma circular que son el resultado del mecanizado de las piezas que desarrolla el distribuidor comercial.

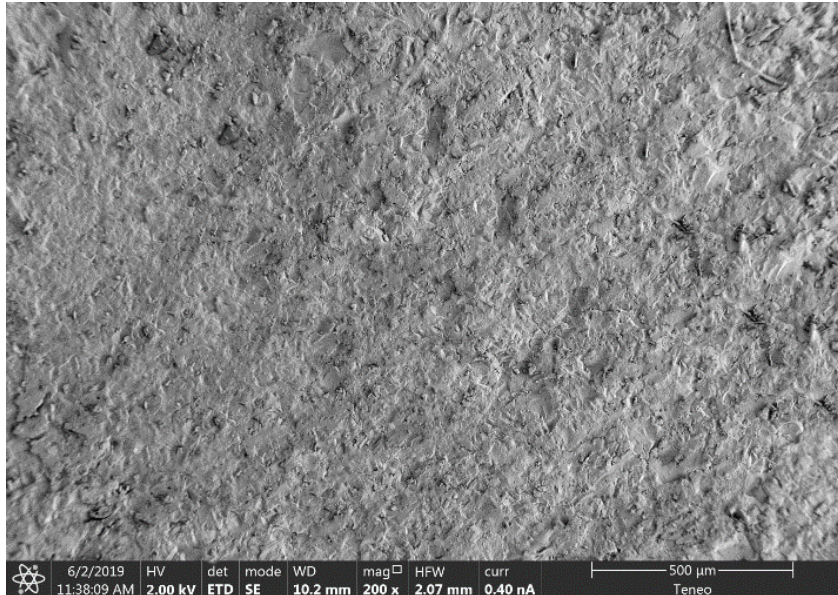


Figura 69: Imagen SEM de LS₂ a una magnificación de 200x.

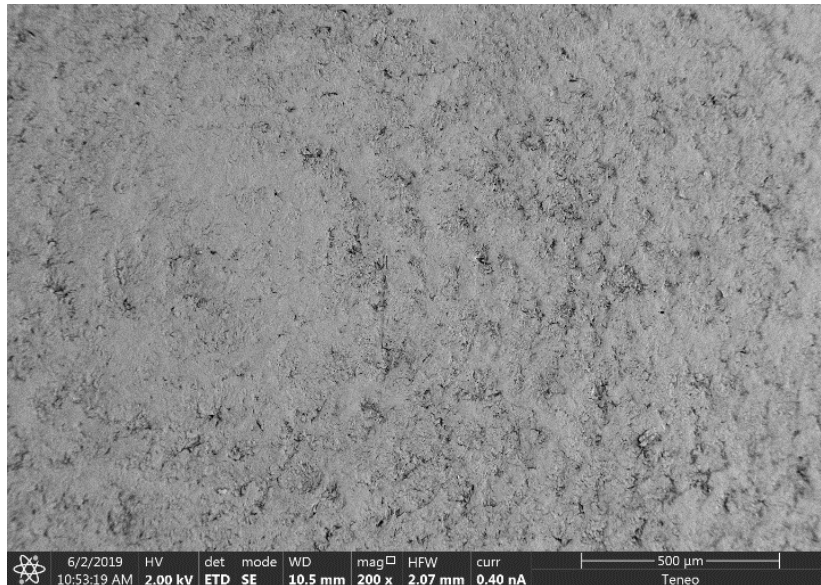


Figura 70: Imagen SEM de PMMA a una magnificación de 200x.

6.1.4. Humectabilidad:

Una vez realizadas las mediciones de los ángulos de contacto de la prueba de gota sésil de agua destilada y diyodometano sobre los dos materiales de estudio (figuras 72 y 73), se procedió a calcular la media y la desviación estándar de todos los valores obtenidos tal y como se observa en las siguientes tabla y figura (Tabla 6 y Fig. 71):

Tabla 6: Media aritmética y desviación estándar de los ángulos de contacto obtenidos mediante el método de gota sésil de agua y diyodometano sobre los materiales de estudio (LS₂ y PMMA).

Material de estudio	Ángulo de contacto (°)	
	Agua	Diyodometano
	Media ± DE	Media ± DE
LS ₂	44,64 ± 3,42	61,72 ± 1,43
PMMA	72,55 ± 2,90	44,15 ± 3,11

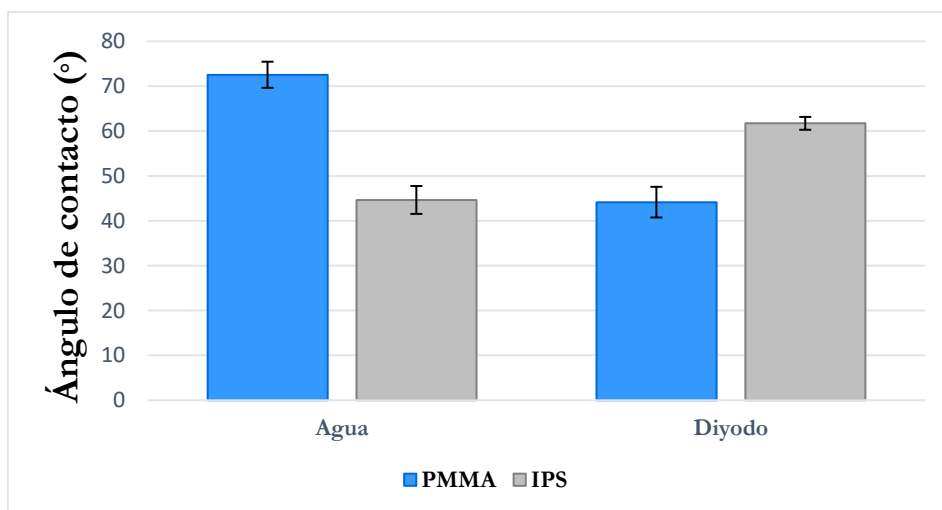


Figura 71: Representación gráfica de los ángulos de contacto de ambos materiales al agua y al diyodometano.

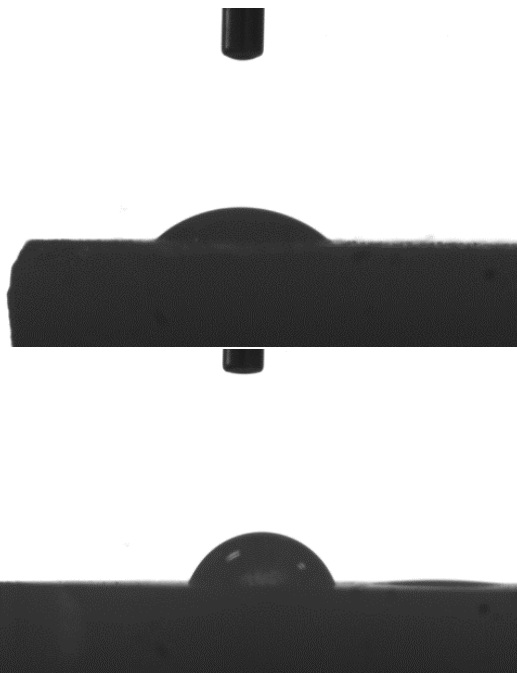


Figura 72: Imagen tomada de la gota sésil de agua sobre la superficie de IPS (arriba) y PMMA (abajo).

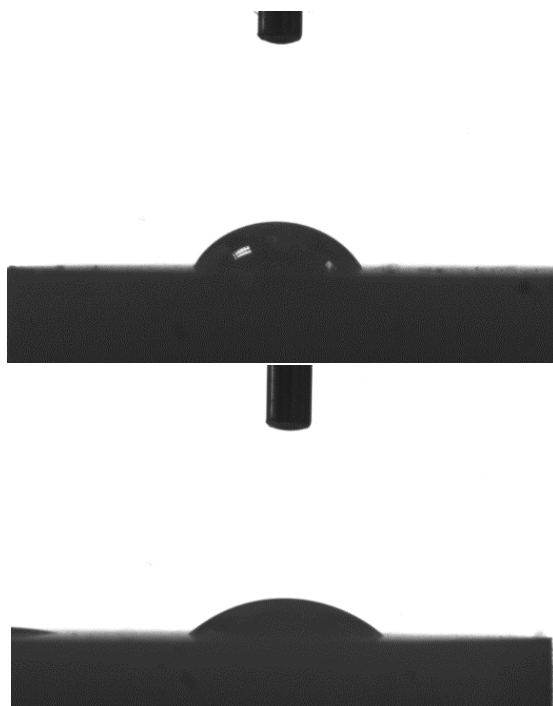


Figura 73: Imagen tomada de la gota sésil de diiodometano sobre la superficie de IPS (arriba) y PMMA (abajo).

A continuación, se pueden observar la media y la desviación estándar de los valores de componente polar, componente dispersiva y energía superficial de ambos materiales (tabla 7). Estos se pueden ver representados en la figura 74.

Tabla 7: Media aritmética y desviación estándar de los ángulos de contacto obtenidos mediante el método de gota sésil de agua y diyodometano sobre los materiales de estudio (LS₂ y PMMA).

Material de estudio	Componente polar (mN/m)	Componente dispersiva (mN/m)	Energía superficial (mN/m)
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE
LS ₂	27,97 ± 2,07	27,59 ± 0,82	55,55 ± 2,42
PMMA	6,96 ± 1,44	37,44 ± 1,65	44,39 ± 1,44

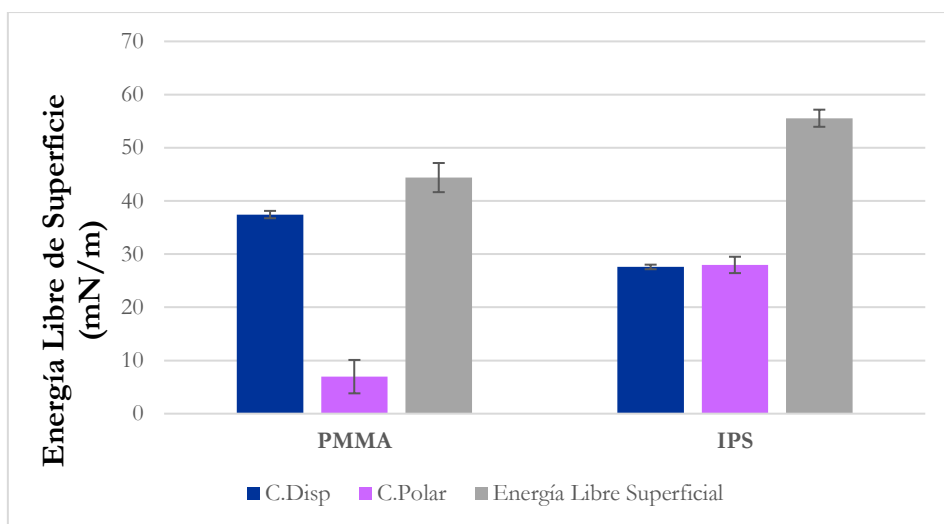


Figura 74: Representación gráfica de la componente polar, componente dispersiva y la energía superficial de ambos materiales.

Con los datos recogidos, se pudo llevar a cabo el test de Shapiro Wilk, mediante el cual se encontró una distribución normal de las variables del ángulo de contacto del diyodometano y anormal sobre las de agua. De este modo, se pudo llevar a cabo el análisis de varianza ANOVA y la posterior comparación de los grupos de diyodometano mediante la t de student.

Al ser un tamaño de muestra reducido donde $n = 6$, el valor p no aporta tanta significancia como el tamaño del efecto (d de Cohen). De este modo se pudo comprobar que al comparar el ángulo de contacto de diiodometano sobre el disilicato de litio ($61,72 \pm 1,43^\circ$) fue superior al del PMMA ($44,15 \pm 3,11^\circ$). Siendo esta diferencia estadísticamente significativa por la prueba t-student, donde se obtuvo una $t_{10} = 12,57$ y una $p < 0,001$. El tamaño del efecto del material fue grande, con una $d = 7,26$.

Para comparar el ángulo de contacto del agua sobre ambos materiales se realizó el test de Mann-Whitney, donde se obtuvo una $r = 0,81$, siendo esta la influencia del material sobre los resultados. En este caso se obtuvo un ángulo de contacto superior en el PMMA ($72,55 \pm 2,90^\circ$) con respecto al del IPS ($44,64 \pm 3,42^\circ$). También se obtuvo una diferencia significativa estadísticamente con una $p < 0,001$.

En las variables de componente polar y dispersiva de la energía de superficie de ambos materiales también se halló una distribución normal al realizar el test de Shapiro Wilk, sin embargo, en el caso de la energía libre de superficie no se halló una distribución normal.

Se obtuvo un valor superior de LS_2 ($27,97 \pm 2,07$ mN/m) en su componente polar con respecto al PMMA ($6,96 \pm 1,44$ mN/m). Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$ $t_{10} = 13,09$) y un tamaño del efecto grande ($d = 7,55$).

Al comparar el componente dispersivo se obtuvo un valor superior en el PMMA ($37,44 \pm 1,65$ mN/m) que en el IPS ($27,59 \pm 0,82$ mN/m). Esta diferencia fue también estadísticamente significativa ($p < 0,001$ y $t_{10} = 20,42$), siendo el tamaño del efecto grande con una $d = 11,78$.

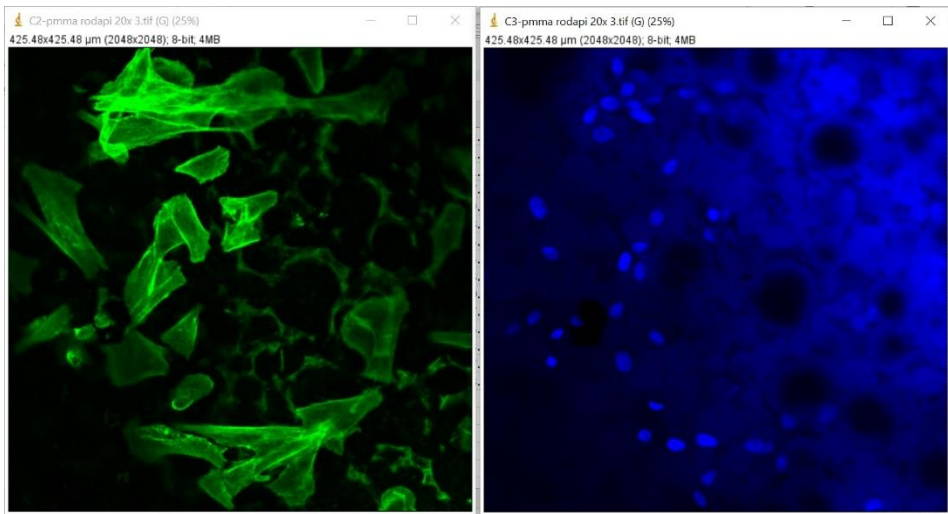
Finalmente se pudieron comparar los valores obtenidos de la energía superficial de ambos materiales, hallándose esta vez un valor superior del IPS ($55,55 \pm 2,42$ mN/m) que del PMMA ($44,39 \pm 1,44$ mN/m). La diferencia fue significativa ($p < 0,001$) con un valor $r = 0,81$.

6.2. Análisis visual, citomorfométrico y del cubrimiento de los discos cultivados.

Para llevar a cabo el estudio citomorfométrico de los fibroblastos se utilizaron tinciones inmunohistoquímicas sobre estas células, las cuales fueron sembradas 24 horas antes sobre los discos de los materiales de estudio (IPS y PMMA) y la superficie del material de control.

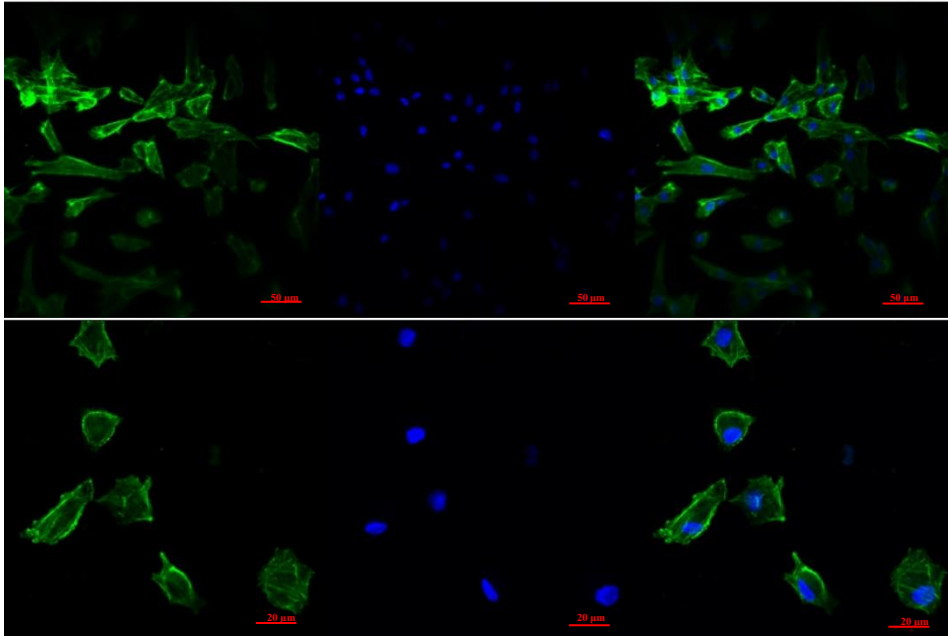
6.2.1. Análisis visual del anclaje celular a los materiales.

A continuación, podemos ver ejemplos de imágenes de los tres grupos de estudio, para facilitar su visualización hemos procedido a separar la imagen por colores (RGB) mediante el programa informático ImageJ, de tal forma que se desechó la primera de las imágenes (*red*) por no aportar información, manteniéndose las otras dos (*green* y *blue*). En las imágenes verdes se pueden observar los citoesqueletos teñidos con DAPI y en la imagen azul los núcleos teñidos con faloidina. Para ello se utilizaron los comandos *Image* → *Colors* → *Make composite* y *Image* → *Color* → *Split channels* (Fig. 75). Finalmente se utilizó el comando *Image* → *Stack* → *Make Montage* para unir estas imágenes a la original.



Figuras 75: Proceso de separación de las imágenes en citoesqueleto y núcleos en el software ImageJ.

Estas imágenes fueron tomadas en cinco puntos aleatorios en los discos de cada material (poliestireno como control, PMMA y LS₂), para lo cual se usaron aumentos de 20x y 40x en el microscopio confocal. En ellas se muestra el crecimiento fibroblástico que tuvo lugar durante las primeras 24 horas transcurridas tras ser sembrados sobre las distintas superficies analizadas.



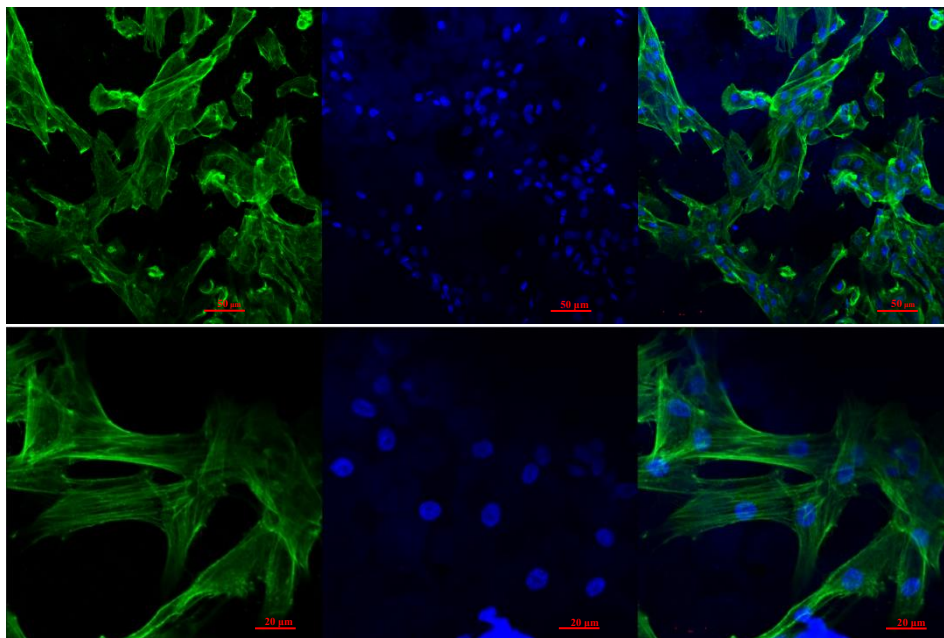
Figuras 76 y 77: Imágenes tomadas al microscopio donde se muestra el crecimiento fibroblástico temprano sobre discos de IPS e.max. En ellas se observa el montaje realizado mediante el uso del programa informático ImageJ, donde se ven separados los núcleos de los citoesqueletos y ambos superpuestos.

Al observar las imágenes correspondientes al crecimiento fibroblástico temprano que se produjo sobre los discos de IPS e.max, podemos ver como los fibroblastos aparecen en su mayoría con una forma redondeada, a veces estrellada. Además, en la imagen superior (Fig. 76 y 77) (40x), se aprecia un tamaño de núcleos ligeramente superior al de los núcleos sobre PMMA.

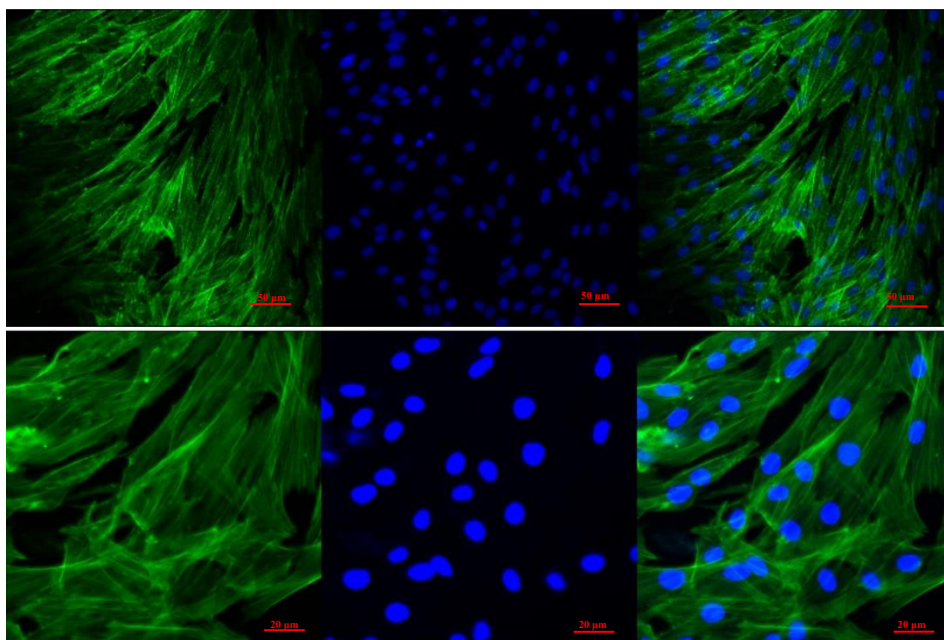
En las imágenes tomadas sobre el otro material de estudio (figuras 78 y 79), por el contrario se pueden observar unas células más expandidas, con una anatomía fusiforme, que en ocasiones llega a fusionarse, dando lugar a agregados celulares que también se pueden reconocer en las células que crecen sobre discos de poliestireno.

Finalmente, al evaluar las imágenes obtenidas sobre el crecimiento temprano en discos de poliestireno (control) (Fig. 80 y 81), se puede ver como las células aparecen con aspecto fusiforme, unidas entre ellas en la matriz extracelular, lo que forma un entramado celular similar al que se genera sobre los discos de PMMA, aunque con una densidad celular apreciablemente superior.

Todas estas observaciones se corresponden con los resultados estadísticos anteriormente detallados, ya que, tal y como se pudo concluir, se obtuvo un mayor tamaño de área celular y longitud del citoesqueleto del control sobre el PMMA, y de este último sobre el IPS.



Figuras 78 y x79: Imágenes tomadas al microscopio donde se muestra el crecimiento fibroblástico temprano sobre discos de VITA CAD-Temp.



Figuras 80 y 81: Imágenes tomadas al microscopio donde se muestra el crecimiento fibroblástico temprano sobre discos de poliestireno (control).

6.2.2. Análisis citomorfométrico y del cubrimiento celular mediante ImageJ.

Utilizando las imágenes obtenidas a 20x y 40x de los grupos de estudio (control, IPS y PMMA), así como los otros parámetros celulares anteriormente referidos (longitud media del citoesqueleto, perímetro celular, área celular, tamaño medio del núcleo, redondez y circularidad del núcleo). Antes de realizar la siembra celular sobre las tres superficies de estudio, se fue supervisando el crecimiento fibroblástico con ayuda del microscopio invertido (Figura 82):

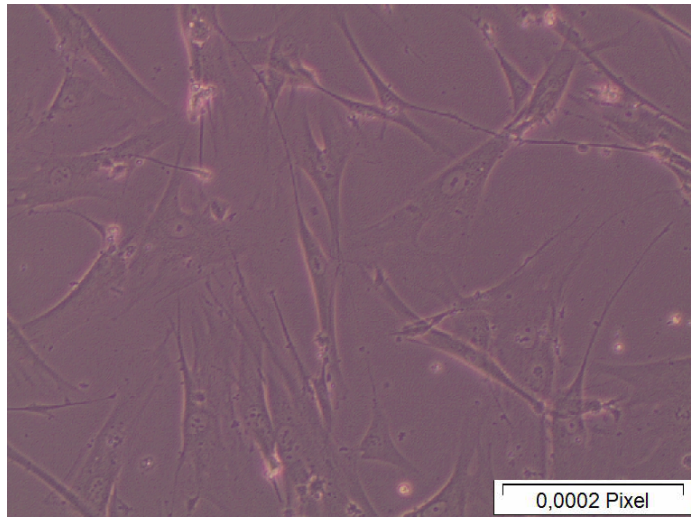


Figura 82: Seguimiento del crecimiento de los fibroblásticos al microscopio óptico. Imagen tomada a los 7 días.

En la siguiente tabla (Tabla 8) se muestran las medias aritméticas junto a las desviaciones estándar de los distintos parámetros citomorfométricos que fueron analizados en esta parte del estudio. En ella se puede observar que los valores del grupo control son siempre superiores a los de los grupos de estudio, a excepción del parámetro conteo celular (superior en el grupo de IPS e.max).

Además, el grupo IPS obtiene valores superiores en comparación con el grupo PMMA, a excepción de la longitud del eje mayor del citoesqueleto y el área celular media (superiores en el grupo PMMA). Estos resultados son explicados paso a paso más adelante.

Tabla 8: Valores de la media aritmética y la desviación estándar de cada parámetro celular analizado sobre los tres grupos de estudio (Control, LS₂ y PMMA).

Parámetros citomorfométricos analizados	Control	LS ₂	PMMA
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE
Conteo celular	99,85 ± 88,69	115,82 ± 87,68	99,70 ± 91,71
Circularidad	0,61 ± 0,13	0,57 ± 0,07	0,55 ± 0,14
Tamaño medio del núcleo (μm ²)	95,69 ± 68,38	93,48 ± 69,19	74,04 ± 32,76
Área media del disco ocupada por el núcleo (%)	26,13 ± 2,34	21,26 ± 2,37	20,57 ± 1,90
Redondez	0,86 ± 0,164	0,83 ± 0,16	0,83 ± 0,156
Longitud eje mayor citoesqueleto (μm)	94,94 ± 43,54	56,12 ± 23,59	68,88 ± 31,45
Área celular media (μm ²)	759,32 ± 148,35	561,84 ± 58,10	715,64 ± 164,09
Perímetro celular (μm)	357,85 ± 154,00	313,46 ± 207,80	268,84 ± 59,49

En un primer lugar se realizó un test Shapiro-Wilk con el que se comprobó que no había una distribución normal en la mayoría de los resultados obtenidos de los parámetros citomorfométricos que fueron analizados. Se halló una distribución normal en el caso de los parámetros conteo celular, circularidad y longitud media del citoesqueleto.

