



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

**FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA**

**Departamento de Estomatología**

**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO *IN VITRO* DE LA RESPUESTA OSTEABLÁSTICA  
SOBRE DISCOS DE TITANIO EN FUNCIÓN DE SU RUGOSIDAD  
Y LA APLICACIÓN TÓPICA DE MELATONINA**

Programa de Doctorado en Odontología RD 1393/2007

**CAROLINA PÉREZ MARTÍNEZ**

**Directores:**

**Prof.<sup>a</sup> Dra. María Fernanda Solá Ruiz**

**Prof. Dr. José Javier Martín de Llano**

**VALENCIA**

**2017**





VNIVERSITAT D VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia

Departament d'Estomatologia

**ESTUDIO *IN VITRO* DE LA RESPUESTA  
OSTEOBLÁSTICA SOBRE DISCOS DE  
TITANIO EN FUNCIÓN DE SU RUGOSIDAD  
Y LA APLICACIÓN TÓPICA DE  
MELATONINA**

TESIS DOCTORAL

**CAROLINA PÉREZ MARTÍNEZ**

**2017**



ESTUDIO *IN VITRO* DE LA RESPUESTA  
OSTEOBLÁSTICA SOBRE DISCOS DE TITANIO  
EN FUNCIÓN DE SU RUGOSIDAD Y LA  
APLICACIÓN TÓPICA DE MELATONINA

Memoria de investigación que presenta:

**CAROLINA PÉREZ MARTÍNEZ**

para optar al Grado de Doctora en Odontología por  
la Universitat de València

Directores:

Profa. Dra. María Fernanda Solá Ruiz

Prof. Dr. José Javier Martín de Llano

Departamento de Estomatología

Departamento de Patología

Facultat de Medicina i Odontologia

Universitat de València

Valencia, 2017



**Doña María Fernanda Solá Ruiz**, Profesora Contratado Doctor Interina del Departamento de Estomatología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València Estudi General y **Don José Javier Martín de Llano**, Profesor Titular del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València Estudi General,

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo de investigación titulado “Estudio *in vitro* de la respuesta osteoblástica sobre discos de titanio en función de su rugosidad y la aplicación tópica de melatonina” del que es autora Doña Carolina Pérez Martínez, ha sido realizado en esta Universidad bajo nuestra dirección y supervisión, reuniendo en nuestra opinión todos los requisitos para ser presentado y defendido para la obtención del Grado de Doctora en Odontología por esta Universidad.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Valencia a 28 de Febrero de 2017.

**Fdo. María Fernanda Solá Ruiz**

**Fdo. José Javier Martín de Llano**





# AGRADECIMIENTOS

A los directores del presente trabajo:

- A la profesora Fernanda Solá, por confiar en mí desde el principio y abrirme las puertas del apasionante mundo de la docencia y la investigación. Por su implicación y cercanía. Su orientación y respaldo han sido fundamentales para la realización de esta tesis doctoral, y me han permitido crecer tanto profesional como personalmente. Gracias por apoyarme siempre.
- Al profesor Javier Martín de Llano, por formar parte activa de este ilusionante proyecto. Por introducirme en el cautivador campo de los cultivos celulares, transmitirme sus amplios conocimientos y explicarme amablemente todo aquello que por mi formación desconocía.

A todos mis compañeros de la Unidad Docente de Prostodoncia y Oclusión, por el apoyo prestado. Especialmente al equipo de Nuevos Materiales del Máster de Prótesis y a mis compañeros de Practicum de Adulto, por dejarme aprender de ellos cada día.

A Biomet 3i Dental Ibérica®. Por ceder los discos empleados en este estudio. Y a sus ingenieros y personal de planta, por enseñarme y explicarme el proceso de producción con toda la amabilidad y facilidades posibles.

Al Servicio de Microscopía Electrónica y al Instituto de Tecnología de Materiales de la Universidad Politécnica de Valencia, por poner a nuestra disposición el equipamiento y asesoramiento necesario para la obtención de parte de los resultados de este trabajo de investigación.



## **DEDICATORIA**

A todos los amigos y amigas que de un modo u otro me han acompañado y ayudado durante esta aventura. En especial a Carlos, por ser ese amigo incondicional que todos necesitamos.

A mi hermano. Porque aunque tardé en llegar a su vida, ha sido mi compañero de viaje desde entonces y un pilar sobre el que apoyarme.