Una vez hecho el test, se comprobó la homogeneidad de las varianzas con el test de Levene, mediante el cual se pudo observar que en el caso de la variable longitud media del citoesqueleto, la distribución de los resultados no era homogénea, por lo que se siguieron estudiando las diferencias entre los grupos mediante pruebas no paramétricas.

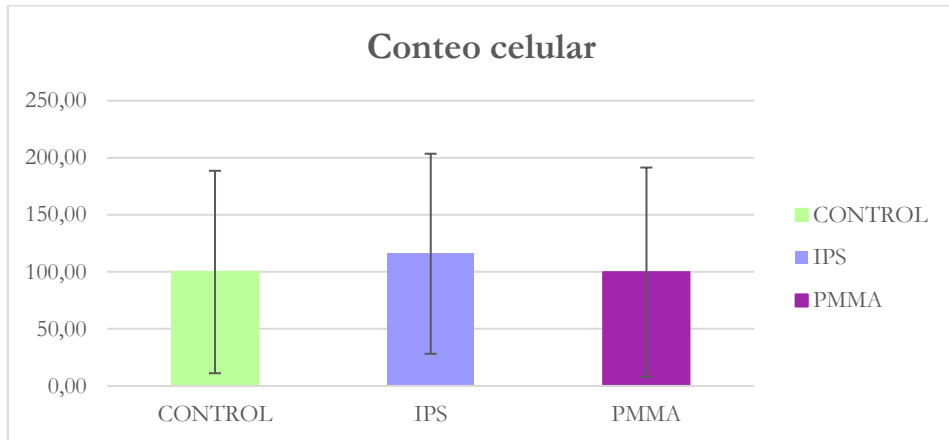


Figura 83: representación gráfica de los valores medios de células sobre cada disco calculados a partir de imágenes a un aumento 20x sobre las tres superficies analizadas en el estudio (control, IPS y PMMA).

En el caso de los otros parámetros, sí que se observó homogeneidad, por lo que se continuó con el análisis de varianza (ANOVA) en base a los datos obtenidos (Tabla 9). En el conteo celular (Fig. 83) se hallaron unos valores de media y desviación estándar $99,85 \pm 88,69$ en el grupo control, $115,82 \pm 87,68$ en el grupo de IPS y $99,70 \pm 91,71$ en el grupo de PMMA (tabla 8). No se observaron diferencias entre todos los materiales ($p = 0,24$), siendo la influencia del material del 2 % ($\omega^2 = 0,02$).

Tabla 9: Resultados de ANOVA para aquellos datos con distribución homogénea.

Parámetro celular	Estadístico F	Valor p
Conteo celular	1,47	0,24
Circularidad	0,63	0,54
Longitud eje mayor citoesqueleto	8,87	<0,01*

Al realizar el test t (Tabla 10) se comprobó que no existían diferencias significativas entre ninguno de los grupos. Los valores obtenidos entre el IPS y el control fueron $p = 0,06$, $t_{38} = 1,59$ y un valor $d = 0,5$, correspondiéndose este

valor d con un efecto mediano. Al comparar el grupo PMMA con el control se obtuvo una $p = 0,49$, $t_{37} = 0,001$ y $d = 0,0005$. Por último, al comparar los grupos de estudio (IPS y PMMA), se obtuvieron valor $p = 0,59$, $t_{35} = 0,54$ y $d = 0,4$ (efecto de tamaño pequeño).

Tabla 10: Comparación entre grupos mediante la prueba paramétrica de t de Student por parejas.

Parámetro celular	Grupo I	Grupo II	Valor p
Conteo celular	IPS	PMMA	0,10
	IPS	Control	0,06
	PMMA	Control	0,49
Circularidad	IPS	PMMA	0,46
	IPS	Control	0,12
	PMMA	Control	0,18

* Se estableció una diferencia significativa entre medias a nivel 0,05.

Los valores obtenidos de circularidad fueron $0,61 \pm 0,13$ para el control, $0,57 \pm 0,07$ para el IPS y $0,55 \pm 0,14$ para el grupo PMMA (tabla 8), los cuales aparecen representados en el gráfico de barras de la figura 84. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos, siendo el valor $p = 0,54$. Al realizar la t de Student para comparar todos los grupos entre sí se obtuvo una $t_{29} = 0,66$ y $p = 0,514$ al comparar los dos grupos de estudio. Al comparar el grupo control con el grupo IPS se obtuvo $t_{38} = 1,17$, una $p = 0,12$ y un valor de $d = 0,37$ (efecto pequeño). Por último, se obtuvo una $t_{38} = 0,91$, una $p = 0,18$ y una $d = 0,29$ (efecto pequeño) al comparar el grupo control con el grupo PMMA.

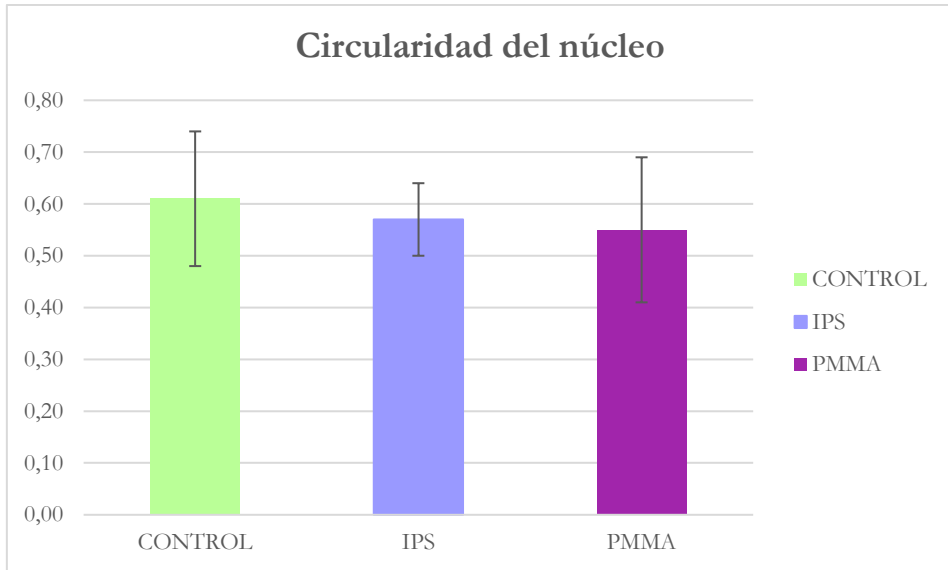


Figura 84: Representación gráfica de los valores medios de la circularidad de los núcleos calculados a partir de imágenes a un aumento 20x sobre las tres superficies analizadas en el estudio (control, IPS y PMMA).

En el parámetro longitud media del citoesqueleto (Fig. 85), la media de valores obtenidos fue de $94,94 \pm 43,54 \mu\text{m}$ para el control, $56,12 \pm 23,59 \mu\text{m}$ para el IPS y $68,88 \pm 31,45 \mu\text{m}$ para el PMMA. Como fue comentado anteriormente, en este caso se obtuvo una distribución normal de los resultados, sin embargo, al no obtenerse una homogeneidad en ellos mediante el test de Levene, se compararon los grupos mediante el test de Mann-Whitney (prueba no paramétrica). De esta prueba se obtuvo un valor $r = 0,49$ (efecto mediano) y $p = 0,003$ al comparar el grupo control con el IPS, mientras al compararlo con el grupo PMMA se halló una $r = 0,33$ (efecto mediano) y $p = 0,04$. El valor de la r de Rosenthal obtenido al comparar ambos grupos de estudio fue de 0,29 (lo que equivale a un efecto pequeño), además de obtenerse un valor estadísticamente significativo al compararlos ($p = 0,038$).

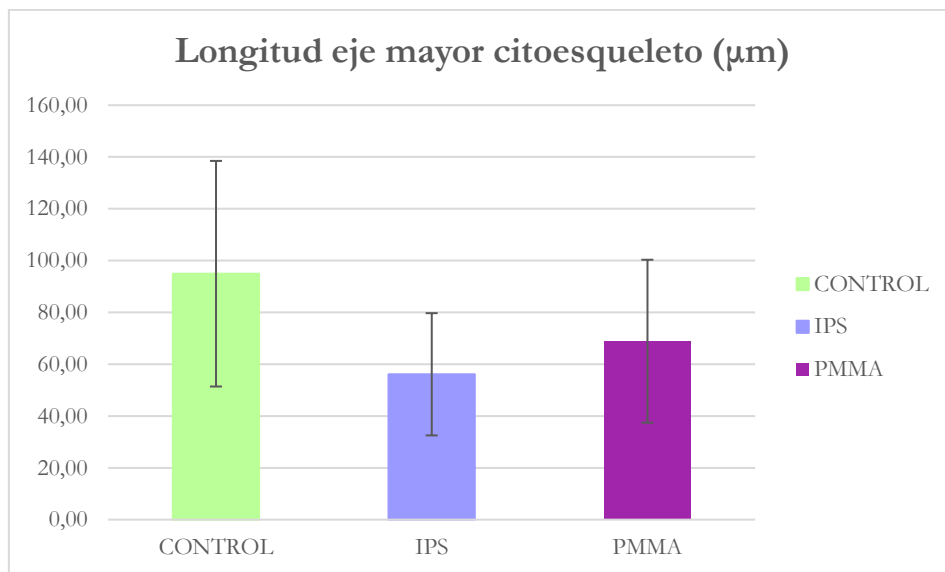


Figura 85: Representación gráfica de los valores medios de la longitud del citoesqueleto medidos sobre tres células elegidas aleatoriamente a un aumento de 40x sobre las tres superficies analizadas en el estudio (control, IPS y PMMA).

En el resto de parámetros celulares analizados, una vez hecho el test Shapiro-Wilk y test de Levene, se llevó a cabo la comparación entre grupos mediante la prueba Kruskal Wallis (Tabla. 11) para cerciorarse de si las diferencias halladas eran estadísticamente significativas o no. Seguidamente se llevó a cabo la prueba U Mann Whitney (Tabla 12).

Tabla 11: Resultados test de Kruskal Wallis

Parámetro celular	Estadístico H	Valor p
Tamaño núcleos	2,49	0,29
Área media ocupada	24,18	<0,01*
Redondez	0,22	0,89
Área celular media	19,82	<0,01*
Perímetro celular	4,16	0,12

Tabla 12: Comparación entre grupos mediante la prueba no paramétrica de U Mann-Whitney

Parámetro celular	Grupo I	Grupo II	Valor p
Longitud media citoesqueleto	IPS	PMMA	0,03
	IPS	Control	0,001
	PMMA	Control	0,021
Tamaño núcleos	IPS	PMMA	0,46
	IPS	Control	0,12
	PMMA	Control	0,18
Área media ocupada	IPS	PMMA	<0,01*
	IPS	Control	0,36
	PMMA	Control	<0,01*
Redondez	IPS	PMMA	0,46
	IPS	Control	0,34
	PMMA	Control	0,35
Área celular media	IPS	PMMA	<0,01*
	IPS	Control	<0,01*
	PMMA	Control	0,17
Perímetro celular	IPS	PMMA	0,22
	IPS	Control	0,09
	PMMA	Control	0,02

* Se estableció una diferencia significativa entre medias a nivel 0,05.

El tamaño medio de los núcleos (Fig. 86) fue $95,69 \pm 68,38 \mu\text{m}^2$ sobre el grupo control, $93,48 \pm 69,19 \mu\text{m}^2$ sobre IPS y $74,04 \pm 32,76 \mu\text{m}^2$ sobre PMMA (tabla 8). No fueron halladas diferencias significativas entre los grupos al realizar la prueba de Kruskal Wallis ($p = 0,29$), y al llevar a cabo la prueba U Mann Whitney, se pudo comparar que el efecto entre IPS y PMMA fue pequeño ($r = 0,24$ y $p = 0,63$), al igual que al comparar el grupo control con el PMMA ($r = 0,19$ y $p = 0,25$), mientras que en la comparación del grupo control con el grupo IPS no fue hallado ningún efecto ($r = 0,01$ y $p = 0,93$).

Los valores de área media ocupada de cada material de disco (Fig. 87) fueron de $26,13 \pm 2,34 \%$ para el grupo control, $21,26 \pm 2,37 \%$ para el IPS y $20,57 \pm 1,90 \%$ para el PMMA. Se halló un efecto pequeño al comparar ambos grupos de estudio ($r = 0,15$) y diferencias que no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,927$). Sin embargo, al comparar ambos materiales con el grupo

control, sí que fueron halladas diferencias estadísticamente significativas ($p = 4,15^5$ con el IPS y $p = 2,03^5$ para el PMMA), lo que se tradujo en un efecto grande al analizar los valores de r de Rosenthal ($r = 0,65$ en IPS y $r = 0,67$ en PMMA).

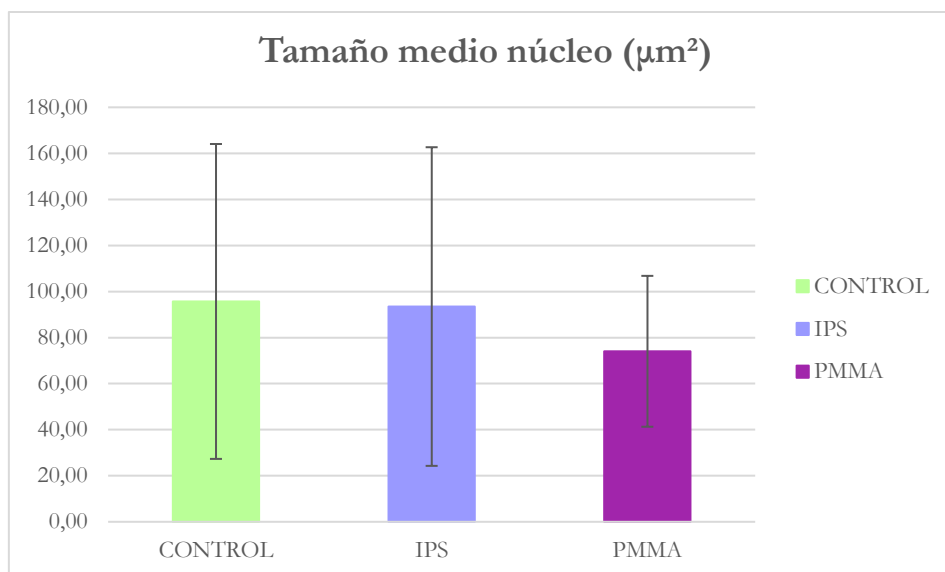
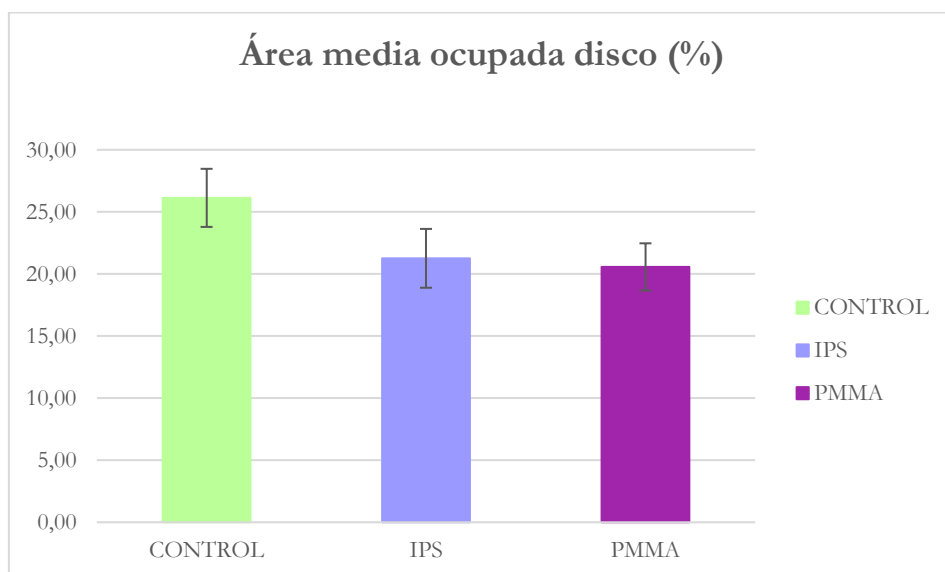


Figura 86: Representación gráfica de los valores medios del tamaño del núcleo calculado a partir de imágenes a un aumento 20x sobre las tres superficies analizadas en el estudio (control, IPS y PMMA).



RESULTADOS

Figura 87: Representación gráfica de los valores medios del área ocupada por los núcleos en cada disco calculados a partir de imágenes a un aumento 20x sobre las tres superficies analizadas en el estudio (control, IPS y PMMA).

En cuanto a los valores de redondez (Fig. 88), estos fueron de $0,86 \pm 0,164$ para el grupo control, $0,83 \pm 0,16$ para el grupo IPS y $0,83 \pm 0,156$ para el grupo PMMA. En el caso de este parámetro, al comparar los distintos grupos mediante la prueba de Kruskal Wallis, no se hallaron diferencias significativas ($p = 0,89$), por lo que no pudieron encontrarse efecto entre ellos mediante la prueba Mann Whitney ($r = 0,06$ para control-IPS, $r = 0,06$ para control-PMMA y $r = 0,02$ para IPS-PMMA).

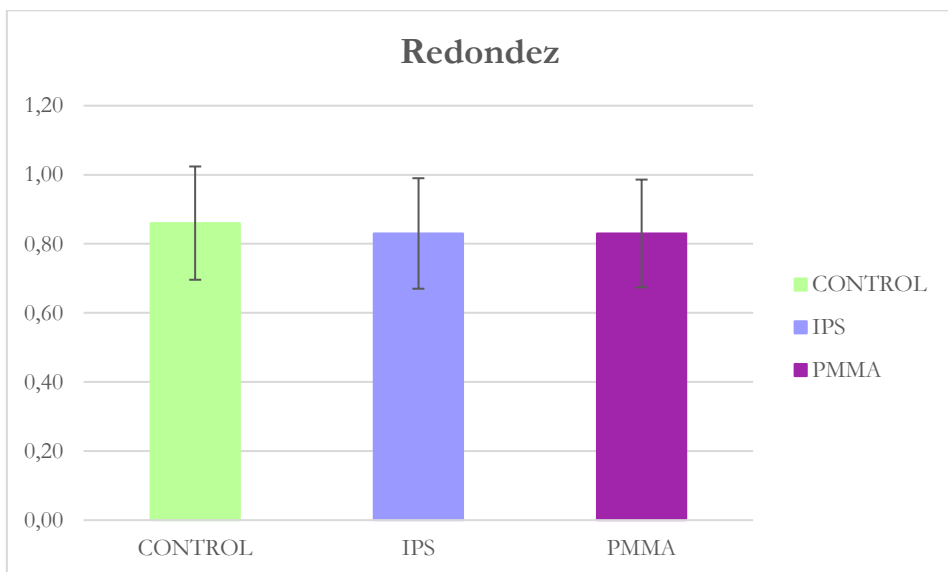


Figura 88: Representación gráfica de los valores medios de redondez calculados a partir de imágenes a un aumento 20x sobre las tres superficies analizadas en el estudio (control, IPS y PMMA).

Tal y como quedan representados en el gráfico de la Fig. 89, los valores medios que fueron obtenidos a partir de los resultados del tamaño medio de área celular fueron de $759,32 \pm 148,35 \mu\text{m}^2$ para el control, $561,84 \pm 58,10 \mu\text{m}^2$ para el IPS y $715,64 \pm 164,09 \mu\text{m}^2$ para el PMMA. Estos resultados mostraron una distribución normal, pero al no ser esta homogénea se realizó el test de Kruskal Wallis, mediante el cual se hallaron unas diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p = 4,97^3$).

Estas diferencias fueron significativas al comparar cada uno de los grupos entre sí, siendo el valor $r = 0,63$ (efecto grande) al comparar IPS – control, $r =$

0,15 (efecto pequeño) para PMMA – control y $r = 0,55$ (efecto grande) al comparar ambos grupos de estudio (PMMA – IPS).

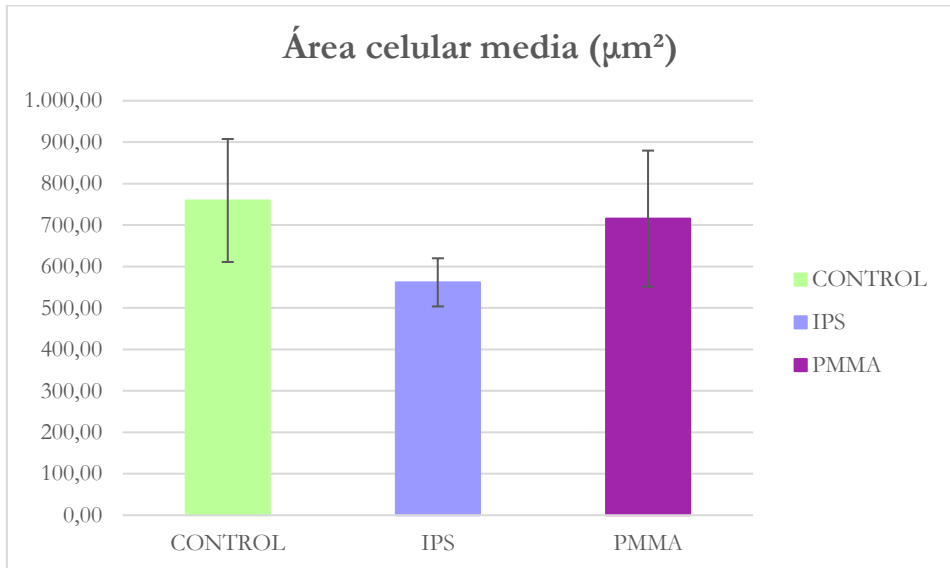


Figura 89: Representación gráfica de los valores medios del área celular calculados a partir de imágenes a un aumento 20x sobre las tres superficies analizadas en el estudio (control, IPS y PMMA).

Finalmente, los valores del último parámetro citomorfométrico analizado fueron los del perímetro celular (Fig. 90): $357,85 \pm 154,00 \mu\text{m}$ en el control, $313,46 \pm 207,80 \mu\text{m}$ en el IPS y $268,84 \pm 59,49 \mu\text{m}$ en el PMMA (gráfico x), hallándose entre ellos diferencias no significativas ($p = 0,12$). En estas diferencias, la influencia del material sobre el que se sembraron las células tuvo un efecto pequeño al comparar IPS – control ($r = 0,21$ y $p = 0,18$), mediano para PMMA – control ($r = 0,34$ y $p = 0,06$) y pequeño para IPS – PMMA ($r = 0,12$ y $p = 0,44$).

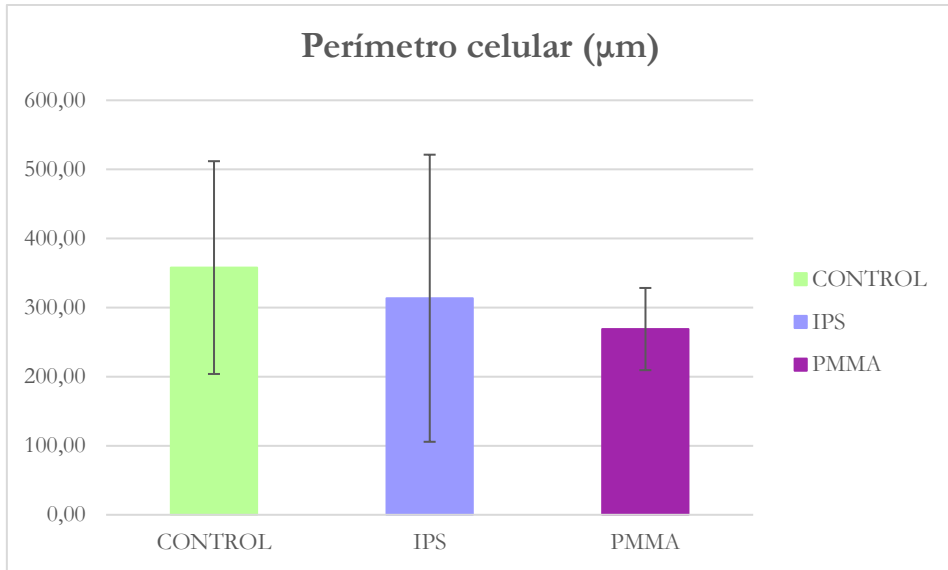


Figura 90: Representación gráfica de los valores medios del perímetro celular calculados a partir de imágenes a un aumento 20x sobre las tres superficies analizadas en el estudio (control, IPS y PMMA).

6.3. Análisis citotóxico de los materiales.

Para poder analizar la tasa de viabilidad celular sobre los distintos materiales de estudio, se sembraron sobre cada disco y control un volumen de 1×10^5 células. Estas se mantuvieron incubadas durante 24 horas antes de utilizar el reactivo MTT en distintas franjas de tiempo (a las 24, 48 y 72 horas). De esta forma se pudo calcular el porcentaje de células viables hallado mediante la lectura de la absorbancia a 590 nm. Con ello se obtuvo el grado de citotoxicidad de los dos materiales que fueron analizados.

Al aplicar el reactivo MTT, tal y como fue explicado previamente en el presente trabajo, se formaron cristales de formazán. Los cristales que se produjeron en los controles pudieron ser visualizados con ayuda del microscopio invertido de contraste de fases Olympus CKX41. Como se pueden ver en las imágenes (figuras 91 y 92), en un primer momento se observan gránulos de formazán en el interior de los fibroblastos, estos irán aumentando de tamaño hasta el punto en que serán excitados por su exceso de producción. Estos cristales cobran entonces un aspecto de mayor tamaño y con un punteado en forma de aguja que se localiza en el espacio extracelular.

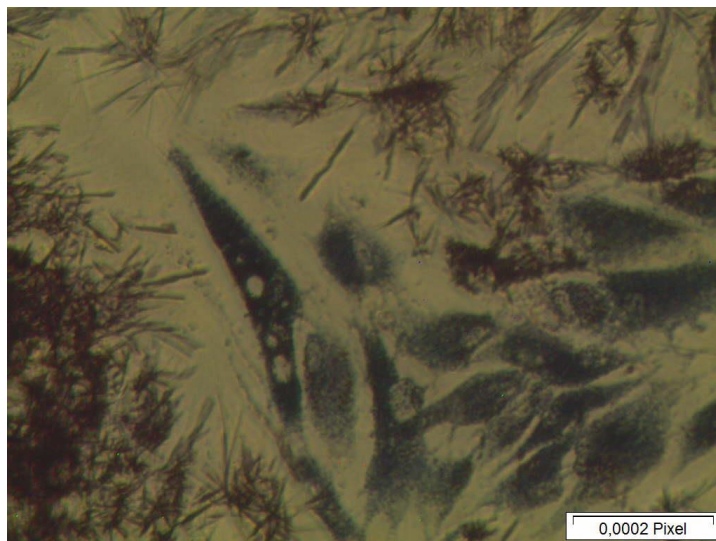


Figura 91: Formación de cristales de formazán en forma de gránulos intracelulares.

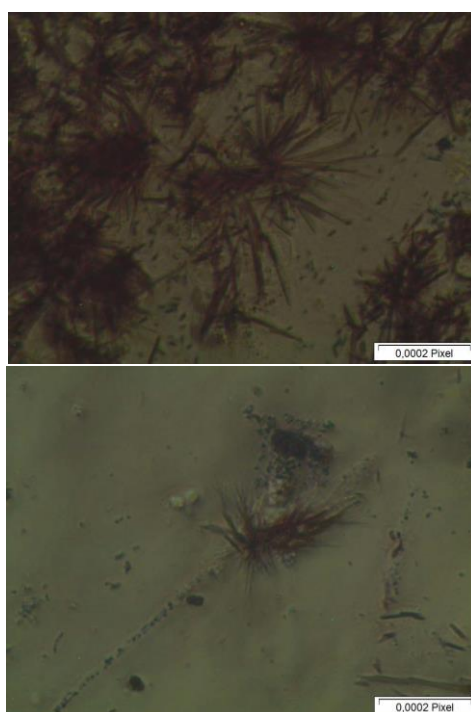


Figura 92: Formación de cristales de formazán excretados al espacio extracelular.

RESULTADOS

A continuación, se presentan los valores de viabilidad celular (tabla 13) en su media aritmética y desviación estándar obtenidos para cada una de las variables estudiadas (cultivo celular sobre superficies de PMMA, LS₂ y poliestireno estudiadas a las 24, 48 y 72 horas). Se le otorgó un valor de viabilidad del 100 % al control y, a partir de ahí, se fueron calculando los valores de tasa de viabilidad celular de las muestras estudiadas.

Tabla 13: Tasa de viabilidad en valores medios y desviación estándar de cada material de estudio en relación al control estudiados en los tres tramos de tiempo (24, 48 y 72 horas).

Tasa de viabilidad (%)	LS ₂	PMMA	Control
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE
24 h	59,46 ± 3,32	40,65 ± 3,33	100
48 h	67,36 ± 7,21	58,85 ± 3,19	100
72 h	94,53 ± 2,30	86,63 ± 3,75	100

Podemos observar como a las 24 horas los valores sobre LS₂ son notablemente superiores a los del PMMA, sin embargo, a las 48 y 72 horas los niveles de viabilidad sobre ambos materiales se llegan a igualar más. Siendo los valores a las 48 horas intermedios y llegando a asemejarse a los del control a las 72 horas. Se obtuvo la mayor citotoxicidad en los discos de PMMA a las 24 horas. Estos valores de tasa de viabilidad celular aparecen representados en la siguiente gráfica (Fig. 93).

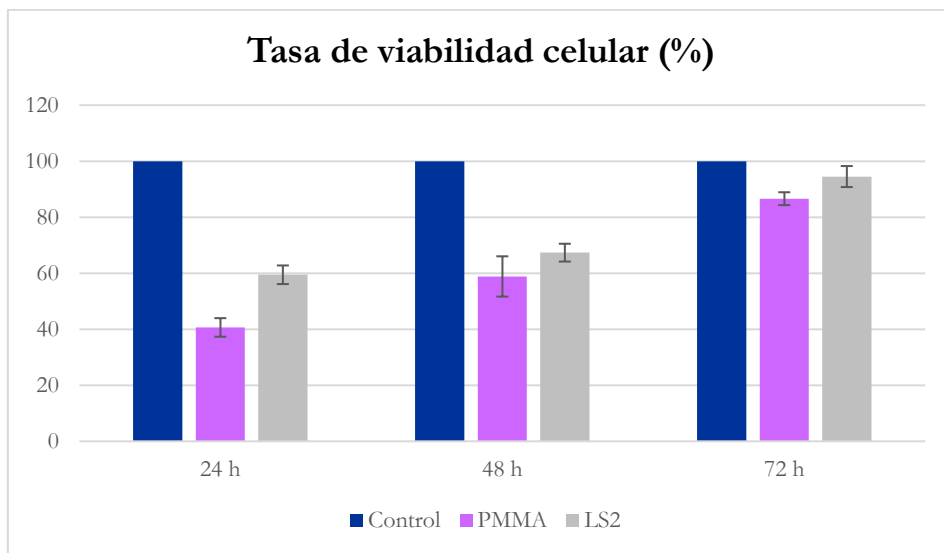


Figura 93: Gráfica de la tasa de viabilidad en valores medios y desviación estándar de cada material de estudio en relación al control estudiados en los tres tramos de tiempo (24, 48 y 72 horas).

En un primer lugar se llevó a cabo el test de Shapiro Wilk para comprobar la existencia de normalidad en las variables, de modo que se pudo observar una distribución normal de todas las variables a excepción del PMMA a las 72 horas. De este modo, se pudo aplicar el test de ANOVA (Tabla 14) para comprobar las medias únicamente en los tramos de 24 y 48 horas. En el análisis se empleó el índice de varianza ω^2 (omega al cuadrado) para poder cuantificar la influencia del material empleado en el porcentaje de viabilidad celular. A continuación, se presentan los resultados del análisis de varianza en una tabla resumen.

Tabla 14: Tabla resumen de los resultados del análisis ANOVA.

Tasa viabilidad celular (%)	Estadístico F	Valor p	ω^2
24 h	998,70	$p < 0,001$	0,98
48 h	182,33	$p < 0,001$	0,94

Para poder calcular la existencia de diferencias estadísticas entre los grupos, se utilizó la prueba t (Pairwise t-test) (Tabla 15), donde se fueron comparando dos a dos cada uno de los grupos a las 24 y 48 horas. En esta prueba

se obtuvieron diferencias entre todos los grupos, siendo las diferencias entre IPS y PMMA estadísticamente significativas ($p < 0,05$) a las 24 y 48 horas, tal y como se ve expuesto en la siguiente tabla (tabla X).

Tabla 15: comparación de los grupos a las 24 y 48 horas mediante el test-t (Pairwise t-test).

Viabilidad en la variable franja de tiempo	Grupo I	Grupo II	Valor p
24 h	IPS	PMMA	< 0,001*
	IPS	Control	< 0,001*
	PMMA	Control	< 0,001*
48 h	IPS	PMMA	0,03
	IPS	Control	< 0,001*
	PMMA	Control	< 0,001*

* Se estableció una diferencia significativa entre medias a nivel 0,05.

De este modo, se obtuvieron diferencias entre todos los grupos a las 24 horas ($p < 0,001$). Esas diferencias que se pueden observar son estadísticamente significativas entre los materiales de estudio y el grupo control tanto a las 24 como a las 48 horas.

A las 24 horas la tasa de viabilidad presentó diferencias entre los grupos estadísticamente significativas ($F = 998,70$ y $p < 0,001$). Según el valor obtenido de omega cuadrado ($\omega^2 = 0,98$), podemos extrapolar que el tipo de material utilizado influye en un 98 % en los valores de viabilidad celular obtenidos. Estos valores fueron mayores en el control (100 %), seguidos del IPS ($59,46 \pm 3,32$ %) y el PMMA ($40,65 \pm 3,33$ %).

A las 48 horas la tasa de viabilidad también mostró diferencias estadísticamente significativas ($F = 182,33$ y $p < 0,001$), influyendo en un 94 % el tipo de material empleado (siendo $\omega^2 = 0,94$). Se volvió a repetir el mismo patrón de viabilidad de los grupos estudiados, obteniendo el control (100 %) una tasa de

viabilidad mayor IPS ($67,36 \pm 7,21$ %), que a su vez fue superior a la del PMMA ($58,85 \pm 3,19$ %).

Para poder calcular la magnitud de las diferencias entre los distintos grupos en los tramos de tiempo con una distribución normal de las variables se utilizó la *d* de Cohen. A las 24 horas se obtuvo una diferencia entre el grupo IPS y PMMA con un efecto grande ($d = 5,66$); entre el grupo IPS y control se obtuvo un efecto muy grande ($d = 17,26$); por último, entre PMMA y control se obtuvo también un efecto muy grande ($d = 25,22$).

A las 48 horas, estos valores disminuyeron, pero continúan considerándose efecto grande ($d > 0,8$): entre IPS y PMMA se obtuvo una $d = 1,53$; entre IPS y control se obtuvo una $d = 6,4$ y, por último, entre el grupo PMMA y el control la $d = 18,26$ (efecto muy grande).

Dado que a las 72 horas no se obtuvo una distribución normal de las variables, se llevó a cabo la prueba Kruskal Wallis. Se probó la existencia de diferencias entre todos los grupos, siendo estas estadísticamente significativas ($p < 0,001$). La viabilidad a las 72 horas fue mayor en el grupo control (100 %) seguida del IPS ($94,53 \pm 2,30$ %) y encontrándose en último lugar el PMMA ($86,63 \pm 3,75$ %), patrón que se fue repitiendo en todos los tramos de tiempo analizados.

Para poder comparar los distintos grupos, se utilizó la prueba de la U de Mann-Whitney, mediante la cual se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre cada grupo de estudio, tal y como puede verse representado en la tabla 16.

Tabla 16: comparación de los grupos a las 72 horas mediante el test U de Mann-Whitney.

Viabilidad en la variable franja de tiempo	Grupo I	Grupo II	Grupo III
72 h	IPS	IPS	Control
	PMMA	Control	PMMA
Valor p	< 0,001	< 0,001	< 0,001

* Se estableció una diferencia significativa entre medias a nivel 0,05.

En este tramo de tiempo (72 horas) se analizó también la influencia del material en los resultados en la variabilidad, y se obtuvo una influencia del 83 % ($\epsilon^2 = 0,83$), ya que se estableció épsilon cuadrado como índice de varianza.

6.4. Análisis de la secreción de colágeno tipo I sobre los materiales.

En esta fase del estudio se cuantificaron los niveles de secreción de colágeno tipo I producidos por los fibroblastos en dos tramos de tiempo distintos (24 y 72 horas). Para ello se sembró una cantidad previamente calculada mediante diversas pruebas de 3×10^5 células en cada uno de los discos en un volumen total de medio de cultivo de 500 μ L. El medio no fue modificado durante la duración del experimento (24 y 72 horas respectivamente).

Se realizó una lectura de los patrones a 450 nm, a partir de la cual se pudo obtener la curva estándar (figura 94) que sirvió para extrapolar esos valores a las densidades ópticas de las muestras y, con ello, hallar los niveles de concentración de colágeno en cada caso.

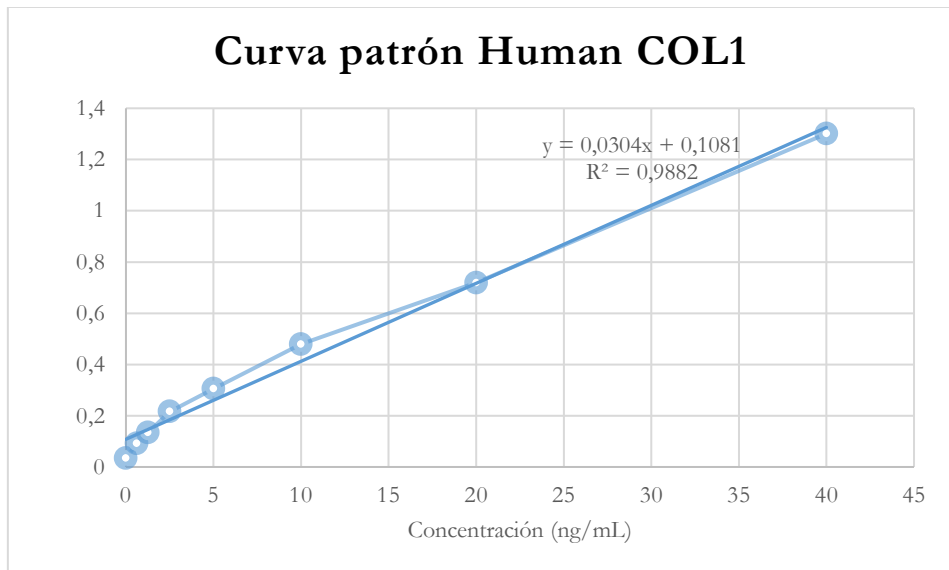


Figura 94: Curva patrón donde se presenta la ecuación de la recta que permite hallar las concentraciones de las muestras, así como el coeficiente de determinación R^2 . Este coeficiente, al presentar un valor cercano a 1, representa la adecuación de la curva.

A continuación, podemos ver representados en la tabla 17 los valores medios con su desviación estándar de la secreción de colágeno tipo I excretada al

medio a las 24 y 72 horas en los tres grupos analizados. Se puede observar cómo las mayores concentraciones se obtienen en el grupo LS₂, manteniéndose el grupo PMMA con valores intermedios entre el control y el LS_s. Este patrón se mantiene idéntico a las 24 y 72 horas, a pesar de que a las 72 horas disminuyen considerablemente los valores hallados sobre todas las superficies (LS_s, PMMA y control). Estos datos se pueden ver expresados en la gráfica de la Fig. 95.

Tabla 17: media aritmética y desviación estándar de los valores obtenidos de secreción de colágeno tipo I en los tres grupos del estudio a las 24 y 72 horas.

Secreción de COL1 (ng/mL)	LS ₂	PMMA	Control
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE
24 h	5,56 ± 0,41	3,01 ± 0,06	1,63 ± 0,23
72 h	2,25 ± 0,13	0,38 ± 0,16	0,22 ± 0,03

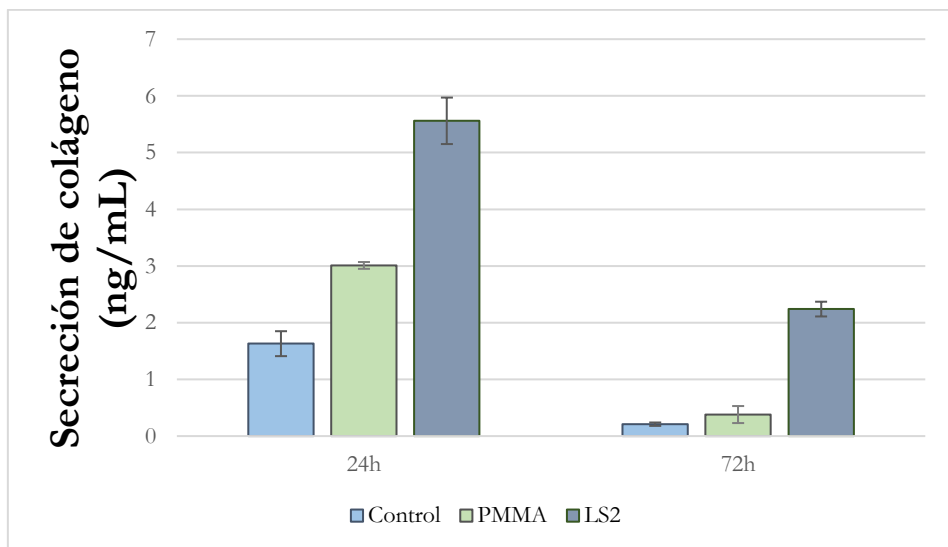


Figura 95: Gráfica representativa de las secreciones de colágeno tipo I halladas a las 24 y a las 72 horas en los tres grupos del estudio (Control, PMMA y LS₂).

Se llevó a cabo el test Shapiro-Wilk, mediante el cual se demostró que a las 24 horas la distribución de las variables fue normal, pero a las 72 horas no. De este modo, se llevó a cabo el test ANOVA (Tabla 18) para poder comparar las medias obtenidas a las 24 horas. Se estableció el valor omega cuadrado como

porcentaje de influencia del material empleado en cada caso para los resultados de secreción de COL1 obtenidos.

Tabla 18: Resultados del análisis de varianza a las 24 horas (ANOVA).

Secreción de COL1 (ng/mL)	Estadístico F	Valor p	ω^2
24 h	211,22	$p < 0,001$	0,97

Posteriormente se llevó a cabo una comparativa entre los grupos mediante el test-t (Pairwise) (tabla 19). Se pueden observar diferencias estadísticamente significativas a las 24 horas ($F = 211,22$ y $p < 0,001$). Las diferencias que se observan entre los grupos y los grupos de estudio con el grupo control a las 24 horas ($p < 0,05$) son también significativas. Estas diferencias se ven influidas en un 97 % por el material sobre el que se desarrolla el cultivo celular ($\omega^2 = 0,97$).

La secreción de colágeno superior a las 24 horas fue en el LS₂ ($5,56 \pm 0,41$), seguidas del PMMA ($3,01 \pm 0,06$). En el grupo control se obtuvieron los valores de secreción más bajos ($1,63 \pm 0,23$).

Tabla 19: comparación de los grupos a las 24 horas mediante el test-t (Pairwise t-test).

Colágeno en la variable franja de tiempo	Grupo I	Grupo II	Valor p
24 h	IPS	PMMA	0,002
	IPS	Control	$< 0,001^*$
	PMMA	Control	0,001

* Se estableció una diferencia significativa entre medias a nivel 0,05.

Para poder cuantificar las diferencias entre los grupos a las 24 horas se calculó la d de Cohen. Se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo IPS y Control ($p < 0,001$) con un tamaño del efecto grande ($d = 11,79$). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el

grupo IPS y PMMA ($p = 0,002$) y PMMA y control ($p = 0,001$), siendo el tamaño del efecto grande en ambos casos, con una $d = 8,62$ y $d = 8,35$ respectivamente.

Al no obtener una distribución de variables normal a las 72 horas, se realizó el test de Kruskal-Wallis, mediante el cual se determinó la existencia de diferencias entre los grupos ($p = 0,018$). Luego se llevó a cabo el test de Mann-Whitney, mediante el cual se determinó que existían diferencias entre el grupo IPS y PMMA ($r = 0,77$) y entre el grupo IPS y control ($r = 0,76$). Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre el grupo PMMA y el grupo control a las 72 horas.

DISCUSIÓN



7. DISCUSIÓN

En este estudio se analizaron dos materiales ampliamente conocidos en el campo de la Odontología desde hace décadas: el disilicato de litio y el polimetilmetacrilato.

7.1. Consideraciones previas.

Tal y como se ha ido desarrollando a lo largo de la presente Tesis Doctoral, a pesar de que ambos materiales fueran utilizados con anterioridad, muchas de sus aplicaciones clínicas actuales eran desconocidas en sus inicios.

Por un lado, el PMMA ha sido clásicamente utilizado como material provisional o aplicado en prótesis de resina, aparatología ortodóncica y férulas [20,150], siendo sin duda el derivado polimérico más empleado a nivel odontológico. Una fácil aplicación, durabilidad, estabilidad colorimétrica, así como bajo coste económico [19] son algunas de las principales ventajas que han mantenido este producto entre los más usados durante todo este tiempo. Por otro lado, el disilicato de litio se trata de un tipo de cerámica que ha destacado por sus excelentes propiedades estéticas y mecánicas. Este material comenzó a emplearse para la confección de carillas, inlays o coronas de recubrimiento total entre otros usos [21].

A parte de los métodos clásicos de fabricación, hoy día podemos encontrar también que estos materiales se comercializan en forma de bloques, los cuales sirven para su posterior diseño y fresado mediante el sistema Computer Aid Design/Computer Aid Manufacturing (CAD/CAM). Este sistema ofrece numerosas ventajas, entre las que se encuentran la velocidad del tratamiento y la reducción de tiempo de sillón [21]. A este grupo pertenecen el IPS e.max CAD y el Vita CAD Temp, motivo de nuestro estudio *in vitro*.

En este caso, una de las indicaciones en la que se centra nuestro estudio es la confección de pilares transepiteliales de estos materiales, aditamentos encargados de conectar los implantes dentales con su corona, alejando, por tanto, la zona de conexión. Clásicamente estos pilares han sido confeccionados de materiales como el titanio o algunas aleaciones como el cromo-cobalto, destacando sobre todo el titanio, dada su biocompatibilidad demostrada, así como sus indudables propiedades mecánicas demostradas [78,152-154]. Sin embargo, este contacto con los materiales de estudio no es siempre directo a este tipo de aditamento protésico, siendo en muchas ocasiones directos a la zona del cuello pulido del implante (*implantes tissue level*) o las propias coronas [155-157].

La creciente demanda estética de los pacientes, sobre todo en aquellos con biotipo fino donde podían llegar a translucirse los aditamentos metálicos

colocados, obligaron a la comunidad científica a centrarse en la búsqueda de materiales con iguales o comparables propiedades mecánicas y estabilidad química, así como evidentes mejoras estéticas para este tipo de casos [92,131,158,159].

A parte del titanio, que es un claro *gold standard*, podríamos hablar del zirconio como su sucesor estético que se ha ido introduciendo en los últimos veinte años. Son muchos los autores que han hablado de sus ventajas desde que se comenzó a usar con esta indicación, entre las que destacan: sus adecuadas propiedades mecánicas, su biocompatibilidad, su resistencia a la fractura y tolerancia de los tejidos que lo rodean [87,108,160-162].

Sin embargo, en los últimos tiempos se ha ido viendo cómo este material también presenta importantes desventajas; un ejemplo de ello es su vulnerabilidad a la degradación ante bajas temperaturas, fenómeno que puede llegar a tener lugar durante su uso clínico. Este suceso es causado porque este material es polimórfico, o lo que es lo mismo, cambia a tres formas diferentes según la temperatura a la que se encuentre. Al producirse estos cambios se genera una expansión volumétrica de entre el 3 – 4 %, que lleva a veces a que penetre agua en la mayor parte del material [163].

Por todo esto, se han ido buscando nuevas alternativas a los *gold standard*, introduciendo materiales cerámicos, capaces de aportar una excelente estética [64,92,161] con la que pacientes y clínicos obtengan los mejores resultados. En esta línea, Brunot-Gohin y cols destacaron que el disilicato de litio se trataba de una cerámica de una apariencia muy similar a la de dientes naturales, prueba por tanto de sus altísimamente estéticos resultados, unida a una alta resistencia a la flexión (360 – 900 MPa) en el caso del IPS e.max. Este autor, además, comentó que se trataba de una de las cerámicas más duraderas a largo plazo [162]. Rutkunas y cols, también planteó el uso de materiales poliméricos con esta indicación, ya que, según refirió, actualmente la literatura a ese respecto suele ser escasa y normalmente se centra en comparar los materiales anteriormente citados, a pesar de que ya son bastante conocidas sus ventajas e inconvenientes [164].

Las funciones ideales que se buscan en el material de un pilar transepitelial han sido enumeradas por varios autores: ser capaz de propiciar una correcta estabilidad de los tejidos blandos y duros que los rodean, facilitar la poca acumulación de placa a su alrededor, que presente suficiente estabilidad, que posea una estética aceptable y que no sufra decoloración que pueda afectar a la mucosa que le rodea y que no muestren desgaste ni estimulen el sistema inmune o sea capaz de generar reacciones alérgicas [78, 165-168].

En este estudio se han intentado responder a la duda de si todas estas características ideales se reúnen en los materiales con los que se experimenta. Para ello es importante ser conocedores de la información previa de la que se dispone en la literatura, siendo conscientes de las limitaciones que suponen comparar los

resultados obtenidos con los de otros autores. En muchas ocasiones nos encontramos ante algunas limitaciones que se enumeran a continuación:

- La forma en la que se expresan los resultados.
- La diversidad de ensayos aplicados para estudiar un mismo campo.
- La variedad de materiales similares a los protagonistas en que nos tenemos que apoyar en muchas ocasiones para poder obtener una conclusión.
- La dificultad que supone a veces extrapolar en ocasiones resultados *in vitro* a la realidad *in vivo*.

Teniendo toda esta información presente, se ha podido comprobar que hasta la fecha de redacción de este texto no existe en la literatura ninguna publicación que compare estos dos materiales en relación a las pruebas redactadas en el apartado de “Material y Método”.

7.2. Estudio directo sobre discos.

Antes de cultivar células sobre las superficies de los discos de estudio centramos nuestro estudio en analizar características sobre la superficie y composición de los materiales que pueden llegar a afectar a la adhesión y crecimiento fibroblástico.

El papel que juega el tejido blando periimplantario es el de crear una barrera que selle con una unión potente la zona del medio oral con el pilar transepitelial. Este sellado ha de ser lo más hermético posible, con el fin de lograr impedir la entrada de microorganismos que puedan llegar a producir una alteración de la zona. Estas variaciones pueden ir desde una migración apical del tejido blando, desprotegiendo gran parte del pilar, hasta la producción de pérdida ósea marginal o incluso un cuadro de periimplantitis [92].

7.2.1. Análisis de la composición de los materiales.

Para poder analizar la composición de cada uno de los materiales se utilizó la tecnología EDS. En el caso del IPS e.max CAD el fabricante refiere estar compuesto por SiO₂, Li₂O, K₂O, MgO, Al₂O₃, P₃O₅, ZnO entre otros óxidos, lo cual se confirmó en su análisis, hallando una gran proporción de silicio y oxígeno entre sus componentes.

El litio no pudo ser detectado mediante esta técnica, algo de lo que ya han hablado otros autores como Riquieri y colaboradores con anterioridad, explicando que el análisis EDS es incapaz de detectar algunos componentes como el litio debido a su bajo peso molecular [169].

Análogamente fue estudiada la composición del Vita CAD-Temp, compuesto según el fabricante por polimetilmetacrilato ($C_5O_2H_8$) en un 82-86 wt%, dióxido de silicio en un 14-17 wt% y un microrelleno con pigmentos y refuerzo. En el análisis EDS pudimos detectar carbono y oxígeno principalmente, seguido de azufre y silicio.

Es sabido que el carbono se trata del principal elemento de las cadenas de PMMA [19,157], pero también se pueden hallar otros elementos como hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, cloro, azufre y flúor.

Tal y como comenta el fabricante, no se han hallado tampoco monómero residual de la polimerización del material, lo cual ya es sabido que supone una gran ventaja, ya que en los casos clásicos en que se ha utilizado PMMA autopolimerizable entre otras presentaciones previas al sistema CAD/CAM, la liberación al medio oral de monómero se ha visto asociada con efectos citotóxicos, pudiendo producir reacciones alérgicas entre otros efectos adversos. La prepolimerización del PMMA antes de su fresado hace que durante el periodo de almacenamiento tenga lugar el proceso de post-polimerización, así como un fenómeno de relajación del material [18,157]. Estos datos concuerdan con el hecho de que no se hallen restos de monómero en la superficie.

No se ha podido demostrar cuál es la influencia de la mayoría de componentes de los materiales a nivel de los tejidos que se apoyan sobre ellos, tal y como han referido autores como Yamano y colaboradores. Se ha visto que es posible que pueda afectar a la cantidad y adherencia de algunas proteínas, así como la conformación, orientación y fuerza de su adhesión [108,170,171].

7.2.2. Análisis de la morfología de los discos.

Al visualizar los discos al microscopio electrónico de barrido se pudo observar ciertas diferencias entre ambos materiales. Por un lado, el disilicato presenta una superficie más heterogénea clásicamente provocada por el proceso de sinterizado, mientras que pudimos observar cómo el PMMA presentó una anatomía un poco más regular, con círculos concéntricos que están asociados al proceso de maquinado.

Estas diferencias en el relieve pueden resultar clave al relacionarlas con los resultados citomorfológicos obtenidos. Tal y como se observó, de todos los valores analizados, únicamente se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la longitud media del citoesqueleto celular, siendo superior en los discos de PMMA que en los de LS_2 .

Este dato concuerda con la observación de Pae y colaboradores en 2008, donde comentaron que la orientación fibroblástica suele ser paralela a las

microretenciones de su sustrato. Un mayor esparcimiento del citoesqueleto podría implicar la adaptación sobre estas micro-retenciones en la superficie [131].

Además, puede ser indicador del nivel de respuesta celular, ya que el citoesqueleto es el encargado de coordinar señales reguladoras que los fibroblastos reciben del medio [104,105].