Gracias por hacerme sentir que tuve una de las mejores infancias que se pueden desear.

A mis padres. Por dárme todo. Por haber hecho de mí la persona que soy y animarme a luchar por mis sueños. Porque todos mis logros son sus logros.

GRACIAS siempre.



*“El éxito es la suma de pequeños  
esfuerzos repetidos día tras día”*

*(Robert Collier)*



## ÍNDICE

---

## ÍNDICE



<b>1.INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. OSEOINTEGRACIÓN.....</b>	<b>7</b>
2.1.1. FISIOLÓGÍA ÓSEA.....	7
2.1.1.1. MATRIZ EXTRACELULAR MINERALIZADA.....	8
2.1.1.2. OSTEÓBLASTOS Y OSTEÓCITOS .....	11
2.1.1.3. OSTEÓCLASTOS .....	13
2.1.2. REMODELADO ÓSEO Y PROCESO DE OSEOINTEGRACIÓN .....	15
<b>2.2. IMPLANTOLOGÍA .....</b>	<b>18</b>
2.2.1. EVOLUCIÓN HISTÓRICA .....	18
2.2.2. FACTORES QUE AFECTAN A LA OSEOINTEGRACIÓN.....	23
<b>2.3. MATERIALES PARA LA FABRICACIÓN DE IMPLANTES DENTALES .....</b>	<b>24</b>
2.3.1. PROPIEDADES QUE DEBE CUMPLIR EL MATERIAL.....	25
2.3.1.1. BIÓCOMPATIBILIDAD .....	25
2.3.1.2. PROPIEDADES MECÁNICAS .....	27
2.3.1.3. RESISTENCIA A LA CORROSIÓN .....	28
2.3.2. BIOMATERIALES PARA IMPLANTES DENTALES.....	30
2.3.2.1. ALEACIONES DE Cr-Co .....	30
2.3.2.2. ALEACIONES DE Ni-Cr-Ti.....	30
2.3.2.3. CARBONO .....	31
2.3.2.4. CERÁMICAS .....	31
2.3.2.5. MATERIALES POLIMÉRICOS.....	31
2.3.2.6. CIRCONA.....	32
2.3.2.7. TITANIO .....	33
2.3.2.7.1. GRADOS DE TITANIO Y ALEACIÓN DE TITANIO .....	34
2.3.3. RESPUESTA CELULAR FRENTE AL MATERIAL .....	36
<b>2.4. DISEÑO .....</b>	<b>37</b>
2.4.1. DISEÑO MACROSCÓPICO .....	38
2.4.2. DISEÑO MICROSCÓPICO.....	46
2.4.2.1. TRATAMIENTOS DE SUPERFICIE .....	48
2.4.2.1.1. PARÁMETROS DE CARACTERIZACIÓN DE LAS SUPERFICIES.....	48
2.4.2.1.2. ARENADO.....	49
2.4.2.1.3. GRABADO ÁCIDO .....	50
2.4.2.1.4. COMBINACIÓN ARENADO Y GRABADO ÁCIDO .....	50
2.4.2.1.5. RECUBRIMIENTO CON FOSFATO CÁLCICO.....	50
<b>2.5. MELATONINA.....</b>	<b>52</b>
2.5.1. DEFINICIÓN, BIOSÍNTESIS Y FUNCIONES GENERALES.....	52
2.5.2. INFLUENCIA A NIVEL ÓSEO.....	54
<b>2.6. ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA. CUANTIFICACIÓN DE ARNm ESPECÍFICOS .....</b>	<b>55</b>
2.6.1. SÍNTESIS PROTEICA.....	55
2.6.2. PCR CUANTITATIVA O EN TIEMPO REAL.....	57
<b>2.7. LIMPIEZA Y ESTERILIZACIÓN .....</b>	<b>61</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>65</b>
<b>3.1. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>67</b>
<b>3.2. OBJETIVOS .....</b>	<b>69</b>