7.2.3. Perfilometría.

La rugosidad de los materiales es un tema que sigue siendo analizado por los autores a día de hoy. Nuestros resultados se presentaron como rugosidad media (S_a), siendo en el caso del IPS de $1,57 \pm 0,34 \mu\text{m}$ y en el del PMMA de $0,38 \pm 0,02 \mu\text{m}$. Debemos tener en cuenta que muchos de los autores no miden la rugosidad con el mismo parámetro, siendo especialmente común el uso de la rugosidad de la media aritmética (R_a) entre otros [172].

Unos valores reducidos de rugosidad se han visto asociados a un mayor confort del paciente por provocar una menor fricción, aunque debemos tener en cuenta que son valores muy superiores a los obtenidos los que es capaz de percibir la lengua [35].

Existe variedad en la clasificación de las rugosidades, por un lado, Pendegrass y colaboradores concluyeron que la adhesión y proliferación celular se veía aumentada en valores comprendidos entre $0,03$ y $0,3 \mu\text{m}$, al tiempo otros autores como Pabst y cols consideran superficies rugosas aquellas que superan valores de $>1 \mu\text{m}$, estableciendo valores típicos para los materiales dentales en $< 1,3 \mu\text{m}$ [87,92].

Tradicionalmente se ha hablado de que la adhesión fibroblástica es mejor en aquellas superficies que son más suaves, sin embargo, no podemos decir que exista un consenso actual en la literatura acerca la superficie ideal para entrar en contacto con la mucosa. Algunos autores refieren que el crecimiento celular es mayor sobre superficies suaves, mientras que otros hablan de que una superficie excesivamente pulida puede propiciar el desplazamiento apical del epitelio de unión del implante, lo que puede traducirse en una vía de entrada para bacterias [87,92,108,169,172,173].

También se ha hablado tradicionalmente de que la adhesión bacteriana es superior en aquellas superficies que son rugosas. Esta adhesión inicial puede llegar a propiciar la colonización bacteriana en apenas ocho horas [174-176].

Por todo ello, no podemos hablar de que los resultados obtenidos sean negativos, más bien al contrario, ya que se pudo observar un crecimiento celular y expansión adecuadas para las primeras horas tras la siembra [27]. Autores como Yamano y Brunot-Gohin, han propuesto también la realización de dos tipos de

superficies en el pilar transeptelial, siendo una zona más rugosa en contacto con el tejido conectivo y otra más pulida para impedir la entrada de bacterias. Esta propuesta hasta la fecha no ha sido llevada a cabo por más autores, pero podría tratarse de la solución definitiva y aportar un consenso en la comunidad científica [108,162].

7.2.4. Humectabilidad.

En nuestro estudio, al contrario que en la mayoría de los artículos que analizan este tipo de materiales, decidimos analizar no sólo el ángulo de contacto con el agua, sino que usamos también la técnica de gota sésil para obtener el ángulo de contacto con el diyodometano. Estos dos líquidos tienen tensiones superficiales conocidas y muy distintas entre sí ($\sigma_{\text{agua}} = 72,8 \text{ mN/m}$ y $\sigma_{\text{diyodometano}} = 50,8 \text{ mN/m}$), lo que nos permitió obtener la componente dispersiva y la componente polar para poder calcular la energía libre de superficie (ESL).

Se obtuvo un ángulo de contacto de agua de $44,64^\circ$ en el caso del LS₂ y de $72,55^\circ$ en el PMMA, con unas desviaciones estándar de 3,42 y 2,9 respectivamente. En el caso del diyodometano fue $\Theta = 61,72 \pm 1,43$ para el LS₂ y $\Theta = 44,15 \pm 3,11$ para el PMMA. Como ya se ha comentado anteriormente, las diferencias fueron estadísticamente significativas.

En relación a estos datos existen distintas clasificaciones, tradicionalmente un material usado con esta indicación debe tener un ángulo de contacto al agua que oscile entre $30 - 60^\circ$, como ya han comentado ciertos autores [177]. Sin embargo, Shim y colaboradores clasificaron en su estudio en el grupo de materiales hidrófobos a aquellos en los que se obtuvieron valores superiores a 40° [178]. Esto contradice la denominación de materiales “parcialmente hidrófilos” que presentaron Dal Piva y colaboradores en 2018, donde valores comprendidos entre $0 - 180^\circ$ fueron considerados como parte de este grupo [179,180]. Kusakawa, por otro lado, considera valores similares a 80° ($\Theta_{\text{agua}} \approx 80^\circ$) como hidrófobos [181], mientras Rupp y colaboradores nos habla de un material hidrofílico cuando $\Theta_{\text{agua}} < 90^\circ$ [120].

Este último autor, además, comenta que un material clasificado como hidrófilo al hacer el análisis de gota sésil, usando para ello una visión microscópica, puede resultar hidrófobo si esta misma prueba se lleva a cabo bajo condiciones atmosféricas ambientales diferentes. Es por ello que asume que la naturaleza hidrófoba de muchos materiales reside en el atrapamiento de aire en microporos de su estructura que se posicionan entre el material y la gota sésil, lo que impide el contacto directo del líquido con el cuerpo sólido en estudio [120].

Todo esto nos hace pensar que, aunque las diferencias obtenidas entre nuestros materiales sean estadísticamente significativas ($p < 0,001$), siendo el VITA

CAD Temp un material considerablemente más hidrófobo, no podemos asegurar que este valor sea considerado como auténticamente hidrófobo, ya que no existe consenso en la comunidad científica sobre los valores a partir de los cuales un material puede clasificarse como hidrófilo o hidrófobo.

Estos valores, además, encajan con los obtenidos en la perfilometría, donde el PMMA obtuvo una rugosidad media menor que el disilicato de litio, lo cual según el razonamiento de Rupp puede deberse a que ciertos microporos que no fueron visibles con la tecnología de microscopio electrónico de barrido (SEM), fueron rellenados de moléculas de aire que impidieron la penetración del agua en el sustrato y mostró una imagen menos rugosa en las imágenes [120]. Es probable que estas pequeñas impurezas puedan ser detectadas desde una visión a nanoescala como la que puede ofrecer quizás la AFM.

Al comparar estos resultados con los de otros estudios, podemos comprobar como en nuestro estudio se obtuvo una hidrofiliidad mayor en el LS₂ de la que se ha podido ver. Quizás esto se deba a que la superficie de los discos, al no estar tratados ni pulidos o glaseados, permitió reducir la hidrofobicidad, tal y como otros autores han referido [162].

Algunos autores han observar que en superficies hidrofílicas los fluidos biológicos interactúan de mejor forma, permitiendo la adsorción proteínica y activación de los correspondientes receptores celulares que se producen en la naturaleza. Por otro lado, se ha visto que en superficies hidrófobas existe una tendencia a la contaminación por carbono, produciendo burbujas que pueden llegar a interferir con la adsorción y la activación de los receptores de adhesión celulares [70, 182].

Asimismo, se obtuvo una energía superficial de 55.55 ± 2.42 mN/m para el LS₂ y de 44.39 ± 1.44 mN/m para el PMMA, diferencias que fueron estadísticamente significativas también. Estos resultados van en concordancia con el hecho de que la energía libre de superficie sea inversamente proporcional al ángulo de contacto del agua. Además, podemos comprobar como ambos valores se encuentran dentro del rango $SFE \approx 40-50$ mN/m [156].

Varios autores han comentado que las superficies hidrófilas favorecen la adhesión de las células eucariotas como los fibroblastos, es decir, a mayor energía de superficie, mayor adhesión de las proteínas de la matriz extracelular, lo que se traduce en una mayor adhesión celular [164,178]. La hidrofilia se ha visto asociada a la formación de una película protectora de agua capaz de impedir o al menos limitar, la adhesión de microorganismos hidrófobos a estas superficies. Este tipo de microorganismos aparecen durante las primeras horas de colonización y se han visto relacionados sobre todo a superficies más rugosas según algunos autores [178], aunque como hemos podido comprobar, este tema no ha alcanzado aún un consenso definitivo en la comunidad científica.

Dado que el Vita CAD Temp se trata de un material provisional, aunque los resultados no sean nada desalentadores, podemos decir que en el caso de la humectabilidad no se ha cumplido la hipótesis nula. Se muestra a continuación la asociación visual que relaciona la rugosidad media (S_a) con la humectabilidad en ambos materiales (Figs. 96 y 97):

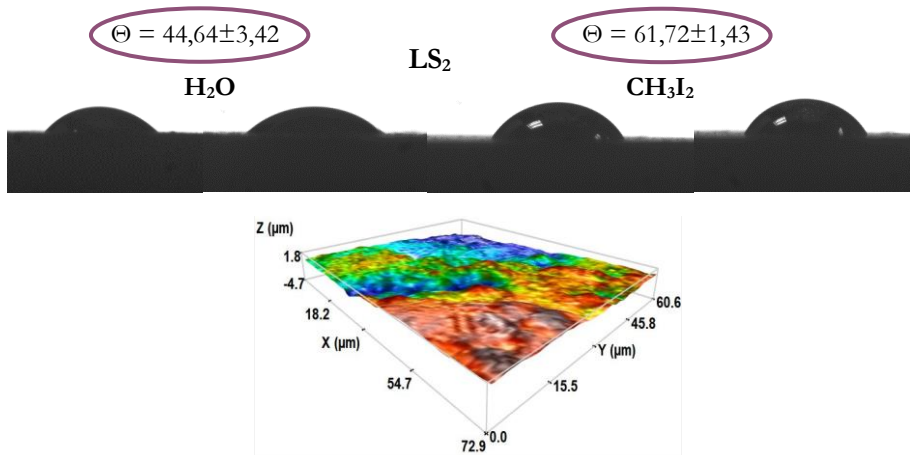


Figura 96: Representación del estudio de humectabilidad mediante gota sésil y rugosidad media (S_a) de los discos de LS₂. Las dos primeras imágenes muestran gotas de agua sobre la superficie, mientras en las dos segundas aparecen las gotas de diiodometano

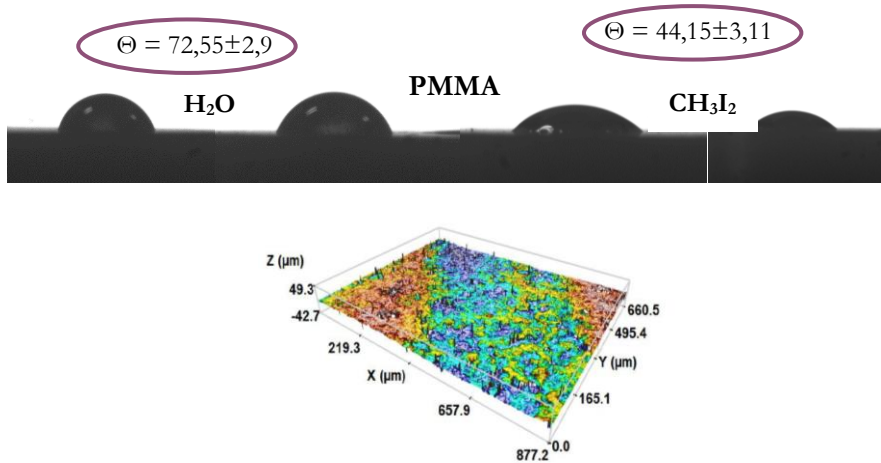


Figura 97: Representación del estudio de humectabilidad mediante gota sésil y rugosidad media (S_a) de los discos de PMMA. Las dos primeras imágenes muestran gotas de agua sobre la superficie, mientras que en las dos segundas aparecen las gotas de dióxido de carbono.

7.3. Estudio de cultivo de fibroblastos gingivales humanos sobre discos.

7.3.1. Tipo de célula utilizada.

Nuestro estudio fue llevado a cabo utilizando una línea celular de fibroblastos gingivales humanos inmortal, esta decisión tiene la gran ventaja de poder estudiar el comportamiento de este tipo de células de procedencia humana sin tener que contemplar la posibilidad de que haya variaciones según la procedencia del tejido.

Otros autores se decantaron en muchas ocasiones por fibroblastos de origen animal (principalmente de ratón) o de origen humano, obtenidos a través de la remoción de parte del tejido conectivo de la zona de exodoncia de un tercer molar incluido (en la mayoría de los casos) o incluso de cirugías periodontales [57,110]. Es importante ser conscientes de la variedad anatómica que se produce entre un fibroblasto del ligamento periodontal y uno que se encuentre a nivel de la mucosa periimplantaria [79,97,183]. Es por eso que debemos ser cautos al extrapolar muchos de los resultados que han sido publicados hasta la fecha.

7.3.2. Estudio citomorfométrico.

No fueron encontradas diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio en la mayoría de los parámetros citomorfométricos (área ocupada por el núcleo, conteo celular, tamaño del núcleo, perímetro celular, circularidad y área celular). Sin embargo, sí se hallaron diferencias significativas al comparar los valores de redondez y longitud media del eje mayor del citoesqueleto.

En este último parámetro se obtuvieron resultados superiores en el PMMA, lo que puede indicar un mayor esparcimiento fibroblástico acaecido al menos durante las primeras horas de cicatrización del tejido blando [128]. Hasta la fecha no hay ningún otro estudio que compare este valor entre ambos materiales, pero podemos hablar de la ventaja que supone.

Un buen sellado a las pocas horas de colocar el aditamento protésico que contacta con el tejido blando, puede favorecer la formación de una barrera hermética que impida el paso de microorganismos, lo que puede llegar a ayudar a la osteointegración del implante en aquellos casos donde el contacto tenga lugar tras la colocación del mismo (por ejemplo, en casos de carga inmediata o pilares provisionales conformados anatómicamente) [78,184-187].

En cuanto a la redondez, es sabido que el núcleo aumenta con el tamaño de la célula (ratio núcleo-citoplasmático), viniendo determinado en la mayoría de los casos por el tamaño del citoesqueleto más que por el tamaño total de la célula [188,189]. Sin embargo, en nuestro estudio no se ha visto relacionado un mayor tamaño o esparcimiento del citoesqueleto con el crecimiento del núcleo celular. Podríamos considerar que la redondez puede verse afectada por este hecho, aunque no hay autores que a fecha actual lo hayan confirmado.

Se ha visto relacionada la buena adhesión fibroblástica a las superficies de los sustratos con una baja circularidad celular, dando lugar al desarrollo de adherencias focalizadas y filopodia [190]. Este hecho no se ha podido corroborar en nuestro estudio, pero puede resultar de gran interés, ya que, aunque los valores medios de circularidad sobre ambos materiales no presentaron unas diferencias significativas a nivel estadístico, podría conjeturarse que una mayor expansión del citoesqueleto se puede asociar a una mayor adhesión al sustrato, ya que es a través de esta superficie donde se produce el proceso de adhesión [105,191-193].

7.3.3. Estudio de toxicidad.

En este estudio se llevó a cabo un ensayo de MTT, el cual se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, el cual es reducido por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. Resultado de ello, se acaba produciendo un compuesto de color azul que recibe el nombre de formazán, lo que permite evaluar la actividad mitocondrial, que se asocia a la cantidad de células vivas [130,194].

Este tipo de ensayo se ha utilizado en la Odontología desde hace tiempo para ser capaces de analizar el comportamiento celular ante diferentes superficies [130,189], existiendo una regulación en la ISO 10993-5 [127]. Sin embargo, hasta la fecha no existe una estandarización para poder llevar a cabo de manera equitativa estos estudios.

Muchos autores no se basan en la ISO, aplicando otro tipo de parámetros que dificultan su comparación. Además, la viabilidad celular no es estudiada por todos con el mismo ensayo, siendo algunos ejemplos XTT, MTS o XPS [156,195].

En nuestro caso a las 24 horas se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo LS₂ y el grupo PMMA, siendo los valores del primero $59,46 \pm 3,32$ % y del segundo $40,65 \pm 3,33$ %. Estas diferencias se igualan en los siguientes tramos (48 y 72 horas), consiguiendo resultados no significativos a las 48 horas. Mientras a las 72 horas, a pesar de que las diferencias son mucho menores, se siguen observando resultados significativos, obteniendo un $94,53 \pm 2,3$ en el IPS y un $86,63 \pm 3,75$ en el PMMA.

Atay y colaboradores presentaron una clasificación de la citotoxicidad de los materiales en su estudio de 2018 [195]. En el comenta que valores superiores al 90 % se considerarán asociados a materiales no citotóxicos, aquellos comprendidos entre el 60 y el 90 % serán considerados poco citotóxicos, los que obtengan valores de entre el 30 y el 59 % serán considerados moderadamente citotóxicos y por último los que obtengan valores menores al 30 % serán citotóxicos [195].

Ninguno de los materiales que presentamos obtiene valores considerados como tóxicos, aunque es cierto que en las primeras 24 horas se obtuvieron valores considerados como moderadamente citotóxicos en el caso del PMMA. Sin embargo, no podemos considerar este dato como preocupante, ya que con el paso de las primeras horas se puede extrapolar que los tejidos son capaces de adaptarse hasta alcanzar unos relacionados con los de uno de los *gold standard* de la Odontología, el IPS.

Algunos estudios obtuvieron, sin embargo, valores citotóxicos para el LS₂, lo que puede ser explicado por el uso de materiales no producidos mediante CAD/CAM, que pueden contener residuos de su manipulación en el laboratorio. Del mismo modo, el tipo de célula con el que se observa la viabilidad puede influir en los resultados obtenidos, ya que en casos sobre todo de células de origen animal pueden acarrear dificultades a nivel de anticuerpos específicos [160].

El hecho de que a las 24 horas los resultados del IPS muestren valores menores puede ser explicado por la liberación de iones cerámicos al medio (como pueden ser la alúmina y el silicio). Además, el zinc (forma parte de la composición del LS₂), es considerado un supresor de la viabilidad celular o aumentador de su citotoxicidad, por lo que la liberación de este tipo de elementos inorgánicos ha

podido alterar los resultados durante las primeras horas [133]. El disilicato de litio también ha sido comparado por otros autores con derivados del zirconio, obteniendo resultados semejantes entre ambos [162].

Los materiales provisionales más utilizados actualmente son el PMMA, las resinas bis-acryl y el polietileno de metacrilato, sin embargo, la gran ventaja del VITA CAD Temp es su fase de prepolimerización antes de ser preparado en forma de bloque para fresarse en el sistema CAD/CAM. Desafortunadamente, esta polimerización llega a su fin una vez en contacto con la mucosa periimplantaria. Este medio oral además está sujeto a una posible biodegradación de los materiales, la cual puede ser producida por procesos masticatorios, la saliva o incluso bacterias propias del medio oral. Todo ello puede producir la liberación al medio de componentes potencialmente tóxicos [195-197].

Es recomendable tener en cuenta que el PMMA es un material provisional, por lo que, aunque muchos autores hayan obtenido valores de citotoxicidad leve o moderada [35], están diseñados para mantenerse en contacto con los tejidos blandos únicamente durante un corto periodo de tiempo.

7.3.4. Estudio de la secreción de colágeno tipo I.

Durante el análisis de la secreción de colágeno tipo I pudimos comprobar como el LS₂ presentó una mayor producción, lo que nos obligó a rechazar la hipótesis inicial. Un hecho reseñable es que los valores obtenidos en las primeras 24 horas no son significativamente superiores a los del PMMA. Sin embargo, en la segunda etapa de tiempo analizada (72 horas), se pudo observar cómo decreció esta concentración de colágeno tipo I en el medio, mientras que en este caso las diferencias sí que pudieron considerarse estadísticamente significativas.

Es especialmente frecuente en los estudios *in vitro* como el nuestro hallar resultados superiores a los extrapolables a estudios *in vivo*. En este segundo supuesto, los fibroblastos no presentan un crecimiento tan elevado o proliferación celular, por lo que sus secreciones de colágeno suelen ser menores [68,198].

Otros autores hallaron resultados similares en el tiempo, ya que una vez que las células se anclan al sustrato tienden a disminuir de forma drástica la producción de colágeno [27,198]. Estas secreciones son indicativas de que la matriz extracelular fibroblástica se encuentra en continua remodelación, demostrando un excelente funcionamiento de este tipo de células [111].

Algunos autores, en lugar de realizar este tipo de estudio con ELISA, se decantaron por la realización de PCR donde se recoge información de las secreciones producidas en el ARN de las células [108,131,199], lo que hace imposible la comparación de sus resultados con los obtenidos en este estudio.

7.4. Implicación de los resultados obtenidos.

Este estudio *in vitro* nos ha ayudado a aportar información acerca del comportamiento de ambas superficies durante las primeras horas de asentamiento celular. Hemos podido comprobar cómo ambos materiales demostraron ser amigables con el tejido blando que los rodea.

Estos datos nos ayudan a promover su utilización clínica como pilares transepiteliales, ya que además aportan grandes resultados estéticos. En el caso del PMMA se ha podido observar cómo la expansión celular producida sobre su superficie se ve asociada con unos correctos valores de toxicidad y secreción de colágeno. Contar con un material provisional que posea estas excelentes características facilitará sin duda la práctica clínica, obteniendo tejidos de mayor calidad y con ello una creciente estética.

Muchos de los autores mencionaron la esterilización en autoclave [195] de los pilares transepiteliales, sin embargo, a nivel clínico y dadas las pruebas de laboratorio este paso en muchas ocasiones se reduce a una desinfección estricta. No parece que afecte a los resultados celulares, por lo que podría utilizarse cualquiera de las opciones.

Se ha podido demostrar un crecimiento celular rápido sobre ambos materiales, incluso en el caso del polimetilmetacrilato, hemos podido hallar una expansión del citoesqueleto estadísticamente superior a la de los fibroblastos cultivados sobre superficie de poliestireno y de disilicato de litio. Esto podría indicar una importante aplicación clínica en aquellos casos en lo que se decida utilizar pilares transepiteliales personalizados en caso de implantes post extracción. Estos casos son cada vez más frecuentes en clínica, habiéndose demostrado las ventajas no sólo a nivel de disminución de tiempo de cicatrización si lo comparamos a la colocación diferida de los implantes, sino también en el mantenimiento de los tejidos duros y blandos, limitando la reabsorción ósea natural que siempre tiene lugar tras la exodoncia de un diente. Un rápido crecimiento y aposición fibroblástica durante las primeras 24-72 horas tras colocar el pilar, puede suponer un mayor sellado de la zona, ya que el crecimiento de los queratinocitos depende fundamentalmente de la red de colágeno formada por los anteriores. Este hecho podría ser una gran ventaja para los implantes postextracción, ya que este sellado impediría el paso de bacterias u otros factores externos que puedan afectar a la correcta osteointegración del implante.

La idea de utilizar el uso de estos pilares transepiteliales provisionales durante el tiempo de cicatrización hace que los tejidos blandos puedan mantenerse prácticamente intactos en todo momento, obteniendo resultados cada vez más estéticos y por tanto naturales. Se ha comprobado que los pacientes hoy día reclaman cada vez más este tipo de resultados, siendo reacios en muchas ocasiones

a realizarse cirugías más complejas que logren el mismo objetivo a más largo plazo [178].

Además, la adaptación primaria de estos pilares provisionales hace que posteriormente, en la fase de escaneo o impresiones, se pueda reproducir perfectamente esta anatomía lograda para el pilar definitivo, consiguiendo mejores resultados tanto a nivel funcional como estético en un corto período de tiempo.

Muchos autores han demostrado además las grandes ventajas que supone el uso de del IPS e.max CAD y el Vita CAD Temp, las cuales, combinadas a los hallazgos en biocompatibilidad, citomorfometría, humectabilidad, preparación de la superficie y secreción de colágeno, nos ayudan a proponer a ambos materiales como la combinación ideal para obtener resultados ideales en implantología.

7.5. Limitaciones halladas.

A pesar de que podemos considerar que nuestro estudio aporta información valiosa sobre el comportamiento de estos materiales al contacto con fibroblastos, es interesante sintetizar algunos campos que podríamos mejorar para lograr datos más precisos.

En nuestro estudio nos centramos en comparar las características de dos materiales, uno provisional y otro definitivo. Sin embargo, en investigaciones futuras sería interesante ampliar el número de materiales estudiados, como pueden ser el PEEK o PEKK como opciones provisionales o el ZLS como opción definitiva. También hemos podido comprobar como muchos de los autores comparan sus materiales con el *gold standard* (titanio), lo que sin duda puede aportar una visión más global de los materiales que puedan tener esta misma indicación.

Hemos podido comprobar como en la literatura científica actual, la mayoría de los estudios publicados sobre materiales odontológicos utilizados como pilares transeptiliales se centra en comparar materiales provisionales entre sí y definitivos por otro lado, relacionando sus resultados con los del titanio. Es comprensible, y hemos podido comprobarlo en nuestro estudio, que los resultados de un material provisional sean algo menos positivos que los de un definitivo. Sin embargo, podría resultar de especial interés la relación entre los materiales provisionales ejemplificados anteriormente junto al PMMA, lo que nos llevaría a tener una visión más global de su comportamiento celular, además de poder comprobar cuál de ellos es más recomendable según qué caso.

Siguiendo este hilo conductor, en el caso de los materiales definitivos como pueden ser el zirconio, el disilicato de litio o el titanio, podría aportar mucha información su comparación. En este caso sí que hay publicaciones al respecto, lo

que facilitaría poder relacionar unos datos con otros, para así llegar a conclusiones más completas.

Una vez logrados todos estos datos, la comparativa entre ambos tipos de materiales sería el paso final, con el fin de comprobar realmente el volumen hallable en el grupo provisional con respecto al definitivo en cuanto a su comportamiento celular, biocompatibilidad y características de superficies.

Por todos es sabido que los estudios *in vitro* obtienen unos resultados que no son del todo extrapolables a los *in vivo*, esto se debe principalmente a que en condiciones de vida como las que describe Shim y cols, se hace imposible reproducir por completo el estado del medio oral, el cual se ve afectado por la saliva, bacterias, el pH, el sistema inmune y otras células entre otras variables [178]. Sin embargo, es conveniente recalcar la importancia de este tipo de estudios *in vitro* para la comunidad científica, ya que se trata de un paso previo fundamental antes de poder sentar las bases del desarrollo de un proyecto similar en humanos.

En el presente estudio hemos podido comprobar el comportamiento aislado de los fibroblastos, lo que sin duda nos ha aportado gran información al respecto. Estas limitaciones de los estudios *in vitro*, pueden verse menguadas incluyendo factores que puedan influenciar el comportamiento celular, como pueden ser la inclusión en el medio de bacterias periodontopatógenas capaces de formar cálculo en estructuras similares o aquellas asociadas a la peri-implantitis, así como saliva que fuera incluida al medio de cultivo. Algunos autores han publicado estas condiciones en estudios *in vitro* [55,179], sin embargo, ninguno de ellos aprovechó esta situación para la evaluación de los dos materiales protagonistas de este texto.

Hemos podido aportar información acerca del crecimiento fibroblástico temprano, es decir, con seguimiento de hasta 72 horas de la siembra sobre las superficies. En futuros proyectos podría facilitar información de interés realizar seguimientos a más largo plazo, aunque no debemos olvidar que, en algunos aspectos como la formación de colágeno tipo I, este mayor seguimiento no sería de especial interés. En estos casos, el colágeno es generado por los fibroblastos sobre todo en las primeras horas, para luego estabilizar su producción, ya que una vez que las células llegan a confluencia comienzan a inhibir su proliferación por contacto, y con ello las secreciones de colágeno [198].

En este estudio nos hemos centrado en el comportamiento de los fibroblastos, pero no podemos olvidar que el sellado epitelial forma parte de la función de los queratinocitos. Estas células, tal y como hemos podido ver, aprovechan la red de colágeno que producen los fibroblastos para migrar hasta la zona donde tenga lugar el proceso de cicatrización.

Un seguimiento a más largo plazo unido a la utilización de los distintos grupos celulares encargados de generar el sellado peri-implantario, ayudaría a extrapolar de una forma más fidedigna los resultados obtenidos *in vitro* al comportamiento que pueda alcanzarse *in vivo*. Como se ha podido comprobar, tanto los materiales en los que se centra esta investigación como algunos que se han nombrado, ya son hoy día comercializados y utilizados en estudios clínicos con esta misma indicación. La combinación de resultados celulares unida a estudios histomorfométricos junto a análisis clínico como pueden ser análisis de las dimensiones de tejido blando mediante la combinación de imágenes obtenidas mediante CBCT y fotografía o valores obtenidos del sondaje peri-implantario entre otros ejemplos, podrían aportar grandes avances.

Además, en este caso en particular, hemos centrado el uso de estos materiales sin alteración de su superficie, ya que los diferentes tratamientos de superficie en el mundo de la implantología están en continuo cambio sin llegar a un consenso. Podrían analizarse algunos de estos tratamientos para quizá obtener unos resultados que ayuden a la comunidad científica a decantarse por alguna de estas opciones [159].

7.6. Líneas futuras de investigación y repercusión clínica de los resultados obtenidos.

Aunque podemos considerar que los resultados obtenidos en nuestro estudio son prometedores para ambos materiales, es cierto que abren un nuevo futuro para próximas investigaciones de igual o similar índole. Algunas propuestas para perspectivas futuras tanto de estudios *in vitro* como *in vivo* se recogen a continuación:

- Nuestro estudio aporta información acerca de las superficies de ambos materiales. Se ha podido comprobar que uno de los parámetros que afecta al comportamiento celular es la rigidez del substrato, por lo que el análisis del mismo y su comparación sobre los diferentes materiales de estudio y el control, podría ayudar a identificar la rigidez ideal sobre la cual el crecimiento fibroblástico se desarrolla de la manera más natural. Podrían compararse estas superficies de materiales sintéticos a la del cemento y esmalte del diente natural, ya que es sobre estas zonas donde los fibroblastos estimulan la secreción de fibras para crear los tejidos que rodean al diente. No se debe olvidar, sin embargo, las diferencias existentes entre fibroblastos del ligamento periodontal, y aquellos fibroblastos gingivales, los cuales son los hallados en los tejidos peri-implantarios.

- Plantear el uso de microscopía de fuerza atómica (AFM) para obtener resultados aún más fidedignos de la topografía de los materiales. Utilizando este instrumento podrían estudiarse mejor posibles restos en las superficies de los materiales a un nivel micro y nanotopográfico.
- Analizar si existen componentes específicos que se activen ante la adhesión celular dependientes de cada tipo de material. Este conocimiento sería de gran valor para poder comparar unos materiales con otros.
- Ya ha sido demostrado que un mal sellado a nivel de los pilares transepiteliales implantarios puede dar lugar a un desplazamiento apical del epitelio de unión, lo que se traduce en una vía directa para la colonización bacteriana en el propio implante y los tejidos que lo rodean. Se ha demostrado asociación entre esto y fenómenos que son hoy día el quebradero de cabeza de muchos clínicos como la pérdida ósea marginal, la peri-implantitis o incluso el fracaso del implante. Siendo conscientes de esta asociación, podría estudiarse la relación de los materiales con la pérdida ósea marginal que en ocasiones se genera alrededor de la zona más coronal de los implantes dentales.
- En futuros estudios podría evaluarse la producción de un modelo organotípico en el que se comprobara la relación tanto de fibroblastos como de queratinocitos en contacto con la superficie del material. Aunque es sabido que son los fibroblastos los que entran en íntimo contacto con la superficie de los pilares transepiteliales, es cierto que los queratinocitos también juegan un papel crucial en el mantenimiento de estos tejidos blandos y la protección del implante. Este tipo de estudio podría aportar una la visión *in vitro* más cercana a la situación que se genera *in vivo*.
- Por último, a pesar de que los estudios *in vitro* como el nuestro son capaces de aportar una gran cantidad de información al clínico, en ocasiones resulta complicado extrapolar todos los resultados obtenidos para que sean aplicados sobre pacientes. Es por eso que continuar esta misma línea de estudios en un formato *in vivo* donde se puedan realizar biopsias de los tejidos y su posterior análisis histomorfométrico, podría aportar mucha información.

CONCLUSIONES



8. CONCLUSIONES

Una vez finalizado el presente estudio, y, teniendo siempre presentes las limitaciones del mismo, podemos concluir lo siguiente:

- Conclusión n°1: Se han obtenido Valores superiores de rugosidad media en el Vita CAD Temp en relación a los del IPS e.max CAD al ser analizada su perfilometría con ayuda del Microscopio Electrónico de Barrido.
Conclusión referida al objetivo específico “a”.
- Conclusión n°2: Ambos materiales presentan una composición distinta en el análisis EDS, dado que tienen una naturaleza diferente, hallándose también una morfología de superficie distinta; siendo en e caso del disilicato de litio más irregular que en el PMMA, donde pudieron observarse surcos circulares concéntricos.
Conclusión referida al objetivo específico “b”.
- Conclusión n°3: Se encontró una humectabilidad estadísticamente superior en el disilicato de litio en relación al PMMA. Por tanto, podemos decir que el disilicato de litio es un material más hidrofílico.
Conclusión referida al objetivo específico “c”.
- Conclusión n°4: Los valores citomorfométricos no presentaron diferencias estadísticamente significativas en todos los parámetros analizados a excepción del eje mayor del citoesqueleto (mayor en el PMMA) y la redondez celular (superior en el PMMA).
Conclusión referida al objetivo específico “d”.
- Conclusión n°5: Nuestros datos arrojan diferencias estadísticamente significativas en los niveles de citotoxicidad de ambos materiales a las 24 y 48 horas, siendo estas diferencias no significativas a las 72 horas. Se halló una mayor tasa de viabilidad en el disilicato de litio.
Conclusión referida al objetivo específico “e”.
- Conclusión n°6: Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la producción de colágeno tipo I a las 72 horas. Se halló una mayor tasa de viabilidad en el disilicato de litio.
Conclusión referida al objetivo específico “f”.

CONCLUSIONES

- Conclusión n°7: Tras evaluar los resultados anteriormente especificados, podemos concluir que la hipótesis nula de nuestro estudio debe ser rechazada, ya que se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas a nivel de crecimiento y secreción de colágeno tipo I por parte de los HGFs, así como niveles distintos de citotoxicidad de los materiales al contacto con los fibroblastos.
Conclusión referida al objetivo general

BIBLIOGRAFÍA



9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abduo J, Lyons K, Bennamoun M. Trends in computer-aided manufacturing in prosthodontics: a review of the available streams. *Int J Dent.* 2014;2014:783948. doi: 10.1155/2014/783948. Epub 2014 Apr 8. PMID: 24817888; PMCID: PMC4000974.
2. Ruse ND, Sadoun MJ. Resin-composite blocks for dental CAD/CAM applications. *J Dent Res.* 2014 Dec;93(12):1232-4. doi: 10.1177/0022034514553976. Epub 2014 Oct 24. PMID: 25344335; PMCID: PMC4462808.
3. Petre AE. Chapter 39 – CAD-CAM Processing for All Ceramic Dental Restorations. Editor: Antoniac IV. *Handbook of Bioceramics and Biocomposites.* 1st ed. Romania: Springer; 2016. 1201-1216.
4. Sadid-Zadeh R, Li R, Miller LM, Simon M. Effect of Fabrication Technique on the Marginal Discrepancy and Resistance of Lithium Disilicate Crowns: An In Vitro Study. *J Prosthodont.* 2019 Dec;28(9):1005-1010. doi: 10.1111/jopr.13014. Epub 2019 Jan 22. PMID: 30628147; PMCID: PMC6616014.
5. Miyazaki T, Hotta Y, Kuni 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. doi: 10.4012/dmj.28.44. PMID: 19280967.
6. Duret F. *Le rayon laser en dentisterie et prothèse [Tesis doctoral].* Lyon: Université Claude Bernard; 1973. Recuperado a partir de: <http://www.francoisduret.com/wpcontent/uploads/2021/11/document-8.pdf>
7. Miyazaki T, Hotta Y. CAD/CAM systems available for the fabrication of crown and bridge restorations. *Aust Dent J.* 2011 Jun;56 Suppl 1:97-106. doi: 10.1111/j.1834-7819.2010.01300.x. PMID: 21564120.
8. Mormann WH, Brandestini M, Lutz F, Barbakow F. Chair side computer-aided direct ceramic inlays. *Quintessence Int* 1989; 20: 329-339.
9. 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.
10. Alghazzawi TF. Advancements in CAD/CAM technology: Options for practical implementation. *J Prosthodont Res.* 2016 Apr;60(2):72-84. doi: 10.1016/j.jpor.2016.01.003. Epub 2016 Feb 28. PMID: 26935333.
11. Yang J, Li H. Accuracy of CAD-CAM milling versus conventional lost-wax casting for single metal copings: A systematic review and meta-

- analysis. *J Prosthet Dent.* 2022 Jul 1:S0022-3913(22)00344-4. doi: 10.1016/j.prosdent.2022.05.018. Epub ahead of print. PMID: 35788274.
12. Pellitteri F, Albertini P, Vogrig A, Spedicato GA, Siciliani G, Lombardo L. Comparative analysis of intraoral scanners accuracy using 3D software: an in vivo study. *Prog Orthod.* 2022 Jul 4;23(1):21. doi: 10.1186/s40510-022-00416-5. PMID: 35781850.
 13. Martínez-Rus F, Pradíes Ramiro G, Suárez-García MJ, Rivera-Gómez B. Cerámicas dentales: clasificación y criterios de selección. *ROE* 2007;12(4):253-263.
 14. Huang J. Chapter 1 – Ceramic biomaterials for tissue engineering. Editor: Boccaccini AR, Gough JE. *Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers.* 2nd ed. United States: Elsevier Ltd; 2014. 3-34.
 15. 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. doi: 10.11607/ijp.4244. PMID: 25965634.
 16. Goodacre CJ, Bernal G, Rungcharassaeng K, Kan JYK (2003) Clinical complications in fixed prosthodontics. *J Prosthet Dent* 90(1):31–41
 17. Jones C. French Crossings: III. The Smile of the Tiger. *Trans R Hist Soc.* 2012;22:3-35. doi:10.1017/S0080440112000047
 18. Alp G, Murat S, Yilmaz B. Comparison of Flexural Strength of Different CAD/CAM PMMA-Based Polymers. *J Prosthodont.* 2019 Feb;28(2):e491-e495. doi: 10.1111/jopr.12755. Epub 2018 Jan 28. PMID: 29377319.
 19. Pituru SM, Greabu M, Totan A, Imre M, Pantea M, Spinu T, Tancu AMC, Popoviciu NO, Stanescu II, Ionescu E. A Review on the Biocompatibility of PMMA-Based Dental Materials for Interim Prosthetic Restorations with a Glimpse into their Modern Manufacturing Techniques. *Materials (Basel).* 2020 Jun 28;13(13):2894. doi: 10.3390/ma13132894. PMID: 32605174; PMCID: PMC7372356.
 20. Akin H, Tugut F, Polat ZA. In vitro comparison of the cytotoxicity and water sorption of two different denture base systems. *J Prosthodont.* 2015 Feb;24(2):152-5. doi: 10.1111/jopr.12162. Epub 2014 Jun 11. PMID: 24920440.
 21. Skorulska A, Piszko P, Rybak Z, Szymonowicz M, Dobrzyński M. Review on Polymer, Ceramic and Composite Materials for CAD/CAM Indirect Restorations in Dentistry-Application, Mechanical Characteristics and Comparison. *Materials (Basel).* 2021 Mar 24;14(7):1592. doi: 10.3390/ma14071592. PMID: 33805176; PMCID: PMC8037100.
 22. Argyrou R, Thompson GA, Cho SH, Berzins DW. Edge chipping resistance and flexural strength of polymer infiltrated ceramic network and resin nanoceramic restorative materials. *J Prosthet Dent.* 2016

- Sep;116(3):397-403. doi: 10.1016/j.prosdent.2016.02.014. Epub 2016 May 5. PMID: 27157600.
23. Lambert H, Durand JC, Jacquot B, Fages M. Dental biomaterials for chairside CAD/CAM: State of the art. *J Adv Prosthodont*. 2017 Dec;9(6):486-495. doi: 10.4047/jap.2017.9.6.486. Epub 2017 Dec 14. PMID: 29279770; PMCID: PMC5741454.
 24. Horvath SD. Key Parameters of Hybrid Materials for CAD/CAM-Based Restorative Dentistry. *Compend Contin Educ Dent*. 2016 Oct;37(9):638-643. PMID: 27700130.
 25. Li RW, Chow TW, Matinlinna JP. Ceramic dental biomaterials and CAD/CAM technology: state of the art. *J Prosthodont Res*. 2014 Oct;58(4):208-16. doi: 10.1016/j.jprior.2014.07.003. Epub 2014 Sep 22. PMID: 25172234.
 26. Alwan al-Maqtari AA. Development of new synthesised multilayered bioceramics for dental crown restorations [Tesis doctoral]. Kuala Lumpur: University of Malaya; 2017. Recuperado a partir de: <https://www.semanticscholar.org/paper/Development-of-new-synthesised-multilayered-for-%2F-Abdullah-al-Maqtari/cacc64d94965494efb85f3cb7e683a757be24338>
 27. Herráez-Galindo C, Rizo-Gorrita M, Maza-Solano S, Serrera-Figallo MA, Torres-Lagares D. A Review on CAD/CAM Yttria-Stabilized Tetragonal Zirconia Polycrystal (Y-TZP) and Polymethyl Methacrylate (PMMA) and Their Biological Behavior. *Polymers (Basel)*. 2022 Feb 24;14(5):906. doi: 10.3390/polym14050906. PMID: 35267729; PMCID: PMC8912793.
 28. Abdullah AO, Pollington S, Liu Y. Comparison between direct chairside and digitally fabricated temporary crowns. *Dent Mater J*. 2018 Nov 30;37(6):957-963. doi: 10.4012/dmj.2017-315. Epub 2018 Aug 23. PMID: 30135337.
 29. Raszewski Z. Acrylic resins in the CAD/CAM technology: A systematic literature review. *Dent Med Probl*. 2020 Oct-Dec;57(4):449-454. doi: 10.17219/dmp/124697. PMID: 33444491.
 30. Vita CAD Temp® VITA Scientific documentation; Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemania, 2012.
 31. Dudea D, Alb C, Culic B, Alb F. Chapter 35 – Performance of Dental Composites in Restorative Dentistry. Editor: Antoniac IV. *Handbook of Bioceramics and Biocomposites*. 1st ed. Romania: Springer; 2016. 1075-1114.
 32. 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 Sep 24;6(9):1742-1755. doi: 10.3889/oamjms.2018.378. PMID: 30338002; PMCID: PMC6182519.

33. Herráez-Galindo C, Rizo-Gorrita M, Luna-Oliva I, Serrera-Figallo MÁ, Castillo-Oyagüe R, Torres-Lagares D. In vitro Comparative Study of Fibroblastic Behaviour on Polymethacrylate (PMMA) and Lithium Disilicate Polymer Surfaces. *Polymers (Basel)*. 2019 Apr 25;11(4):744. doi: 10.3390/polym11040744. PMID: 31027245; PMCID: PMC6523339.
34. Pieger S, Salman A, Bidra AS. Clinical outcomes of lithium disilicate single crowns and partial fixed dental prostheses: a systematic review. *J Prosthet Dent*. 2014 Jul;112(1):22-30. doi: 10.1016/j.prosdent.2014.01.005. Epub 2014 Mar 24. PMID: 24674802.
35. Albashaireh ZS, Ghazal M, Kern M. Two-body wear of different ceramic materials opposed to zirconia ceramic. *J Prosthet Dent*. 2010 Aug;104(2):105-13. doi: 10.1016/S0022-3913(10)60102-3. PMID: 20654767.
36. Jurado CA, El-Gendy T, Hyer J, Tsujimoto A. Color stability of fully- and pre-crystallized chair-side CAD-CAM lithium disilicate restorations after required and additional sintering processes. *J Adv Prosthodont*. 2022 Feb;14(1):56-62. doi: 10.4047/jap.2022.14.1.56. Epub 2022 Feb 25. PMID: 35284052; PMCID: PMC8891683.
37. 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. doi: 10.1590/1678-7757-2016-0233. PMID: 28678947; PMCID: PMC5482251.
38. Lawson NC, Bansal R, Burgess JO. Wear, strength, modulus and hardness of CAD/CAM restorative materials. *Dent Mater*. 2016 Nov;32(11):e275-e283. doi: 10.1016/j.dental.2016.08.222. Epub 2016 Sep 14. PMID: 27639808.
39. Zarone F, Ferrari M, Mangano FG, Leone R, Sorrentino R. "Digitally Oriented Materials": Focus on Lithium Disilicate Ceramics. *Int J Dent*. 2016;2016:9840594. doi: 10.1155/2016/9840594. Epub 2016 Aug 18. PMID: 27635140; PMCID: PMC5007340.
40. 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. doi: 10.1016/j.jmbbm.2018.02.032. Epub 2018 Mar 3. PMID: 29655121.
41. *IPS e.max® CAD Scientific Documentation*; Ivoclar Vivadent AG; Liechtenstein, France, 2017.
42. Zafar MS. Prosthodontic Applications of Polymethyl Methacrylate (PMMA): An Update. *Polymers (Basel)*. 2020 Oct 8;12(10):2299. doi: 10.3390/polym12102299. PMID: 33049984; PMCID: PMC7599472.
43. Albertini, R.J. The lower alkyl methacrylates: Genotoxic profile of non-carcinogenic compounds. *Regul. Toxicol. Pharmacol*. 2017, 84, 77–93. [CrossRef] [PubMed]

44. Osman, R.; Clark, W.J.; Mazurek, A.P.; Weinstein, H. Theoretical studies of molecular mechanisms of DNA damage induced by hydroxyl radicals. *Free Radic. Res. Commun.* 1989, 6, 131–132. [CrossRef] [PubMed]
45. Braun, K.N.; Mello, J.N.; Rached, R.; Del Bel Cury, A. Surface texture and some properties of acrylic resins submitted to chemical polishing. *J. Oral Rehabil.* 2003, 30, 91–98. [CrossRef]
46. Jorge, J.H.; Giampaolo, E.T.; Machado, A.L.; Vergani, C.E. Cytotoxicity of denture base acrylic resins: A literature review. *J. Prosthet. Dent.* 2003, 90, 190–193. [CrossRef]
47. Lung, C.; Darvell, B. Minimization of the inevitable residual monomer in denture base acrylic. *Dent. Mater.* 2005, 21, 1119–1128. [CrossRef] [PubMed]
48. Krifka, S.; Spagnuolo, G.; Schmalz, G.; Schweikl, H. A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. *Biomaterials* 2013, 34, 4555–4563. [CrossRef] [PubMed]
49. Jiao, Y.; Niu, L.N.; Ma, S.; Li, J.; Tay, F.R.; Chen, J.H. Quaternary ammonium-based biomedical materials: State-of-the-art, toxicological aspects and antimicrobial resistance. *Prog. Polym. Sci.* 2017, 71, 53–90. [CrossRef] [PubMed]
50. Schweikl, H.; Spagnuolo, G.; Schmalz, G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J. Dent. Res.* 2006, 85, 870–877. [CrossRef] [PubMed]
51. Kojima, N.; Yamada, M.; Paranjpe, A.; Tsukimura, N.; Kubo, K.; Jewett, A.; Ogawa, T. Restored viability and function of dental pulp cells on polymethylmethacrylate (PMMA)-based dental resin supplemented with N-acetyl cysteine (NAC). *Dent. Mater.* 2008, 24, 1686–1693. [CrossRef]
52. Öztürk F, Malkoc S, Ersöz M, Hakki SS, Bozkurt BS. Real-time cell analysis of the cytotoxicity of the components of orthodontic acrylic materials on gingival fibroblasts. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011 Nov;140(5):e243-9. doi: 10.1016/j.ajodo.2011.05.019. PMID: 22051502.
53. Ionescu RN, Totan AR, Imre MM, Țâncu AMC, Pantea M, Butucescu M, Farcașiu AT. Prosthetic Materials Used for Implant-Supported Restorations and Their Biochemical Oral Interactions: A Narrative Review. *Materials (Basel).* 2022 Jan 28;15(3):1016. doi: 10.3390/ma15031016. PMID: 35160962; PMCID: PMC8839238.
54. Gad MM, Fouda SM, Al-Harbi FA, Năpânkangas R, Raustia A. PMMA denture base material enhancement: a review of fiber, filler, and nanofiller addition. *Int J Nanomedicine.* 2017 May 17;12:3801-3812. doi: 10.2147/IJN.S130722. PMID: 28553115; PMCID: PMC5440038.
55. Pantea M, Totan AR, Imre M, Petre AE, Țâncu AMC, Tudos C, Farcașiu AT, Butucescu M, Spînu TC. Biochemical Interaction between Materials

- Used for Interim Prosthetic Restorations and Saliva. *Materials* (Basel). 2021 Dec 29;15(1):226. doi: 10.3390/ma15010226. PMID: 35009373; PMCID: PMC8746092.
56. Pagano S, Lombardo G, Caponi S, Costanzi E, Di Michele A, Bruscoli S, Xhimitiku I, Coniglio M, Valenti C, Mattarelli M, Rossi G, Cianetti S, Marinucci L. Bio-mechanical characterization of a CAD/CAM PMMA resin for digital removable prostheses. *Dent Mater*. 2021 Mar;37(3):e118-e130. doi: 10.1016/j.dental.2020.11.003. Epub 2020 Nov 27. PMID: 33257084.
 57. Atay A, Gürdal I, Bozok Çetintas V, Üşümez A, Cal E. Effects of New Generation All-Ceramic and Provisional Materials on Fibroblast Cells. *J Prosthodont*. 2019 Jan;28(1):e383-e394. doi: 10.1111/jopr.12915. Epub 2018 May 31. PMID: 29855127.
 58. Young HM, Smith CT, Morton D: Comparative in vitro evaluation of two provisional restorative materials. *J Prosthet Dent* 2001;85:129-132.
 59. Burns DR, Beck DA, Nelson SK: A review of selected dental literature on contemporary provisional fixed prosthodontic treatment: report of the Committee on Research in Fixed Prosthodontics of the Academy of Fixed Prosthodontics. *J Prosthet Dent* 2003;90:474-497.
 60. Díez-Quijano C, Azevedo L, Antonaya-Martín JL, Del Río-Highsmith J, Gómez-Polo M. Evaluation of the clinical behavior of 2 different materials for implant-supported interim fixed partial prostheses: A randomized clinical trial. *J Prosthet Dent*. 2020 Sep;124(3):351-356. doi: 10.1016/j.prosdent.2019.09.021. Epub 2019 Dec 4. PMID: 31810613.
 61. Williams D F. ‘ Definitions in biomaterials ’, Proceedings of a Consensus Conference on the European Society of Biomaterials , 1ST Ed. New York: Elsevier; 1987.
 62. Basu B, Balani K. Chapter 19 - Overview: Introduction to Biomaterials. Editor: Basu B. *Advanced Structural Ceramics*. 1st ed. United States: Wiley; 2011. 391-421.
 63. Detsch R, Will J, Hum J, Roether JA, Boccaccini AR. Chapter 6 – Biomaterials. Editor: Kasper C, Charwat V, Lavrentieva A. *Cell Culture Biomaterials*. 1st ed. Alemania: Springer; 2018. 91-105.
 64. Messer RL, Lockwood PE, Wataha JC, Lewis JB, Norris S, Bouillaguet S. In vitro cytotoxicity of traditional versus contemporary dental ceramics. *J Prosthet Dent*. 2003 Nov;90(5):452-8. doi: 10.1016/s0022-3913(03)00533-x. PMID: 14586309.
 65. Bapat RA, Parolia A, Chaubal T, Dharamadhikari S, Abdulla AM, Sakkir N, Arora S, Bapat P, Sindi AM, Kesharwani P. Recent update on potential cytotoxicity, biocompatibility and preventive measures of biomaterials used in dentistry. *Biomater Sci*. 2021 May 4;9(9):3244-3283. doi: 10.1039/d1bm00233c. PMID: 33949464.

66. Yuan Y, Lee TR. Contact angle and wetting properties. Bracco G, Holst B, editors. *Surface science techniques* 1st ed. Berlin/Heidelberg: Springer; 2013.p. 3–34. https://doi.org/10.1007/978-3-642-34243-1_1.
67. 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. doi: 10.1089/ten.2005.11.1. PMID: 15738657.
68. 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 Implants Res.* 2006 Oct;17 Suppl 2:55-67. doi: 10.1111/j.1600-0501.2006.01367.x. PMID: 16968382.
69. 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.
70. 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. doi: 10.1016/j.actbio.2014.03.032. Epub 2014 Apr 5. PMID: 24709541; PMCID: PMC4103435.
71. Detsch R, Boccaccini AR. The role of osteoclasts in bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015;9:1133–49. <https://doi.org/10.1002/term.1851>.
72. Yang Y, Wang K, Gu X, Leong KW. Biophysical Regulation of Cell Behavior-Cross Talk between Substrate Stiffness and Nanotopography. *Engineering (Beijing).* 2017 Feb;3(1):36-54. doi: 10.1016/J.ENG.2017.01.014. Epub 2017 Feb 21. PMID: 29071164; PMCID: PMC5653318.
73. Discher DE, Janmey P, Wang YL. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science.* 2005 Nov 18;310(5751):1139-43. doi: 10.1126/science.1116995. PMID: 16293750.
74. Dokukina IV, Gracheva ME. A model of fibroblast motility on substrates with different rigidities. *Biophys J.* 2010 Jun 16;98(12):2794-803. doi: 10.1016/j.bpj.2010.03.026. Erratum in: *Biophys J.* 2011 Feb 2;100(3):795. Erratum in: *Biophys J.* 2011 Feb 2;100(3):795. PMID: 20550891; PMCID: PMC2884250.
75. Kasemo B, Lausmaa J. Material-tissue interfaces: the role of surface properties and processes. *Environ Health Perspect.* 1994 Oct;102 Suppl 5(Suppl 5):41-5. doi: 10.1289/ehp.94102s541. PMID: 7882954; PMCID: PMC1567278.
76. Kasemo B, Gold J. Implant surfaces and interface processes. *Adv Dent Res.* 1999 Jun;13:8-20. doi: 10.1177/08959374990130011901. PMID: 11276751.