<b>4. MATERIAL Y MÉTODO</b> .....	<b>71</b>
<b>4.1. DISCOS DE TITANIO</b> .....	<b>73</b>
4.1.1. FABRICACIÓN Y TRATAMIENTO DE SUPERFICIE .....	74
4.1.1.1. MECANIZADO DE LOS DISCOS .....	75
4.1.1.2. BAÑOS DE ULTRASONIDOS .....	76
4.1.1.3. GRABADO ÁCIDO DUAL.....	77
4.1.1.4. RECUBRIMIENTO CON FOSFATO CÁLCICO .....	79
4.1.2. MICROSCOPIA ÓPTICA .....	80
4.1.3. MICROSCOPIA CONFOCAL DE ESCANEADO LÁSER .....	80
4.1.4. LIMPIEZA .....	82
4.1.5. ESTERILIZACIÓN POR RAYOS GAMMA.....	82
<b>4.2. CULTIVO CELULAR <i>IN VITRO</i> DE LA LÍNEA CELULAR MG63</b> .....	<b>83</b>
4.2.1. CULTIVO CELULAR .....	83
4.2.2. SIEMBRA PARA LOS ENSAYOS .....	85
4.2.3. ANÁLISIS DE ADHESIÓN, PROLIFERACIÓN Y MORFOLOGÍA CELULAR .....	87
4.2.3.1. DISTRIBUCIÓN DE LOS DISCOS .....	87
4.2.3.2. PROCESADO DE LOS DISCOS .....	88
4.2.3.3. ANÁLISIS DE ADHESIÓN Y PROLIFERACIÓN CELULAR.....	89
4.2.3.4. ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA CELULAR .....	92
4.2.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO .....	93
4.2.4.1. PROCESADO DE LAS MUESTRAS PARA SU OBSERVACIÓN A SEM .....	93
4.2.5. DIFERENCIACIÓN OSTEÓBLÁSTICA. CUANTIFICACIÓN DE ARNm ESPECÍFICOS.....	98
4.2.5.1. PURIFICACIÓN DEL ARN TOTAL .....	98
4.2.5.2. RETROTRANSCRIPCIÓN Y PCR CUANTITATIVA DE GENES ESPECÍFICOS .....	99
<b>4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>101</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>105</b>
<b>5.1. RUGOSIDAD SUPERFICIAL</b> .....	<b>107</b>
5.1.1. MICROSCOPIA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	107
5.1.2. MICROSCOPIA CONFOCAL.....	108
5.1.2.1. ESTUDIO DE LA RUGOSIDAD MEDIA (Ra) .....	109
<b>5.2. ANÁLISIS DE ADHESIÓN Y PROLIFERACIÓN CELULAR</b> .....	<b>113</b>
<b>5.3. ANÁLISIS MORFOLÓGICO</b> .....	<b>115</b>
5.3.1. ANÁLISIS CON MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA .....	115
5.3.1.1. ÁREA CELULAR.....	116
5.3.1.2. ÍNDICE DE REDONDEZ CELULAR .....	121
5.3.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO .....	123
<b>5.4. CUANTIFICACIÓN DE ARNm ESPECÍFICOS</b> .....	<b>128</b>
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>133</b>
6.1. DISCUSIÓN DEL MATERIAL Y LA METODOLOGÍA.....	135
6.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	145
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>163</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>168</b>
<b>9. ANEXOS</b> .....	<b>182</b>

## **ABREVIATURAS**

ADN/DNA: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico copia o complementario

ALP: fosfatasa alcalina

ARN/RNA: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BMPs: proteínas morfogenéticas óseas

BSP: sialoproteína ósea

COLT-1: colágeno tipo 1

HO•: radical hidroxilo

IGF I y II: factor de crecimiento semejante a insulina I y II

IL-1: interleuquina 1

IL-6: interleuquina 6

M-CSF: factor estimulador de colonias de macrófagos

OCN: osteocalcina

OPG: osteoprotegerina

OPN: osteopontina

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

RANK-L: ligando del receptor-activador del factor nuclear- $\kappa$ B

RANK: receptor-activador del factor nuclear- $\kappa$ B

RGD: arginina-glicina-ácido aspártico

SEM: microscopio electrónico de barrido

TGF-  $\beta$ : factor de crecimiento transformante beta

TNF-  $\alpha$ : factor de necrosis tumoral  $\alpha$

## ÍNDICE

# 1.INTRODUCCIÓN

---



La implantología dental es una rama de la Odontología que tiene como objetivo reemplazar las funciones masticatorias, fonéticas y estéticas de los dientes perdidos gracias a la colocación quirúrgica de uno o varios implantes dentales en el hueso maxilar o mandibular, y su posterior rehabilitación protésica implantorretenida.