77. Kim JJ, Lee JH, Kim JC, Lee JB, Yeo IL. Biological Responses to the Transitional Area of Dental Implants: Material- and Structure-Dependent Responses of Peri-Implant Tissue to Abutments. *Materials* (Basel). 2019 Dec 22;13(1):72. doi: 10.3390/ma13010072. PMID: 31877848; PMCID: PMC6981768.
78. Boric M, Lecloux G, Bosshardt D, Barrantes A, Haugen HJ, Lambert F, Bacevic M. Peri-implant soft tissue integration in humans - influence of materials: A study protocol for a randomised controlled trial and a pilot study results. *Contemp Clin Trials Commun*. 2020 Aug 15;19:100643. doi: 10.1016/j.conctc.2020.100643. PMID: 33083628; PMCID: PMC7554019.
79. Sculean A, Gruber R, Bosshardt DD. Soft tissue wound healing around teeth and dental implants. *J Clin Periodontol*. 2014 Apr;41 Suppl 15:S6-22. doi: 10.1111/jcpe.12206. PMID: 24641001.
80. Geurs NC, Vassilopoulos PJ, Reddy MS. Soft tissue considerations in implant site development. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2010 Aug;22(3):387-405, vi-vii. doi: 10.1016/j.coms.2010.04.001. PMID: 20713270.
81. Deng Z, Liang J, Fang N, Li X. Integration of collagen fibers in connective tissue with dental implant in the transmucosal region. *Int J Biol Macromol*. 2022 May 31;208:833-843. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.03.195. Epub 2022 Mar 31. PMID: 35367473.
82. Ivanovski S, Lee R. Comparison of peri-implant and periodontal marginal soft tissues in health and disease. *Periodontol 2000*. 2018 Feb;76(1):116-130. doi: 10.1111/prd.12150. Epub 2017 Nov 30. PMID: 29193334.
83. Lang NP, Lindhe N. *Periodontología clínica e implantología odontológica*. Tomo 1. 6ª edición. Madrid, España: Editorial médica panamericana. 2017.
84. 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. doi: 10.1016/j.jprior.2015.07.001. Epub 2015 Dec 23. PMID: 26725967.
85. Goktas S, Dmytryk JJ, McFetridge PS. Biomechanical behavior of oral soft tissues. *J Periodontol*. 2011 Aug;82(8):1178-86. doi: 10.1902/jop.2011.100573. Epub 2011 Feb 10. PMID: 21309720.
86. Serichetapongse P, Madarasmi R, Vacharaksa A. Host Responses in Peri-implant Tissue in Comparison to Periodontal Tissue: A Retrospective Study. *Oral Health Prev Dent*. 2022 Jan 20;20(1):41-50. doi: 10.3290/j.ohpd.b2585655. PMID: 35049254.
87. Pabst, A.M.; Walter, C.; Bell, A.; Weyhrauch, M.; Schmidtmann, 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]
88. Abrahamsson I, Berglundh T, Lindhe J. The mucosal barrier following abutment dis/reconnection. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol.* 1997 Aug;24(8):568-72. doi: 10.1111/j.1600-051x.1997.tb00230.x. PMID: 9266344.
 89. Hupp JR, Ellis E III, Tucker MR. *Cirugía oral y maxilofacial contemporánea*. 6a ed. España: Elsevier; 2014.
 90. Gasik M. Understanding biomaterial-tissue interface quality: combined in vitro evaluation. *Sci Technol Adv Mater.* 2017 Jul 31;18(1):550-562. doi: 10.1080/14686996.2017.1348872. PMID: 28970865; PMCID: PMC5613488.
 91. Närhi H. Characterization of soft tissue adhesion on the surface of dental biomaterials [M.Sc. Thesis]. Finland: Aalto University; 2016. p. 97.
 92. Pabst, A.M.;Walter, C.; Grassmann, L.;Weyhrauch,M.; Brüllmann, D.D.; Ziebart, T.; Scheller, H.; Lehmann, K.M. Influence of CAD/CAMall-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. [CrossRef] [PubMed]
 93. Smith PC, Martínez C, Martínez J, McCulloch CA. Role of Fibroblast Populations in Periodontal Wound Healing and Tissue Remodeling. *Front Physiol.* 2019 Apr 24;10:270. doi: 10.3389/fphys.2019.00270. PMID: 31068825; PMCID: PMC6491628.
 94. McCulloch CA, Bordin S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J Periodontal Res.* 1991 May;26(3 Pt 1):144-54. doi: 10.1111/j.1600-0765.1991.tb01638.x. PMID: 1830616.
 95. 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. doi: 10.2174/1574888X12666170929124621. PMID: 28969579.
 96. 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 Jan;67(1):66-70. doi: 10.1177/00220345880670011301. PMID: 11039048.
 97. Archana, D. A., Srikanth, D. V., Sasireka, D. , Kurien, D. B. , & Ebenezer, D. (2014). Fibroblast Heterogeneity in Periodontium – a Review. *International Journal of Dental Sciences and Research*, 2(3), 50-54.
 98. Häkkinen L, Larjava H, Fournier BP. Distinct phenotype and therapeutic potential of gingival fibroblasts. *Cytotherapy.* 2014 Sep;16(9):1171-86. doi: 10.1016/j.jcyt.2014.04.004. Epub 2014 Jun 13. PMID: 24934304.

99. Chiego DJ. Principios de Histología y embriología bucal con orientación clínica. 4a ed. Barcelona, España: Elsevier; 2014.
100. 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. doi: 10.1111/j.1600-051x.1998.tb02513.x. PMID: 9763327.
101. Owens DK, Wendt RC. Estimation of the surface free energy of polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* 1969; 13(8).
102. Thevenot P, Hu W, Tang L. Surface chemistry influences implant biocompatibility. *Curr Top Med Chem.* 2008;8(4):270-80. doi: 10.2174/156802608783790901. PMID: 18393890; PMCID: PMC3230929.
103. Jansen JA, den Braber ET, Walboomers XF, de Ruijter JE. Soft tissue and epithelial models. *Adv Dent Res.* 1999 Jun;13:57-66. doi: 10.1177/08959374990130011601. PMID: 11276748.
104. 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. doi: 10.5507/bp.2011.021. PMID: 21804619.
105. 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. doi: 10.1002/jbm.a.35254. Epub 2014 Jun 16. PMID: 24910444; PMCID: PMC4258536.
106. Salmerón-Sánchez M, Altankov G. Cell-Protein-Material interaction in tissue engineering. In: *Tech.* 2010; p. 77-102.
107. 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. doi: 10.1016/j.actbio.2018.07.016. Epub 2018 Jul 10. PMID: 30006313.
108. 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 Nov-Dec;26(6):1247-55. PMID: 22167430.
109. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. *Biomaterials Science — An Introduction to Materials in Medicine*, 2nd ed. New York: Academic Press, 2004.
110. 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 Dec;17(6):1237-49.

111. 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]
112. Goreish HH, Lewis AL, Rose S, Lloyd AW. The effect of phosphorylcholine-coated materials on the inflammatory response and fibrous capsule formation: in vitro and in vivo observations. *J Biomed Mater Res A.* 2004;68:1–9.
113. Quere D. Wetting and roughness. *Ann Rev Mater Res* 2008;38:71–99.
114. International Standards Organization (ISO). 25178:2012. Geometric Product Specifications (GPS) – Surface texture: areal. International Standards Organization, Geneva; Switzerland; 2012.
115. SENSO FAR S NEOX [MICROSCOPIO ÓPTICO CONFOCAL-INTERFEROMÉTRICO]. Imagen obtenida de la web del Centro de Investigación, tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla: <https://citius.us.es/web/servicio.php?s=mic#equipo>
116. Montuenga-Badía L, Esteban-Ruiz FJ, Calvo-González A. Técnicas en histología y biología celular. 1ª Ed. Barcelona, España: Elsevier Masson; 2009.
117. Microscopio teneo. Imagen obtenida de la web del Centro de Investigación, tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla: <https://citius.us.es/web/servicio.php?s=mic#equipo>
118. Wettability. [Internet] Biolins Scientific [citado el 10 de marzo de 2020] Disponible en: <https://blog.biolinscientific.com/what-is-wettability>
119. 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.
120. 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. doi: 10.1016/j.dental.2017.09.007. Epub 2017 Oct 10. PMID: 29029850.
121. Dataphysics. Sessile drop method — Optical determination of the contact angle. [Internet] [citado el 10 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://www.dataphysics-instruments.com/knowledge/understanding-interfaces/sessile-drop-method/>
122. Gil-Loyzaga PE. Cultivo de células animales y humanas. Aplicaciones en Medicina Regenerativa. 1ª Ed. Madrid, España: Vision Libros Madrid; 2011.
123. Picot J. *Human Cell Culture Protocols*. 2nd ed. New Jersey: Humana Press Inc; 2005.
124. Tarnowski B, Francis G, Nicholso S, Nicholso H. DAPI as a Useful Stain for Nuclear Quantitation. *Biotech Histochem.* 1991;66(6):297-302.

125. Adtani P, Narasimhan M, Ranganathan K, Punnoose A, Prasad P, Natarajan PM. Characterization of oral fibroblasts: An in vitro model for oral fibrosis. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2019 May-Aug;23(2):198-202. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_28_19. PubMed PMID: 31516223; PubMed Central PMCID: PMC6714264.
126. Ferreira T, Rasband W. ImageJ User Guide. ImageJ/Fiji 1.46. IJ 1.46r. site: <http://imagej.nih.gov/ij/notes.html>. 2012.
127. Sánchez 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.
128. den Braber ET, de Ruijter JE, Ginsel LA, von Recum AF, Jansen JA. Quantitative analysis of fibroblast morphology on microgrooved surfaces with various groove and ridge dimensions. *Biomaterials.* 1996 Nov;17(21):2037-44. doi: 10.1016/0142-9612(96)00032-4. PMID: 8902235.
129. International Standards Organization (ISO). 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices. - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity International Standards Organization, Geneva; Switzerland; 2012.
130. Sjögren G, Sletten G, Dahl JE. Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by millipore filter, agar overlay, and MT^T tests. *J Prosthet Dent.* 2000 Aug;84(2):229-36. doi: 10.1067/mpr.2000.107227. PMID: 10946345.
131. 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. doi: 10.1088/1748-6041/4/2/025005. Epub 2009 Feb 11. PMID: 19208938.
132. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 1988 Sep 1;48(17):4827-33. PMID: 3409223.
133. 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. doi: 10.1016/j.dental.2007.06.013. Epub 2007 Aug 6. PMID: 17675143.
134. 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. [CrossRef]
135. Espectrofotometría [Internet] Diccionario de Español de la Real Academia de Ingeniería. [citado el 2 de marzo de 2020] Disponible en: <http://diccionario.raing.es/es/lema/espectrofotometr%C3%ADa-1>

136. Lector de microplaca [Internet] BMG LABTECH. [citado el 2 de marzo de 2020] Disponible en: <https://www.bmglabtech.com/microplate-reader/>
137. Absorbancia [Internet] BMG LABTECH. [citado el 2 de marzo de 2020] Disponible en: <https://www.bmglabtech.com/absorbance/>
138. Densidad óptica. [Internet] Diccionario de Español de la Real Academia de Ingeniería. [citado el 2 de marzo de 2020] Disponible en: <http://diccionario.raing.es/es/lema/densidad-%C3%B3ptica>
139. ELISA tests. World Health Organization [citado el 8 de marzo de 2020] Disponible en: https://www.who.int/diagnostics_laboratory/faq/elisa/en/
140. Ochoa-Azze CRF. Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos. 1ª Ed. Finlay Editions. La Habana 2012. Págs. 6-8.
141. Crowther JR. The ELISA Guidebook. Ed. Humana Press. 2nd Ed 2009. Vienna, Austria. Chapter 5. Pages 111-147
142. Hosseini S, Vázquez-Villegas P, Rito-Palomares M, Martínez-Chapa SO. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) From A to Z. Springer Ed. 2018 Singapore. Pages 45-47.
143. Hnasko R. ELISA Methods and Protocols. Humana Press. 2015. Albany, USA. Chapter 7 pages 69-78.
144. Kohl TO, Ascoli CA. Immunometric Double-Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Cold Spring Harb Protoc. 2017 Jun 1;2017(6):pdb.prot093724. doi: 10.1101/pdb.prot093724. PubMed PMID: 28572188.
145. Requena-Guerrero F. Estadística descriptiva. Introducción a la Estadística: Aplicación a la Odontología. 1a ed. Granada: Proyecto Sur de Ediciones, S.L.;2008. 29-30.
146. Pallant, J. SPSS Survival Manual, 3rd ed.; McGraw Hill Open University Press: New York, NY, USA, 2007;pp. 224–240.
147. Cohen, J. Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences, 2nd ed.; Erlbaum: Hillsdale, NJ, USA, 1988.
148. Wayne W. Daniel. Capítulo 13 – Estadística no paramétrica y de libre distribución. Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. 4a ed. México: Limusa Wiley; 2011. 658-736.
149. Wayne W. Daniel. Capítulo 8 – Análisis de la varianza: base para el análisis de las ciencias de la salud. 4a ed. México: Limusa Wiley; 2011. 295-399.
150. Salido, M.; Vilches, J.I.; Gutiérrez, J.L.; Vilches, J. Actin cytoskeletal organization in human osteoblasts grown on different dental titanium implant surfaces. *Histol. Histopathol.* 2007, 22, 1355–1364.
151. Kusakawa Y, Yoshida E, Hayakawa T. Protein Adsorption to Titanium and Zirconia Using a Quartz Crystal Microbalance Method. *Biomed Res*

- Int. 2017;2017:1521593. doi: 10.1155/2017/1521593. Epub 2017 Jan 29. PMID: 28246591; PMCID: PMC5303609.
152. Jung S, Moser MM, Kleinheinz J, Happe A. Biocompatibility of Lithium Disilicate and Zirconium Oxide Ceramics with Different Surface Topographies for Dental Implant Abutments. *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 19;22(14):7700. doi: 10.3390/ijms22147700. PMID: 34299319; PMCID: PMC8306444.
153. Maminskas J, Pilipavicius J, Stasiunas E, Baranovas G, Alksne M, Daugela P, Juodzbaly G. Novel Yttria-Stabilized Zirconium Oxide and Lithium Disilicate Coatings on Titanium Alloy Substrate for Implant Abutments and Biomedical Application. *Materials (Basel)*. 2020 Apr 30;13(9):2070. doi: 10.3390/ma13092070. PMID: 32365921; PMCID: PMC7254192.
154. Huettig F, Prutscher A, Goldammer C, Kreutzer CA, Weber H. First clinical experiences with CAD/CAM-fabricated PMMA-based fixed dental prostheses as long-term temporaries. *Clin Oral Investig*. 2016 Jan;20(1):161-8. doi: 10.1007/s00784-015-1475-7. Epub 2015 Apr 22. PMID: 25898895.
155. Abdel Raheem IM, Hammad IA, Abel Kader SH, Fahmy RA. Fabrication of a CAD-CAM custom healing abutment guided by a conventional dental radiograph for delayed loaded dental implants: A dental technique. *J Prosthet Dent*. 2022 Jan;127(1):49-54. doi: 10.1016/j.prosdent.2020.09.022. Epub 2020 Nov 13. PMID: 33198988.
156. 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 Sep;32(9):1152-64. doi: 10.1016/j.dental.2016.06.020. Epub 2016 Jul 8. PMID: 27402299.
157. Park JB, Yang SM, Ko Y. Evaluation of the Surface Characteristics of Various Implant Abutment Materials Using Confocal Microscopy and White Light Interferometry. *Implant Dent*. 2015 Dec;24(6):650-6. doi: 10.1097/ID.0000000000000319. PMID: 26296188.
158. Guilherme NM, Chung KH, Flinn BD, Zheng C, Raigrodski AJ. Assessment of reliability of CAD-CAM tooth-colored implant custom abutments. *J Prosthet Dent*. 2016 Aug;116(2):206-13. doi: 10.1016/j.prosdent.2015.12.015. Epub 2016 Mar 3. PMID: 26948082.
159. 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.
160. Elsaka SE, Elnaghy AM. Mechanical properties of zirconia reinforced lithium silicate glass-ceramic. *Dent Mater*. 2016 Jul;32(7):908-14. doi: 10.1016/j.dental.2016.03.013. Epub 2016 Apr 14. PMID: 27087687.

161. Brunot-Gohin C, Duval JL, 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 Dec;46(6):362-371. doi: 10.5051/jpis.2016.46.6.362. Epub 2016 Dec 27. PMID: 28050314; PMCID: PMC5200862.
162. 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.* 2019 Jul;35(7):1053-1063. doi: 10.1016/j.dental.2019.04.010. Epub 2019 May 3. PMID: 31060818.
163. Rutkunas V, Borusevicius R, Liaudanskaite D, Jasinskyte U, Drukteinis S, Bukelskiene V, Mijiritsky E. The Effect of Different Cleaning Protocols of Polymer-Based Prosthetic Materials on the Behavior of Human Gingival Fibroblasts. *Int J Environ Res Public Health.* 2020 Oct 23;17(21):7753. doi: 10.3390/ijerph17217753. PMID: 33114133; PMCID: PMC7660342.
164. Rozeik AS, Chaar MS, Sindt S, Wille S, Selhuber-Unkel C, Kern M, El-Kholy S, Dörfer C, Fawzy El-Sayed KM. Cellular properties of human gingival fibroblasts on novel and conventional implant-abutment materials. *Dent Mater.* 2022 Mar;38(3):540-548. doi: 10.1016/j.dental.2021.12.139. Epub 2021 Dec 31. PMID: 34980491.
165. Mehl C, Kern M, Schütte AM, Kadem LF, Selhuber-Unkel C. Adhesion of living cells to abutment materials, dentin, and adhesive luting cement with different surface qualities. *Dent Mater.* 2016 Dec;32(12):1524-1535. doi: 10.1016/j.dental.2016.09.006. Epub 2016 Oct 4. PMID: 27717514.
166. Mumcu E and Erdinc G. "Implant Abutment Selection Criteria". *Acta Scientific Dental Sciences* 2.8 (2018): 31-38.
167. Sanz-Martín I, Sanz-Sánchez I, Carrillo de Albornoz A, Figuero E, Sanz M. Effects of modified abutment characteristics on peri-implant soft tissue health: A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2018 Jan;29(1):118-129. doi: 10.1111/cr.13097. Epub 2017 Oct 26. PMID: 29072346; PMCID: PMC6084371.
168. 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. doi: 10.1016/j.dental.2018.06.010. Epub 2018 Jun 23. PMID: 29945797.
169. Xu LC, Bauer JW, Siedlecki CA. Proteins, platelets, and blood coagulation at biomaterial interfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014 Dec 1;124:49-68. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.09.040. Epub 2014 Sep 28. PMID: 25448722; PMCID: PMC5001692.

170. Tagaya M, Ikoma ., Hanagata N, Tanaka J. Analytical Investigation of Protein Mediation Between Biomaterials and Cells. *Mater. Exp.* 2012; 2(1):1-22.
171. 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. doi: 10.1007/s00784-018-2365-6. Epub 2018 Feb 5. PMID: 29404810.
172. Rizo-Gorrita M, Herráez-Galindo C, Torres-Lagares D, Serrera-Figallo M^Á, Gutiérrez-Pérez JL. Biocompatibility of Polymer and Ceramic CAD/CAM Materials with Human Gingival Fibroblasts (HGFs). *Polymers (Basel)*. 2019 Sep 3;11(9):1446. doi: 10.3390/polym11091446. PMID: 31484458; PMCID: PMC6780389.
173. 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 opticalinterferometry and scanning electron microscopy. *Dent Mater.* 2017, 33, e317–e327. [CrossRef]
174. 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. doi: 10.1016/j.dental.2018.08.300. Epub 2018 Sep 13. PMID: 30220506.
175. Hahnel S, Wieser A, Lang R, Rosentritt M. Biofilm formation on the surface of modern implant abutment materials. *Clin Oral Implants Res.* 2015 Nov;26(11):1297-301. doi: 10.1111/clr.12454. Epub 2014 Jul 24. PMID: 25060652.
176. Giti R, Dabiri S, Motamedifar M, Derafshi R. Surface roughness, plaque accumulation, and cytotoxicity of provisional restorative materials fabricated by different methods. *PLoS One*. 2021 Apr 5;16(4):e0249551. doi: 10.1371/journal.pone.0249551. PMID: 33819292; PMCID: PMC8021148.
177. Watanabe H, Saito K, Kokubun K, Sasaki H, Yoshinari M. Change in surface properties of zirconia and initial attachment of osteoblastlike cells with hydrophilic treatment. *Dent Mater J.* 2012;31(5):806-14. doi: 10.4012/dmj.2012-069. PMID: 23037844.
178. Shim JS, Kim HC, Park SI, Yun HJ, Ryu JJ. Comparison of Various Implant Provisional Resin Materials for Cytotoxicity and Attachment to Human Gingival Fibroblasts. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2019 Mar/Apr;34(2):390-396. doi: 10.11607/jomi.6707. PMID: 30883618.
179. 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. doi: 10.2341/17-011-L. Epub 2018 Mar 13. PMID: 29533718.

180. Lawaf S, Azizi A, Farzad A, Adimi P. Effect of surface treatments of porcelain on adhesion of *Candida albicans*. *Gen Dent*. 2016 Jul-Aug;64(4):e1-4. PMID: 27367639.
181. Kusakawa Y, Yoshida E, Hayakawa T. Protein Adsorption to Titanium and Zirconia Using a Quartz Crystal Microbalance Method. *Biomed Res Int*. 2017;2017:1521593. doi: 10.1155/2017/1521593. Epub 2017 Jan 29. PMID: 28246591; PMCID: PMC5303609.
182. Spriano S, Sarath Chandra V, Cochis A, Uberti F, Rimondini L, Bertone E, Vitale A, Scolaro C, Ferrari M, Cirisano F, Gautier di Confienzo 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. doi: 10.1016/j.msec.2016.12.107. Epub 2016 Dec 24. PMID: 28254329.
183. González-Méndez S, Junquera-Gutiérrez LM, Peña-González I, García-Díaz V, Gallego López I, García Pérez E, Meana-Infiesta A. In vitro culture with collagen and human fibroblasts of a full-thickness oral mucosa equivalent. *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac* 2009;31,2: 98-106.
184. Erhan Çömlekoğlu M, Nizam N, Çömlekoğlu MD. Immediate definitive individualized abutments reduce peri-implant bone loss: a randomized controlled split-mouth study on 16 patients. *Clin Oral Investig*. 2018 Jan;22(1):475-486. doi: 10.1007/s00784-017-2136-9. Epub 2017 May 31. PMID: 28567530.
185. Bishti S, Strub JR, Att W. Effect of the implant-abutment interface on peri-implant tissues: a systematic review. *Acta Odontol Scand*. 2014 Jan;72(1):13-25. doi: 10.3109/00016357.2013.799712. Epub 2013 Jul 9. PMID: 23834528.
186. Peng TY, Shih YH, Hsia SM, Wang TH, Li PJ, Lin DJ, Sun KT, Chiu KC, Shieh TM. In Vitro Assessment of the Cell Metabolic Activity, Cytotoxicity, Cell Attachment, and Inflammatory Reaction of Human Oral Fibroblasts on Polyetheretherketone (PEEK) Implant-Abutment. *Polymers (Basel)*. 2021 Sep 3;13(17):2995. doi: 10.3390/polym13172995. PMID: 34503035; PMCID: PMC8433877.
187. 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, 12, 25–33.
188. Swanson JA, Lee M, Knapp PE. Cellular dimensions affecting the nucleocytoplasmic volume ratio. *J Cell Biol*. 1991 Nov;115(4):941-8. doi: 10.1083/jcb.115.4.941. PMID: 1955464; PMCID: PMC2289960.
189. Li Y, Lovett D, Zhang Q, Neelam S, Kuchibhotla RA, Zhu R, Gundersen GG, Lele TP, Dickinson RB. Moving Cell Boundaries Drive Nuclear Shaping during Cell Spreading. *Biophys J*. 2015 Aug 18;109(4):670-86. doi: 10.1016/j.bpj.2015.07.006. PMID: 26287620; PMCID: PMC4547341.

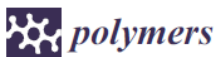
190. Siani A, Robert-Nicoud G, Cellesi F, Tirelli N. Quantitative descriptors for the effect of nature/mechanical properties of solid substrates on fibroblast morphology. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2012;10(3):265-72. doi: 10.5301/JABFM.2012.10355. PMID: 23242875.
191. Palaiologou AA, Yukna RA, Moses R, Lallier TE. Gingival, dermal, and periodontal ligament fibroblasts express different extracellular matrix receptors. *J Periodontol*. 2001 Jun; 72 (6): 798-807. doi: 10.1902/jop.2001.72.6.798. PMID: 11453243.
192. Peterbauer T, Yakunin S, Siegel J, Hering S, Fahrner M, Romanin C, Heitz J. Dynamics of spreading and alignment of cells cultured in vitro on a grooved polymer Surface. *J Nnomater* 2011;2011:1-10.
193. Solon J, Levental I, Sengupta K, Georges PC, Janmey PA. Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates. *Biophys J*. 2007 Dec 15;93(12):4453-61. doi: 10.1529/biophysj.106.101386. PMID: 18045965; PMCID: PMC2098710.
194. De Pedro-Montejo N. Caracterización de los mecanismos que median la muerte celular inducida por diferentes tipos de acetogeninas de *annonaceas* en líneas tumorales humanas [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 2010.
195. Atay A, Gürdal I, Bozok Çetintas V, Üşümez A, Cal E. Effects of New Generation All-Ceramic and Provisional Materials on Fibroblast Cells. *J Prosthodont*. 2019 Jan;28(1):e383-e394. doi: 10.1111/jopr.12915. Epub 2018 May 31. PMID: 29855127.
196. Van Landuyt KL, Nawrot T, Geebelen 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 meta-analytical approach. *Dent Mater*. 2011 Aug;27(8):723-47. doi: 10.1016/j.dental.2011.05.001. Epub 2011 Jun 12. Erratum in: *Dent Mater*. 2013 Aug;29(8):919. PMID: 21664675.
197. Elshahawy W, Shohieb F, Yehia H, Etman W, Watanabe I, Kramer P.v Cytotoxic effect of elements released clinically from gold and CAD-CAM fabricated ceramic crowns. *Tanta Dent J*. 2014;11(3):189-193.
198. 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. [PubMed]
199. Kwon SJ, Lawson NC, McLaren EE, Nejat AH, Burgess JO. Comparison of the mechanical properties of translucent zirconia and lithium disilicate. *J Prosthet Dent*. 2018 Jul;120(1):132-137. doi: 10.1016/j.prosdent.2017.08.004. Epub 2018 Jan 6. PMID: 29310875.

ANEXOS



ANEXO I

Artículo publicado en la revista científica internacional *Polymers* en abril de 2019 bajo el título “*In vitro Comparative Study of Fibroblastic Behaviour on Polymethacrylate (PMMA) and Lithium Disilicate Polymer Surfaces*”:



Article

In vitro Comparative Study of Fibroblastic Behaviour on Polymethacrylate (PMMA) and Lithium Disilicate Polymer Surfaces

Cristina Herráez-Galindo ¹, María Rizo-Gorriza ¹, Irene Luna-Oliva ¹,
María-Ángeles Serrera-Figallo ¹, Raquel Castillo-Oyagüe ² and Daniel Torres-Lagares ^{1,*} 

¹ Department of Oral Surgery, College of Dentistry, Seville University, 41009 Seville, Spain; crisnach.15@gmail.com (C.H.-G.); marrizgor@alum.us.es (M.R.-G.); irene_ire337@hotmail.com (I.L.-O.); maserrera@us.es (M.-Á.S.-F.)

² Department of Dental Protheses, College of Dentistry, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain; raquel.castillo@odon.ucm.es

* Correspondence: daniel@us.es

Received: 1 March 2019; Accepted: 23 April 2019; Published: 25 April 2019



Abstract: Polymethyl methacrylate (PMMA) and lithium disilicate are widely used materials in the dental field. PMMA is mainly used for the manufacture of removable prostheses; however, with the incorporation of CAD-CAM technology, new applications have been introduced for this material, including as a provisional implant attachment. Lithium disilicate is considered the gold standard for definitive attachment material. On the other hand, PMMA has begun to be used in clinics as a provisional attachment until the placement of a definitive one occurs. Although there are clinical studies regarding its use, there are few studies on cell reorganization around this type of material. This is why we carried out an *in vitro* comparative study using discs of both materials in which human gingival fibroblasts (HGFs) were cultured. After processing them, we analyzed various cellular parameters (cell count, cytoskeleton length, core size and coverage area). We analyzed the surface of the discs together with their composition. The results obtained were mostly not statistically significant, which shows that the qualities of PMMA make it a suitable material as an implant attachment.

Keywords: polymethyl methacrylate (PMMA); cytomorphometry; lithium silicate; gingival fibroblast; computer-aided design/computer-aided manufacturing (CAD/CAM); early cell proliferation

1. Introduction

Since the first treatment developed with the aid of a CAD/CAM system (Computer-Aided Design/Computer-Aided Manufacturing) was created in 1985, this technology has continued to evolve, giving way to the new era of digital dentistry. These changes have prompted the production of a new range of next-generation dental materials that can be milled using this system (e.g., PMMA and lithium disilicate) [1–12].

Ceramics have been used for a century in dentistry [2,13–15]. This group includes lithium disilicate ceramics ($\text{Li}_2\text{Si}_2\text{O}_5$) that were introduced in dentistry in 1998. In 2006, the IPS e.max CAD (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) was introduced to the market, on which our study was carried out [4,6,7,9,14,15]. The blocks of this material are supplied in a pre-crystallized blue state. This ceramic contains metasilicate and lithium disilicate cores in its interior, which has excellent mechanical properties (flexural strength of 130 ± 30 MPa). In this state, the block can be easily milled, and then the structure is crystallized in a ceramic oven at 850 °C under vacuum for 20–25 min. During this process, the metasilicates dissolve, leaving lithium disilicate crystals that will be glazed, thus producing the desired color change. The material can then achieve a strength of up to 360 MPa according to

the manufacturer [4,6,7,9,14,15]. This monolithic restoration material is not only suitable for the manufacture of implant crowns but also for the manufacture of inlays, onlays, crowns and veneers [4].

The other material we studied is polymethyl methacrylate (PMMA), widely used since the 1930s for the manufacture of removable prostheses, orthodontic appliances and splints. This is a synthetic polymer that provides strength, color stability and ease of repair, some of the essential qualities required for provisional material. Biomaterials such as PMMA may be used to maintain permanent or temporary contact with the body in order to maintain cells and tissues [16–18]. In 2005, PMMA-based polymer, Vita CAD-Temp material was introduced (VITA Zahnfabrik, Bad Säckingen, Germany), an improved polymer that uses PMMA in its composition and enables manufacture using a CAD/CAM system. In addition to its well-known specifications, it is also used as a material for long-term provisional implant crowns due to its high modulus of elasticity and flexural strength [16,19]. Its main disadvantages are shrinkage during curing, exothermic reaction during polymerization and release of monomers into the medium. All of these are diminished when produced by a CAD/CAM system with controlled polymerization under optimum pressure and temperature (the manufacturer even ensures free monomer absence). This system also reduces laboratory costs and speeds up the process [4,7,19].

When selecting an implant material, it is important to take its biocompatibility into account, as well as its cellular behavior around these surfaces. After the osseointegration period of the implants, transgingival abutments are inserted to reshape the gingival tissues. The healing of both the bone tissue and soft tissues surrounding the various surfaces of the implants is essential for clinical success [10,20–22]. These prostheses connect the internal environment of the soft tissue with the oral environment, which is required to create a hermetic structure where cell proliferation is generated that prevents the passage of bacteria to the peri-implant zone [8–10,22,23]. After implant placement and insertion of implant abutments, the marginal gingiva is often irritated and has to regenerate. First of all, the wound healing starts with the inflammatory phase, which is followed by a proliferative phase, during which fibroblasts migrate, accumulate into the wound and produce a collagen matrix. This phase ends with the keratinocytes migration. These two cell types create the barrier. The cells' adhesion depends on various components such as lipids, carbohydrates and bound proteins [6,24–29].

As far as we know, to date, no study has been published in which these two materials (Vita CAD-Temp and IPS e.max CAD) are analyzed related to the proliferation, morphology and spread of fibroblasts. That is why we focus on the comparison of these materials' surfaces, as well as the cellular response thereon.

Our null hypothesis is that both materials have the same behavior at the level of proliferation, cell morphology or spreading. Lithium disilicate ceramic is considered a gold standard for definitive restorations on implants and natural teeth. PMMA, on the other hand, is widely known as a long-term provisional material.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of Samples

We exposed the two materials under study, IPS e.max CAD (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) and Vita CAD-Temp (VITA Zahnfabrik, Bad Säckingen, Germany), in accordance with manufacturer reference data (Table 1).

Using blocks of both restoration materials (definitive (IPS e.max CAD) and long-term provisional components (Vita CAD-Temp)), discs were milled using the Straumann® CARES® M Series CAD/CAM system (Straumann Group, Basel, Switzerland; tolerance value $\pm 3 \mu\text{m}$). The laboratory used Software CARES® Visual (Straumann Group, Basel, Switzerland) to design the disc and the Program 3 in the milling process (26 °C during 9 h 40 min). This CAD/CAM system works at 250 W, 60,000 rpm, irrigated with water and cutting fluid and with a precision $< 10 \mu\text{m}$.

Table 1. Summary indicating the name of the material brands under study, type of material, composition, manufacturer and reference and batch numbers.

Material under Study	Material Type	Composition	Manufacturer	Ref./Batch
IPS e.max CAD	Vitreous ceramic	SiO ₂ , Li ₂ O, K ₂ O, MgO,	Ivoclar Vivadent,	HT A1/C 14 REF
	lithium disilicate	ZnO, Al ₂ O ₃ , P ₂ O ₅	Schaan, Liechtenstein	#626407 LOT V28352
Vita CAD-Temp monoColor	Polymethacrylate (PMMA)	C ₅ O ₂ H ₈ , SiO ₂ and pigments.	VITA Zahnfabrik, Bad Säckingen, Germany.	1M2T LOT 51750

We prepared the PMMA through milling, whereas the lithium disilicate must be sintered after milling, as previously mentioned. Discs comprised an 8-mm diameter and 2-mm height, and these values were obtained after milling (PMMA) and milling and sinterization (lithium disilicate).

Once the disks were readied, we prepared them through sterilization with short-wavelength (200–280 nm) UVC rays with exposure for 30 min on each side in a laminar flow hood. Next, they were placed onto a sterile petri dish prior to beginning the experiment.

2.2. Surface Analysis

2.2.1. Scanning Electron Microscopy

We carried out FESEM (Field Emission Scanning Electron Microscopy) using a FEI TENE0 scanning electron microscope (FESEM; Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA) at a magnification of 200 \times .

2.2.2. Profilometry

We used a Sensofar S NEOX interferometric confocal microscope (Sensofar Medical, Terrassa, Spain) to obtain the roughness using SensoMAP Premium 7.4 software (Sensofar Medical, Terrassa, Spain). Then we used epifluorescent lenses 20 \times magnification at a length of 4.50 mm and a green optical resolution of 0.32 μ m. Five random measurements were made from different locations for each material, with a pre-set dimension of 0.87 \times 0.66 mm² and a compensation of 250 μ m. These measurements are based on ISO 25178 with regards to the geometric specifications of the product. The quantitative roughness parameter used was the arithmetic mean of the standard deviation of 3D roughness (Sa).

2.2.3. Composition

Prior to beginning the experiment, we analyzed the surface composition of the discs using energy dispersive spectroscopy (EDS) analysis with a FESEM (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA) that includes Schottky diode field emission and an EDAX AMETEK SDD (AMETEK, Leicester, UK). To process the images that were obtained, we used EDAX TEAM software version 4.4.1 (AMETEK, Leicester, UK). We analyzed an area of 130 μ m in 200 s to obtain results expressed in mass percent composition (wt %).

2.3. Cell Culture

Human gingival fibroblasts (HGFs; Lonza, Basel, Switzerland) were incubated in T75 flasks and placed in an incubator (Nuair US Autoflow, CO₂ Water-Jacketed Incubator) at 5% CO₂, 95% air and 37 °C.

We then added a ready-made culture medium, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Biowest, Nuailé, France), supplemented with 10% bovine serum (FBS, Biowest, Nuailé, France) and 1% glutamine-penicillin-streptomycin (Biowest, Nuailé, France).

To monitor initial adhesion, growth and cell expansion between each pass, we verified the state of the cells in the T75 flasks using an Olympus CKX41SF2 microscope (Olympus, Shinjuku-ku, Tokyo,

Japan). We always placed the cells in the discs between the third and tenth pass, as recommended by the manufacturer.

We placed the specimens of both materials onto a sterile petri dish to cultivate fibroblasts on them at a concentration of 1×10^3 cells in 40 μL of growth medium in each dish. After a few hours, we checked the initial cell adhesion to the disc surface using an Olympus CKX41SF2 microscope (Olympus, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan). Next, we placed the medium onto the petri dish using a pipette until it covered the surface of the discs. We incubated the cells for 24 h prior to carrying out immunohistochemical staining.

2.4. Immunohistochemical Staining

Next, using a pipette, we carefully removed the medium and then washed the surface twice with 500 μL of DPBS (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany). Subsequently, we fixed cells with paraformaldehyde in DPBS (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) for 10 min and then aspirated and washed them again with DPBS prior to permeabilization with 15 μL of 0.1% Triton X-100 (Sigma, Saint Louis, MO, USA) at 4 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min.

Afterwards, we aspirated the Triton and then washed the specimens twice with DPBS once again. To block this phase, 1% bovine serum albumin (BSA, Biowest, Nuaille, France) was applied for 20 min. Later, we removed the excess with a pipette. Subsequently, we carried out immunohistochemical staining with 15 μL of Fluorescent Phalloidin 488 (Cytoskeleton, Inc., Denver, CO, USA) on each disc. We used this type of stain due to its affinity for F-actin, which is found in the filaments of the cellular cytoskeleton.

We stained the fibroblast nucleus with 15 μL of 4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI), which was a component of the VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). We left the discs stained with phalloidin in the dark for 30 min before being washed again with DPBS, and we applied DAPI to the surface.

We maintained the discs at 4 $^{\circ}\text{C}$ and observed them using a Zeiss LSM 7 DUO electron microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) after 24 h using an X-Cite 120 PC epifluorescence unit (Excelitas Technologies, Waltham, MA, USA).

2.5. Microscope Viewing

To obtain microscopic images, we used fluorescein isothiocyanate (FITC) at 488 nm to capture the fluorescence emitted when passing through the cytoskeleton (collected in a filter that captured a wavelength of 535 nm). To view the nuclei, we used a DAPI excitation filter at 355 nm, capturing the fluorescence emitted at 458 nm through the filter. We carried out the entire process in accordance with the parameters recommended by the manufacturer.

The software we incorporated into the microscope was the Zen Lite 2012 (Carl Zeiss, Jena, Germany), through which the images could be viewed at different objectives 20 \times /0.8 and 40 \times /1.30 with immersion oil and 63 \times /1.40 with oil. We captured the images in five regions of interest (ROI) for each disc: north-west, north-east, center, south-west and south-east. No sample was exposed to the laser any longer than 5 min so as to prevent burning.

2.6. Image Processing

We processed the obtained images using ImageJ v1.50e software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). We saved these images in .tiff format to be viewed using this program, with 2048 \times 2048 pixel dimensions. Once the images were opened and calibrated, we changed them to 8-bit. Those obtained using a 20 \times objective served to analyze the number of cells covering the surface, whereas those obtained at 40 \times and 63 \times served to analyze the morphology and to perform measurements of cell size.

These data were obtained using various plug-ins incorporated into the program. Additionally, we passed the image through three RGB color channels (red, green and blue), maintaining the blue image, which showed the nuclei limits [30].

We also used the Watershed command to automatically separate the nuclei of each cell. The next step was for us to analyze each particle, including smaller particle sizes of $5 \mu\text{m}^2$.

Finally, to obtain cell length measurements, we used three random cells in each of the images acquired at $40\times$ magnification, drawing a line along the main axis, so as to obtain the results in μm .

2.7. Cell Parameters Analysed

We analyzed certain cell variables, such as the number (proliferation), average nuclei size (core size), percentage of area occupied by nuclei in relation to the total image (percentage of nuclei coating), circularity and average length of cytoskeleton axes (cell length).

Cell parameters obtained may be observed in the results section, based on the SEM images, and we always captured said data as a standard deviation for each of the variables.

The value of circularity oscillates between 0 and 1 [10], with values closest to 0 being recognized as elongated sizes and those closest to 1 as circular, based on the formula to which the perimeter corresponds with double π multiplied by two radii (i.e., cell diameter).

2.8. Statistical Analysis

To compare the results of the two surfaces studied, we used IBM SPSS 24.0 statistical software (International Business Machines Corp, New York, NY, USA). Next, we used the Kolmogorov–Smirnov test to verify that the results were within normal parameters. For variables with normal distribution, we used Student's *t*-distribution and, in the case of non-parametric variables, the Mann–Whitney U test, thus establishing a level of significance of $p < 0.05$ [28,29].

3. Results

3.1. Surface Characterization

Surface Topography

When analyzing the images of the samples taken by the scanning electron microscope (SEM), Figure 1 shows the following: On the lithium disilicate (IPS e.max CAD) surface, chips may be seen as a result of milling of the discs and irregularities typical of ceramic sintering. The surface of VITA CAD-Temp, on the other hand, is a more homogeneous surface where concentric grooves may be observed, resulting from the machining of the piece by the manufacturer.

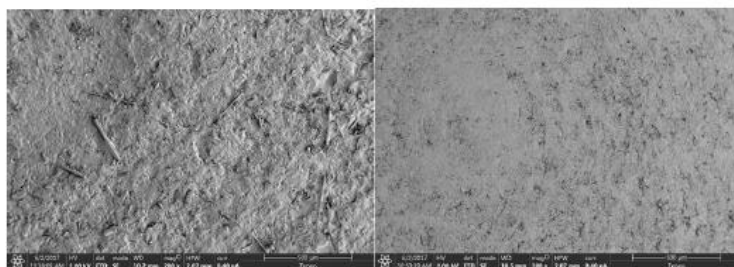


Figure 1. Images captured using SEM of the surfaces of IPS e.max CAD discs (left) and Vita CAD-Temp (right) at a magnification of $200\times$.

3.2. Profilometry

The average roughness (S_a) from the five values obtained for each material results in IPS e-max being $1.57 \pm 0.34 \mu\text{m}$ and VITA CAD-Temp being $0.38 \pm 0.02 \mu\text{m}$. There is a greater roughness in the IPS sample due to it being a less homogeneous sample.

The sample measurement areas and the images obtained from the three-dimensional roughness profile for both materials may be seen in Figure 2.

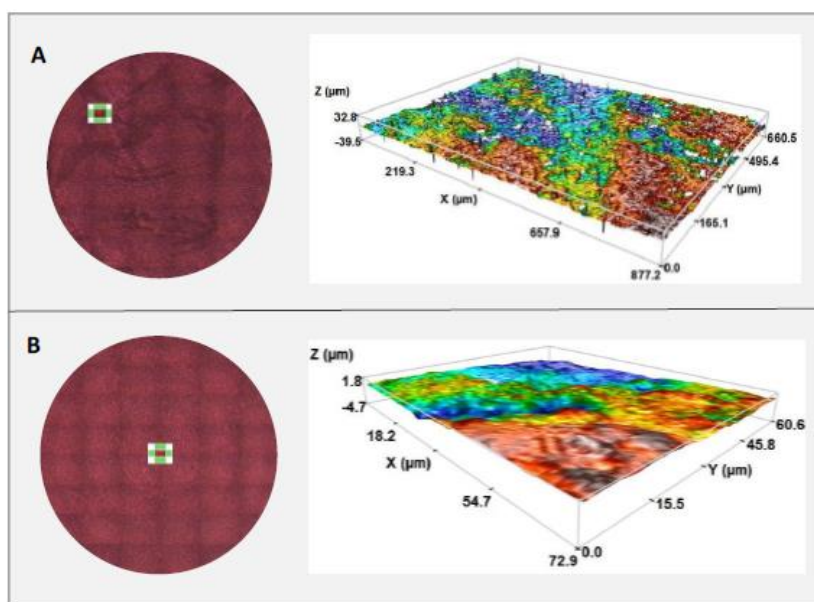


Figure 2. Measurement areas and 20x objective profilometry for each IPS (A) and VITA CAD Temp (B) disc.

3.2.1. Analysis of Surface Composition

The results obtained from the EDS analysis of IPS e. max CAD and VITA CAD Temp (Figures 3 and 4) show high crystallization peaks of silicon, oxygen and potassium, whereas the values of potassium, zinc and the other elements located by dispersive spectrometry are much lower. The breakdown of the recognized elements is shown in Table 2.

Table 2. Percentage of mass (wt %) broken down into elements, obtained through energy dispersive spectroscopy (EDS) analysis of IPS e.max CAD and Vita CAD-Temp monoColor samples.

Element	IPS e.max CAD(wt %)	Element	Vita CAD-Temp monoColor (%)
C	8.13	C	68.20
O	44.21	O	29.77
Al	1.20	Si	0.55
Si	36.72	S	1.49
P	4.18		
K	4.63		
Zn	0.93		

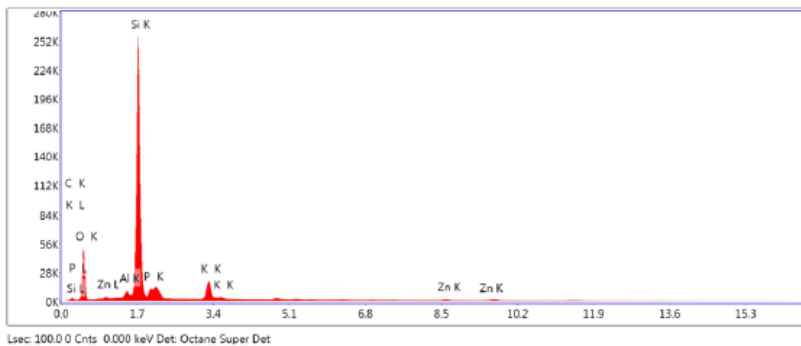


Figure 3. Energy dispersive spectroscopy analysis of IPS e-max CAD.

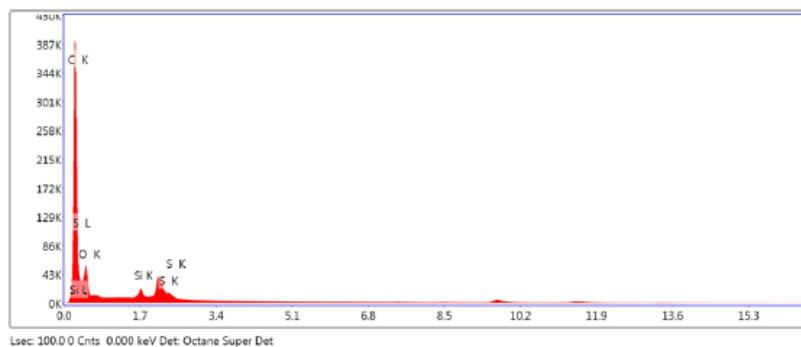


Figure 4. Energy dispersive spectroscopy analysis of VITA CAD-Temp.

Next, we describe the various values obtained in the cell parameters studied (Figure 5).

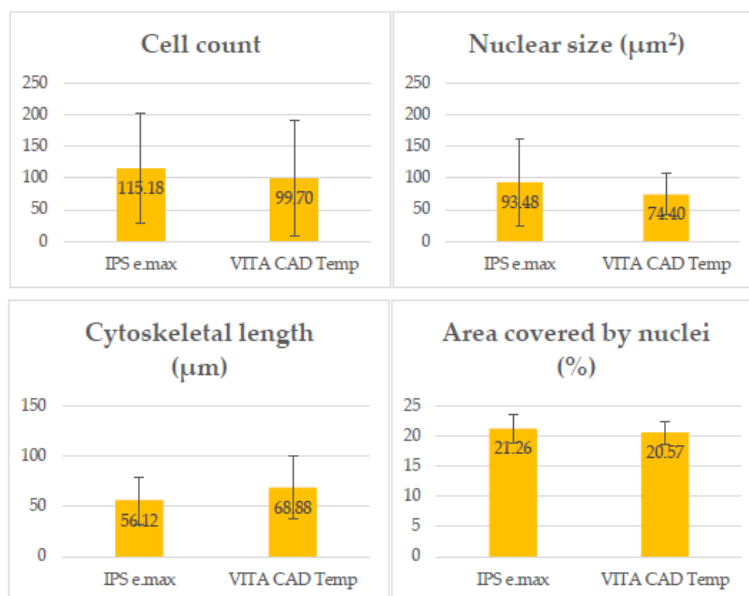


Figure 5. The graphs above represent the number of cells, average size, cytoskeleton length and area covered by nuclei on the two types of disc being studied. We obtained these data by averaging the values taken from the five regions of interest of each disc.

3.2.2. Cellular Morphology and Anchoring

Figure 6 shows the confocal microscopy images of the fibroblasts, obtained at 40 \times and 63 \times magnification, for observation of cell morphology. We used double staining to view the nuclei with DAPI (blue) and the actin filaments of the cytoskeleton with phalloidin (green).

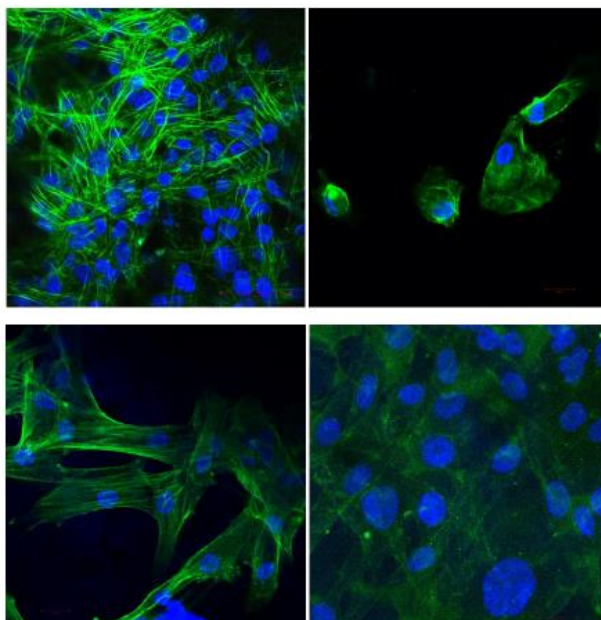


Figure 6. Confocal microscope images of fibroblasts on IPS at 40 \times and 63 \times (top left and right, respectively) and VITA CAD Temp (lower images).

3.2.3. Cytomorphometry

In relation to nuclear size, the average observed for IPS was $93.48 \pm 69.19 \mu\text{m}^2$, and the average was $74.40 \pm 32.76 \mu\text{m}^2$ for VITA CAD Temp. According to the Mann-Whitney U test, this difference was not statistically significant ($p = 0.626$).

The mean length of the main cell axis at 40 \times magnification was $56.12 \pm 23.59 \mu\text{m}$ for IPS and $68.88 \pm 31.45 \mu\text{m}$ for VITA CAD Temp. According to the Mann-Whitney U test, this difference was statistically significant ($p = 0.038$).

The mean circularity value of the nuclei was 0.57 ± 0.07 for IPS and 0.55 ± 0.14 for VITA CAD Temp. According to the Student's t-test, this difference was not statistically significant ($t_{29} = 0.661$, $p = 0.514$).

3.2.4. Cell Count

The average number of cells observed in each image taken at 20 \times magnification was quantified to assess the effect of surface topography on the cells. In the case of IPS, an average of 115.82 ± 87.68 cells was observed in each image and for VITA CAD Temp, 99.70 ± 91.71 cells. According to the Student's t-test, this difference was not statistically significant ($t_{35} = 0.544$, $p = 0.590$).

3.2.5. Covering of the Disc by Nuclei

As for the area covered by cell nuclei, the percentage observed for IPS was $21.26\% \pm 2.37$, and it was $20.57\% \pm 1.90$ in the case of Vita CAD-Temp. According to the Mann-Whitney U test, this difference was not statistically significant ($p = 0.927$).

4. Discussion

The results confirm this study's null hypothesis, thus finding similar cellular behavior on both surface types, while obtaining very similar figures of the parameters analyzed.

The Titanium's blueish-grey color has promoted the use of new aesthetic abutment materials. Many patients, especially those with high esthetic expectations, demand metal-free dentures [6,23], and zirconia and lithium disilicate are the gold standard of aesthetic materials. That's why we decided to compare one of the gold-standard materials with an interim one (PMMA), and they have a similar cellular behavior according to the results.

Our aim in this work has been to compare both materials (VITA CAD-Temp and IPS e.max CAD) in relation to fibroblast growth and adhesion to their surface. Implant abutments must have a surface with the ideal characteristics to promote cell adhesion and maintenance of soft tissue health [31].

The clinical importance of the present study is the cellular analysis that we have made to compare two different materials that are already being used as implant abutments in clinical studies. These clinical studies report good results even in the most aesthetic sectors [32–34].

No statistically significant differences were found in the majority of the parameters studied (cell count, nuclei size and area covered by cell nuclei), with the exception of cytoskeleton length of the fibroblasts. This value was higher for the Vita CAD-Temp surface, which leads to the assumption that these cells expand better over this type of material.

To date, we are unaware of any other *in vitro* study concerning these two transepithelial abutment surfaces on which these cellular parameters have been studied. Nevertheless, of note may be the article by Atay et al., in which cytotoxicity and cellular apoptosis on various ceramic and polymeric materials produced by a CAD/CAM system are studied. This group includes IPS e.max CAD and Vita CAD-Temp, where it is shown that the latter presents low cytotoxicity levels [7].

These authors point out the lack of studies in which the biological behavior of the various dental materials available on the market is evaluated, with most articles focused primarily on their physical and chemical behavior.

Another study comparing these materials is that by Mörmann WH et al., which compares the surface of natural enamel with that of artificial enamel, analyzing, among other parameters, the levels of roughness using SEM. This group of researchers looked for a material that resembles the natural dentition as much as possible in order to achieve a natural surface and that prevents the appearance of biofilm on the surface. They concluded that all the materials studied behaved in an almost identical way in this regard [25].

The biological properties of restoration materials are essential to obtain good results, particularly in the case of implants. Specifically, given that the intermediate abutments are structures in close contact with the implant and with gingival tissue, the cell lines of this tissue must be adapted around them [10,25,26,35]. Keratinocytes represent the main line of keratinized gingiva, whereas gingiva fibroblasts create the extracellular matrix, collagen and stroma that surround the keratinocyte layer [6,36].

As Grenade et al. pointed out fairly recently, lithium disilicate attachments were introduced, which, like those of PMMA, interact with the soft gingival tissue and influence the stabilization of this tissue around the implant crown. It is especially important that this joint be strong enough to form an airtight barrier that protects the peri-implant tissue from bacterial invasion [9].

Bacterial adhesion and consequent initial biofilm composition depend on the topography, hydrophobicity of the surface and existing contact between the different microorganisms. Oral biofilm is one of the most studied microbiological systems and tends to form mainly around the interfaces between one material and another [37].

Adaptation of this fibroblast cell line depends on factors such as the material surface, cellular phenotype or composition of the material. In this study, we decided to use human fibroblasts from an immortal cell line in order to obtain results more easily extrapolated to all types of patients. Other studies use fibroblasts extracted from the connective tissue of a patient from whom the third molar or

even cell lines of mice are extracted, which have antigen limitations or other intrinsic characteristics of each species that can lead to error when extrapolating the results obtained to other cases [6,24].

Roughness is an extensively analyzed parameter in various articles in which different implant element surfaces are studied. In the case of materials used in this study, this value is lower in the VITA CAD-Temp ($0.38 \pm 0.02 \mu\text{m}$), which, according to studies, also provides comfort to patients given that friction on soft tissues is reduced (Mörmann). Pendegrass et al. concluded that cell adhesion and proliferation improved in values between 0.03 and 0.3 μm , whereas Pabst obtains values $<1 \mu\text{m}$ as smooth surfaces and $>1 \mu\text{m}$ as rough surfaces, establishing typical roughness for dental materials above 1.3 microns [6,36].

Traditionally, it has been said that fibroblasts adhesion is better on smooth surfaces, although there is no current consensus regarding the ideal material surface in contact with mucosa. Quicker contact has been seen on smooth surfaces, which would coincide with the results of the study in which images were taken at 24 h. An interesting question is whether there is a need to create a gingival fibroblast barrier stable enough to prevent the passage of bacteria to the area. These are capable of producing bacterial colonies in just 8 h. Provisional material such as VITA CAD Temp provides roughness with low values, as demonstrated in the results, and producing adequate cell growth and spreading can positively influence implant integrity [6,10,24,38,39].

This *in vitro* study has some limitations. The roughness values obtained are good for fibroblast proliferation but it could have different reaction with *C. albicans* adhesion and proliferation. Previous studies showed that the Ra parameter should be near 0.2 micrometers. It could be interesting to study the surface characteristics in relation to bacterial colonization in future studies [40–43].

It is true that, although the values obtained in this study may bear some similarity to those collected in other published articles regarding roughness, it should not be compared to those irregularities, since, in this case, we carried out the profilometry study in accordance with Standard ISO 25178. As commented by Fischer et al., Kournetas et al. and Rizo-Gorrita et al., it may be necessary to revisit the need to obtain roughness parameters in a different manner for *in vitro* studies, given that the Ra value is an arithmetic value that depends on experimental conditions and the technique used on the surface [10,21,39].

Another factor that influences cell adhesion is the composition of the material, which we included in Table 2, in the case of this article. We presented the results in percentage of mass for each element according to the materials analyzed.

On the one hand, IPS e.max CAD, according to the manufacturer, consists of the following compounds: SiO_2 , Li_2O , K_2O , MgO , Al_2O_3 , P_2O_5 , ZnO and other oxides. When analyzing the discs in this study, according to EDS, we could verify there was a high proportion of silicon and oxygen. All the elements indicated by the manufacturer were present with the exception of lithium, which, due to its low molecular weight, often goes unnoticed in EDS analysis. Other authors, such as Riquieri et al., have experienced a similar situation when obtaining the results of their studies [44].

Vita CAD-Temp is composed, according to the manufacturer, of PMMA or poly (methyl 2-methylpropenoate) ($\text{C}_5\text{O}_2\text{H}_8$), silicon dioxide, pigments and MPRP (microfilled reinforced polyacrylate). In EDS analysis, we detected carbon and oxygen, as well as sulfur and silicon. As we know, carbon is the main element of PMMA chains, but we can also find other elements such as hydrogen, oxygen, nitrogen, chlorine, sulfur or fluorine. In this case, hydrogen was not detected [45]. The Vita CAD-Temp manufacturer assert there is no residual monomer in CAD/CAM polymerization and we couldn't find it either.

Although the SEM images of the disc surfaces show a slightly more regular and concentric surface in the case of Vita CAD-Temp, both surfaces are not homogeneous. Perhaps this little difference is one factor that favors the best expansion of fibroblasts on this surface. Nevertheless, this is the only statistically significant difference we have found between the two materials.

The influence of the material's components in the surrounding tissues is still not understood. Some studies report that this can affect the quantity and bound protein type, as well as its conformation, orientation and binding strength [23].

Another parameter that indicates the level of cellular response is the shape of the cytoskeleton, which coordinates the regulatory signals that the fibroblast receives from the medium, in addition to helping the coordination of cell size and function. In this study, only the nuclei coating was calculated, but it is possible to calculate the percentage of cell coating, whose formula is indicated by Rizo-Gorrita et al. [10,46,47]. The formula is as follows: % nuclear area $\times \frac{\text{area nuclear}}{\text{area celular}}$.

Applying this formula, the cell coating on the IPS e-max disc was $\frac{21.26}{0.306} = 69.47\%$, and it was $\frac{20.57}{0.306} = 67.22\%$ on the PMMA disc.

In addition to the aforementioned parameters, there are others such as wettability or cytotoxicity that can influence early adhesion to the surface of the study materials. To analyze them all, it is necessary for future *in vitro* studies to study more variables, using standards (such as ISO 10993: 2009), so as to objectively compare results in future studies.

5. Conclusions

With the results obtained in this study, we conclude that Vita CAD-Temp is a material that, although widely used for other dental applications, demonstrates a cellular behavior that is similar to those of lithium disilicate (current gold standard) and is, therefore, a material suitable for use as an implant attachment in daily practice, as it helps shape the gum around the implant crown.

More *in vitro* and clinical studies will be necessary where the benefits of this polymeric material can be proven.

Author Contributions: C.H.-G., M.R.-G., I.L.-O., M.-Á.S.-F., R.C.-O. and D.T.-L. conceived, designed and performed the experiments. C.H.-G., M.R.-G., M.-Á.S.-F., R.C.-O. and D.T.-L. analyzed the data. D.T.-L. supervised work. C.H.-G., M.R.-G., I.L.-O., M.-Á.S.-F. and D.T.-L. wrote the manuscript with input from all authors.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors gratefully thank the support from Biology and Microscopy Departments from the Centre of Investigation, Technology and Innovation from Seville University (CITIUS) for experimental assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Awada, A.; Nathanson, D. Mechanical properties of resin-ceramic CAD/CAM restorative materials. *J. Prosthet. Dent.* **2015**, *114*, 587–593. [CrossRef] [PubMed]
- Miyazaki, T.; Hotta, Y. CAD/CAM systems available for the fabrication of crown and bridge restorations. *Aust. Dent. J.* **2011**, *56*, 97–106. [CrossRef]
- Zarone, F.; Ferrari, M.; Mangano, F.; Leone, R.; Sorrentino, R. “Digitally Oriented Materials”: Focus on Lithium Disilicate Ceramics. *Int. J. Dent.* **2016**, *2016*, 1–10. [CrossRef] [PubMed]
- Lí, R.; Chow, T.; Matinlinna, J. Ceramic dental biomaterials and CAD/CAM technology: State of the art. *J. Prosthodontic Res.* **2014**, *58*, 208–216. [CrossRef]
- Horvath, S.D. Key Parameters of Hybrid Materials for CAD/CAM-Based Restorative Dentistry. *Compend. Contin. Educ. Dent.* **2016**, *37*, 638–643.
- Pabst, A.; Walter, C.; Grassmann, L.; Weyhrauch, M.; Brüllmann, 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 Invest.* **2013**, *18*, 1111–1118. [CrossRef]
- Atay, A.; Gürdal, I.; Bozok Çetintas, V.; Üşümez, A.; Cal, E. Effects of New Generation All-Ceramic and Provisional Materials on Fibroblast Cells. *J. Prosthodontics* **2018**, *28*, e383–e394. [CrossRef]
- Tetè, S.; Zizzari, V.; 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. [CrossRef] [PubMed]

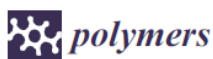
9. Grenade, C.; De Pauw-Gillet, M.; Gailly, P.; Vanheusden, A.; Mainjot, A. Biocompatibility of polymer-infiltrated-ceramic-network (PICN) materials with Human Gingival Fibroblasts (HGFs). *Dent. Mater.* **2016**, *32*, 1152–1164. [[CrossRef](#)]
10. Rizo-Gorrita, M.; Luna-Oliva, I.; Serrera-Figallo, M.; Gutiérrez-Pérez, J.; 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Coldea, A.; Swain, M.V.; Thiel, N. In-vitro strength degradation of dental ceramics and novel PICN material by sharp indentation. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2013**, *26*, 34–42. [[CrossRef](#)]
12. Prussaefs, P.; AlHelal, A. A technique for immediately restoring single dental implants with a CAD-CAM implant-supported crown milled from a poly(methyl methacrylate) block. *J. Prosthet. Dent.* **2018**, *119*, 339–344. [[CrossRef](#)]
13. Wolfart, S.; Eschbach, S.; Scherrer, S.; Kern, M. Clinical outcome of three unit lithium disilicate glass-ceramic fixed dental prostheses: Up to 8 year results. *Dent. Mater.* **2009**, *25*, e63–e71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Willard, A.; Gabriel Chu, T. The science and application of IPS e.Max dental ceramic. *Kaohsiung J. Med. Sci.* **2018**, *34*, 238–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Brackett, M.; Lockwood, P.; Messer, R.; Lewis, J.; Bouillaguet, S.; Wataha, J. In vitro cytotoxic response to lithium disilicate dental ceramics. *Dent. Mater.* **2008**, *24*, 450–456. [[CrossRef](#)]
16. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. 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. [[CrossRef](#)]
18. Salido, M.; Vilches, J.L.; Gutiérrez, J.L.; Vilches, J. Actin cytoskeletal organization in human osteoblasts grown on different dental titanium implant surfaces. *Histol. Histopathol.* **2007**, *22*, 1355–1364. [[CrossRef](#)]
19. Özçelik, T.B.; Yılmaz, B.; Şeker, 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. [[CrossRef](#)]
20. 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. [[CrossRef](#)]
21. 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 (Basel)* **2017**, *10*, 1358. [[CrossRef](#)]
22. 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. [[CrossRef](#)]
23. Rutkunas, V.; Bukelskiene, V.; Sabaliauskas, V.; Balciunas, E.; Malinauskas, M.; Baltrikine, D. Assessment of human gingival fibroblast interaction with dental implant abutment materials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2015**, *26*, 169. [[CrossRef](#)]
24. 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.
25. Mörmann, W.H.; Stawarczyk, B.; Ender, A.; Sener, B.; Attin, T.; Mehl, A. Wear characteristics of current aesthetic dental restorative CAD/CAM materials: Two-body wear, gloss retention, roughness and Martens hardness. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2013**, *20*, 113–125. [[CrossRef](#)]
26. 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](#)]
27. Cho, Y.D.; Shin, J.C.; Yoon, H.L.; 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 (Basel)* **2015**, *8*, 6018–6028. [[CrossRef](#)]
28. Pallant, J. *SPSS Survival Manual*, 3rd ed.; McGraw Hill Open University Press: New York, NY, USA, 2007; pp. 224–240.
29. Cohen, J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, 2nd ed.; Erlbaum: Hillsdale, NJ, USA, 1988.

30. Sanchez Valenciano, D. *Análisis del software ImageJ para el análisis científico de imágenes. Final Project for Sound and Video Engineering program, Escuela Técnica Superior de Ingeniería y Sistemas de Telecomunicación*; Universidad Politécnica de Madrid: Madrid, Spain, 2014; pp. 24–30.
31. Roffel, S.; Wu, G.; Nedeljkovic, I.; Meyer, M.; Razafariison, 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**, *12*, 25–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Proussaefs, P. Custom CAD-CAM healing abutment and impression coping milled from a poly(methyl methacrylate) block and bonded to a titanium insert. *J. Prosthet. Dent.* **2016**, *116*, 657–662. [[CrossRef](#)]
33. 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. [[CrossRef](#)]
34. Erhan Çömlekoğlu, M.; Nizam, N.; Çömlekoğlu, M.D. Immediate definitive individualized abutments reduce peri-implant bone loss: A randomized controlled split-mouth study on 16 patients. *Clin. Oral. Invest.* **2018**, *22*, 475–486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Pae, A.; Lee, H.; Kim, H.S.; Kwon, Y.D.; Woo, Y.H. Attachment and growth behavior of human gingival fibroblasts on titanium and zirconia ceramic surfaces. *Biomed. Mater.* **2009**, *4*, 025005. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. 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. Invest.* **2016**, *20*, 1101–1108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. 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](#)]
38. Raffaelli, L.; Rossi Iommetti, P.; 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. A.* **2008**, *86*, 959–968. [[CrossRef](#)]
39. 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](#)]
40. Acosta-Torres, L.S.; Mendieta, I.; Nuñez-Anita, R.E.; Cajero-Juárez, M.; Castaño, V.M. Cytocompatible antifungal acrylic resin containing silver nanoparticles for dentures. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 4777–4786. [[CrossRef](#)]
41. Abuzar, M.A.; Bellur, S.; Duong, N.; Kim, B.B.; Lu, P.; Palfreyman, N.; Surendran, D.; Tran, V.T. Evaluating surface roughness of a polyamide denture base material in comparison with poly (methyl methacrylate). *J. Oral Sci.* **2010**, *52*, 577–581. [[CrossRef](#)]
42. Chladek, G.; Basa, K.; Mertas, A.; Pakielna, W.; Żmudzki, J.; Bobela, E.; Król, W. Effect of Storage in Distilled Water for Three Months on the Antimicrobial Properties of Poly(methyl methacrylate) Denture Base Material Doped with Inorganic Filler. *Materials (Basel)* **2016**, *9*, 328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Nam, K.Y.; Lee, C.H.; Lee, C.J. Antifungal and physical characteristics of modified denture base acrylic incorporated with silver nanoparticles. *Gerodontology* **2012**, *29*, e413–e419. [[CrossRef](#)]
44. Riquieri, H.; Monteiro, J.B.; Viegas, D.C.; Campos, T.M.B.; de Melo, R.M.; de Siqueira Ferreira Arzaloni Saavedra, G. Impact of crystallization firing process on the microstructure and flexural strength of zirconia-reinforced lithium silicate glass-ceramics. *Dent. Mater.* **2018**, *34*, 1483–1491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. 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**, *34*, 1702–1709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Swanson, J.A.; Lee, M.; Knapp, P.E. Cellular dimensions affecting the nucleocytoplasmic volume ratio. *J. Cell Biol.* **1991**, *115*, 941–948. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Kulkarni, S. *Machine Learning Algorithms for Problem Solving in Computational Applications: Intelligent Techniques*; IGI Global: Hershey, PA, USA, 2012; pp. 322–328.




ANEXO II

Artículo publicado en la revista científica internacional *Polymers* en septiembre de 2019 bajo el título “*Biocompatibility of Polymer and Ceramic CAD/CAM Materials with Human Gingival Fibroblasts (HGFs)*”:



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 (Ø: 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 (Y₂O₃), reinforces the zirconium oxide and 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)	Zirconia-reinforced 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, Hanau-Wolfgang, 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.

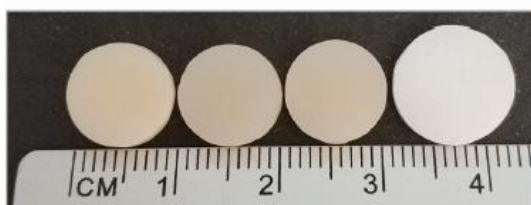


Figure 1. Materials (from left to right): PMMA, ZLS, LS₂, and Y-TZP.

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 ± 25µm). 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 short-wavelength (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).

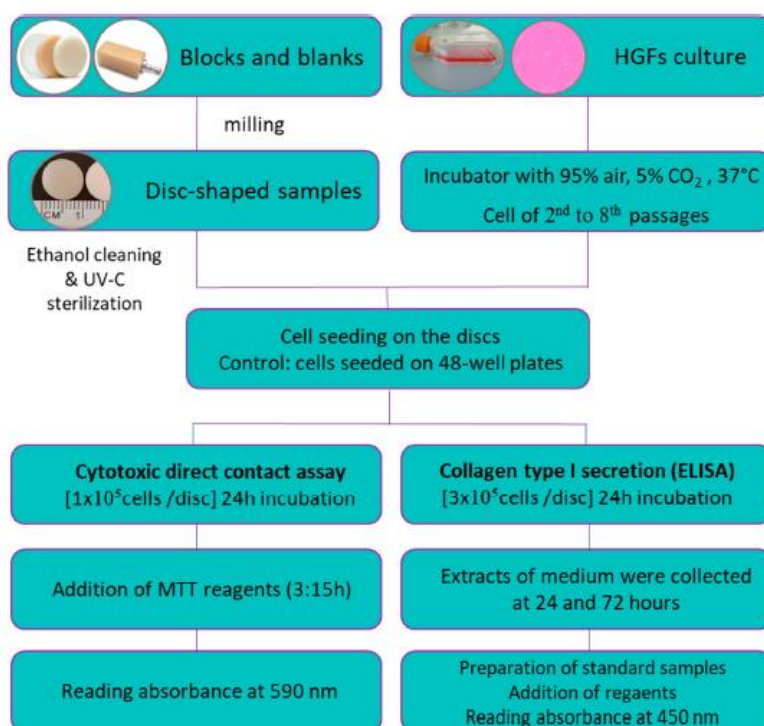


Figure 2. Diagram of the study design.

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 µL 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 µL 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)] × 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 µL 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 µL of dilutions and 100 µL 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 ($p > 0.05$).

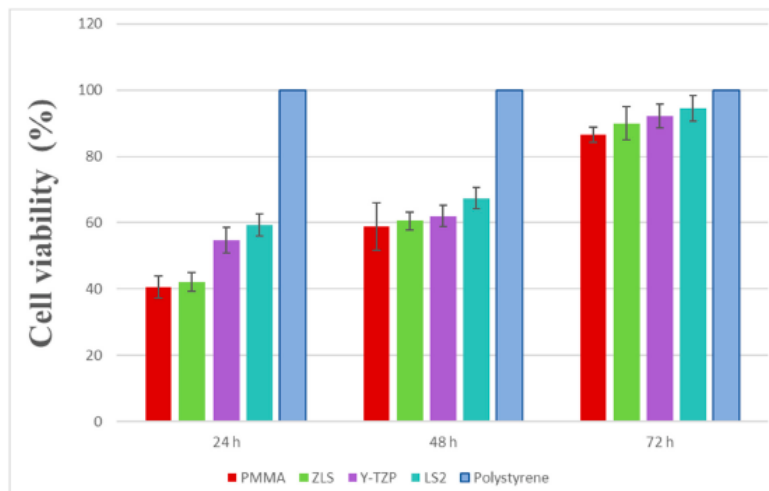


Figure 3. Cell viability percentage at 24, 48, and 72 h using MTT assay. The data are expressed as the mean values \pm standard deviation.

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 ($p < 0.01$).

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).

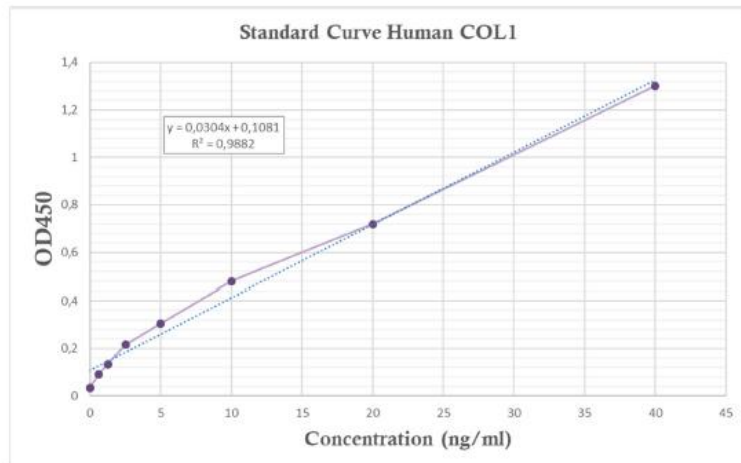


Figure 4. Standard curve used in ELISA assay. In the top-left box, the equation of the line used to obtain the concentrations of the samples is given, in addition to the correlation coefficient R^2 , which indicates a strong relation between the two variables (optical density (OD) and collagen type I (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 \pm 0.41 ng/mL) showed the highest secretions ($p < 0.01$) compared to the other groups; in decreasing order: Y-TZP (3.89 \pm 0.14 ng/mL), ZLS (3.77 \pm 0.30 ng/mL), and PMMA (3.01 \pm 0.06 ng/mL). The collagen secretion measured in the polystyrene control surface (1.63 \pm 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 ($p = 0.05$).

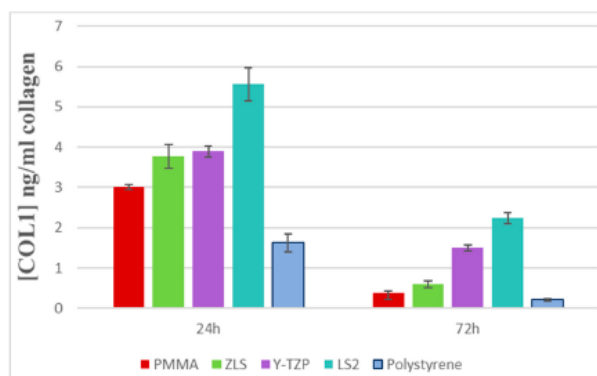


Figure 5. Type I secretion levels at 24 and 72 h.

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).

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 all-ceramic 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 immunosorption 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, M.R.-G., C.H.-G., D.T.-L. and J.-L.G.-P.; formal analysis, M.R.-G. and C.H.-G.; investigation, M.R.-G. and C.H.-G.; methodology, M.-A.S.-F.; project administration, J.-L.G.-P.; supervision, D.T.-L., M.-A.S.-F. and J.-L.G.-P.; validation, D.T.-L.; writing—original draft, M.R.-G., C.H.-G. and M.-A.S.-F.; writing—review & editing, M.R.-G., C.H.-G., D.T.-L., M.-A.S.-F. and J.-L.G.-P.

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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Herráez-Galindo, C.; Rizo-Gorrita, M.; Luna-Oliva, I.; Serrera-Figallo, M.Á.; Castillo-Oyagüe, R.; Torres-Lagares, D. In vitro Comparative Study of Fibroblastic Behaviour o Polymethacrylate (PMMA) and Lithium Disilicate Polymer Surfaces. *Polymers* **2019**, *11*, 744. [[CrossRef](#)]
- 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. [[CrossRef](#)]
- 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- 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](#)]
- 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](#)]
- 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. [[CrossRef](#)]
- 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](#)]
- Miyazaki, T.; Nakamura, T.; Matsumura, H.; Ban, S.; Kobayashi, T. Current status of zirconia restoration. *J. Prosthodont. Res.* **2013**, *57*, 236–261. [[CrossRef](#)]
- 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-Lorenti, 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**. [[CrossRef](#)]
- Tètè, 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. [[PubMed](#)]
- Awada, A.; Nathanson, D. Mechanical properties of resin-ceramic CAD/CAM restorative materials. *J. Prosthet. Dent.* **2015**, *114*, 587–593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zarone, F.; Ferrari, M.; Mangano, E.G.; Leone, R.; Sorrentino, R. “Digitally Oriented Materials”: Focus on Lithium Disilicate Ceramics. *Int. J. Dent.* **2016**, *2016*, 9840594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Horvath, S.D. Key Parameters of Hybrid Materials for CAD/CAM-Based Restorative Dentistry. *Compend. Contin. Educ. Dent.* **2016**, *37*, 638–643. [[PubMed](#)]
- 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. [[PubMed](#)]
- Chevalier, J. Critical effect of cubic phase on aging in 3mol% yttria-stabilized zirconia ceramics for hip replacement prosthesis. *Biomaterials* **2004**, *25*, 5539–5545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

19. 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. [[CrossRef](#)]
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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
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. [[CrossRef](#)]
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 disilicate-based 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. [[CrossRef](#)]
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. [[CrossRef](#)]
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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
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. [[CrossRef](#)]
35. Elsaka, S.E.; Elnaghy, A.M. Mechanical properties of zirconia reinforced lithium silicate glass-ceramic. *Dent. Mater.* **2016**, *32*, 908–914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Sen, N.; Us, Y.O. Mechanical and optical properties of monolithic CAD-CAM restorative materials. *J. Prosthet. Dent.* **2018**, *119*, 593–599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. *Celtra[®] Duo Zirconia-Reinforced Lithium Silicate (ZLS) Block*; Technical Monograph; Dentsply Sirona: Hanau-Wolfgang, 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. [[CrossRef](#)]
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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Salido, M.; Vilches, J.L.; Gutiérrez, J.L. Actin cytoskeletal organization in human osteoblasts grown on different dental titanium implant surfaces. *Histol. Histopathol.* **2007**, *22*, 1355–1364. [[CrossRef](#)]
42. Alp, G.; Murat, S.; Yilmaz, B. Comparison of Flexural Strength of Different CAD/CAM PMMA-Based Polymers. *J. Prosthodont.* **2019**, *28*, e491–e495. [[CrossRef](#)]

43. Huettig, F.; Prutscher, A.; Goldammer, C.; Kreuzer, 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. [\[CrossRef\]](#)
44. Lo Giudice, G.; Ciccù, 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. [\[CrossRef\]](#)
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. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
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. [\[CrossRef\]](#)
47. Özçelik, T.B.; Yılmaz, 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. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
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. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
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. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
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. [\[CrossRef\]](#)
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. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
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. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
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. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
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. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
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. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
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: Boca Raton, FL, USA, 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. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Wataha, J.; Craig, R.; Hanks, C. Precision of and new methods for testing in vitro alloy cytotoxicity. *Dent. Mater.* **1992**, *8*, 65–70. [\[CrossRef\]](#)
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. [\[CrossRef\]](#)
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. [\[CrossRef\]](#)

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. [[CrossRef](#)]
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. [[CrossRef](#)]
65. Elshahawy, W. Chapter 15: Biocompatibility. In *Advances in Ceramics Electric and Magnetic Ceramics, Bioceramics, Ceramics and Environment*, 1st ed.; 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
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. [[CrossRef](#)]
68. Sulaiman, T.A.; Abdulmajed, 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. [[PubMed](#)]
69. Seabra, A.B.; Durán, N. Nanotoxicology of Metal Oxide Nanoparticles. *Metals* **2015**, *5*, 934–975. [[CrossRef](#)]
70. Van Landuyt, K.; Nawrot, T.; Geebelen, 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 meta-analytical approach. *Dent. Mater.* **2011**, *27*, 723–747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
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. [[CrossRef](#)]
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. Periodontol. Implant. Sci.* **2016**, *46*, 362–371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. 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*, 61. [[CrossRef](#)]
74. Kramer, P.R.; Janiketh, A.; Cai, Z.; Ma, S.; Watanabe, I. Integrin mediated attachment of periodontal ligament to titanium surfaces. *Dent. Mater.* **2009**, *25*, 877–883. [[CrossRef](#)]
75. Iyer, P.; Walker, K.J.; Madhally, S.V. Increased matrix synthesis by fibroblasts with decreased proliferation on synthetic chitosan-gelatin porous structures. *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109*, 1314–1325. [[CrossRef](#)]
76. Häkkinen, L.; Larjava, H.; Fournier, B.P. Distinct phenotype and therapeutic potential of gingival fibroblasts. *Cytotherapy* **2014**, *16*, 1171–1186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
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. [[CrossRef](#)]
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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



ANEXO III

Premio al mejor póster de investigación en el Congreso de la Asociación Andaluza de Cirugía Bucal (AACIB) celebrado en 2019:



CERTIFICADO DE PREMIO AL MEJOR POSTER EN LA CATEGORÍA DE INVESTIGACIÓN

A favor de D. / Dña.

Herráez-Galindo, MC.; Rizo-Gorrita, M.; Luna-Oliva, I.; Serrera-Figallo, MA.; Castillo-Oyagüe, R.; Torres-Lagares, D.

por la presentación del póster titulado **“ESTUDIO COMPARATIVO IN VITRO DEL COMPORTAMIENTO FIBROBLÁSTICO SOBRE SUPERFICIES DE POLÍMERO POLIMETACRILATO (PMMA) Y DISILICATO DE LITIO”** en el II Congreso de la Asociación Andaluza de Cirugía Bucal, celebrado en el Hotel NH Ciudad de Almería, el día 21 de septiembre de 2019.

Y para que surta los efectos oportunos, este documento queda acreditado por:

D. Daniel Torres Lagares

Presidente de la Asociación Andaluza de Cirugía Bucal

Sevilla, 23 de septiembre de 2019