Como ciencia moderna que es, está en constante evolución por la necesidad de conseguir tratamientos predecibles a medio y largo plazo desde el punto de vista funcional y estético.

Inicialmente, el principal éxito clínico de los implantes estaba basado en la oseointegración, definida por Branemark como la “conexión directa estructural y funcional entre hueso vivo, ordenado y la superficie del implante sometido a carga funcional” (1). Una vez conseguida cierta predictibilidad en este proceso biológico, fue el desarrollo de estructuras prostodóncicas con un correcto ajuste pasivo y una estética adecuada las que tomaron auge. En la última década han sido el manejo de los tejidos blandos y la regeneración ósea los objetivos que han copado las líneas de investigación.

No por ello se han dejado de lado los estudios centrados en conseguir mejorar y acelerar dicho proceso de oseointegración entre el hueso y el implante. A tal fin se han desarrollado líneas de investigación centradas, no sólo en buscar materiales biocompatibles, sino también en analizar cómo influye el diseño macro y microscópico de los implantes.

Hoy en día se realizan múltiples investigaciones con el objetivo final de obtener tratamientos cada vez más rápidos, predecibles, seguros y lo más mínimamente invasivos posible, respondiendo a esa demanda que exigen los pacientes.

Una vez estudiado que el mejor diseño macroscópico del implante es roscado y con forma de raíz, disponemos de una gran variedad en cuanto a longitud y diámetro del cuerpo del implante; número, configuración y paso de la rosca; tipo de conexión externa o interna y diferentes formas geométricas de las conexiones (2).

Por otro lado, consideramos que el diseño microscópico de la superficie del implante influye de manera determinante cuando éste es introducido en el lecho óseo de los maxilares y se pone en contacto íntimo con sus componentes celulares. Aceptamos que

la rugosidad y textura de esta superficie son las propiedades más importantes que van a influir en la respuesta celular del organismo (3) Y, actualmente, se puede emplear la aplicación de diferentes sustancias o moléculas sobre la superficie del titanio para conseguir mejorar y acelerar la oseointegración.

El primer eslabón en el proceso de investigación en este último campo son los estudios *in vitro*, que pueden proporcionarnos información sobre la primera respuesta de los tejidos celulares circundantes tras la colocación del implante, así como desvelar el comportamiento y proceso inicial que llevan a cabo las células osteoprogenitoras, que son las que van a guiar un correcto desarrollo de la curación de los tejidos y posterior remodelado óseo para poder conseguir una buena oseointegración. Sólo con la ayuda de los estudios de crecimiento celular *in vitro* o la experimentación animal podremos obtener datos que nos ayuden a comprender estos procesos biológicos en el ser humano.

El conocimiento de los períodos de esta respuesta celular y su influencia en el desarrollo de una interfase hueso-implante estable y temprana, nos proporcionaría la información necesaria para conocer en qué período de tiempo sería posible someter a carga los implantes mediante la colocación de la prótesis. Cuanto más reducidos sean estos períodos de tiempo, más temprana será la rehabilitación funcional y estética del paciente y en consecuencia la mejora de su calidad de vida. La carga inmediata es uno de los ejemplos a tener en cuenta actualmente.

Estas líneas de investigación incluirían también los tratamientos de regeneración ósea guiada con auto, xeno o aloinjertos para reparar volúmenes óseos en los maxilares en función de establecer mejores tratamientos implantológicos.



## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

---



## 2.1. OSEOINTEGRACIÓN

La multitud de posibilidades rehabilitadoras que nos ofrece la implantología oral ha hecho que esta rama de la odontología se haya desarrollado exponencialmente en los últimos 50 años.

Para lograr el éxito clínico, funcional y estético del tratamiento implanto-protésico es indispensable conseguir la unión firme, estable y duradera del implante al sustrato óseo que lo engloba para luego poder colocar sobre él la restauración protodóncica correspondiente, con resultados estables tanto a corto como a largo plazo.

Para que se cumpla la oseointegración del implante es necesario que se lleve a cabo un proceso de remodelación en el interior del tejido óseo para formar hueso nuevo alrededor de dicho implante.

Para entender mejor este proceso, debemos antes recordar ciertas bases de la biología y fisiología ósea.

### 2.1.1. FISIOLÓGÍA ÓSEA

El tejido óseo es un tipo de tejido conectivo formado por matriz extracelular mineralizada y células especializadas (osteoblastos, osteocitos y osteoclastos) (Fig. 1).

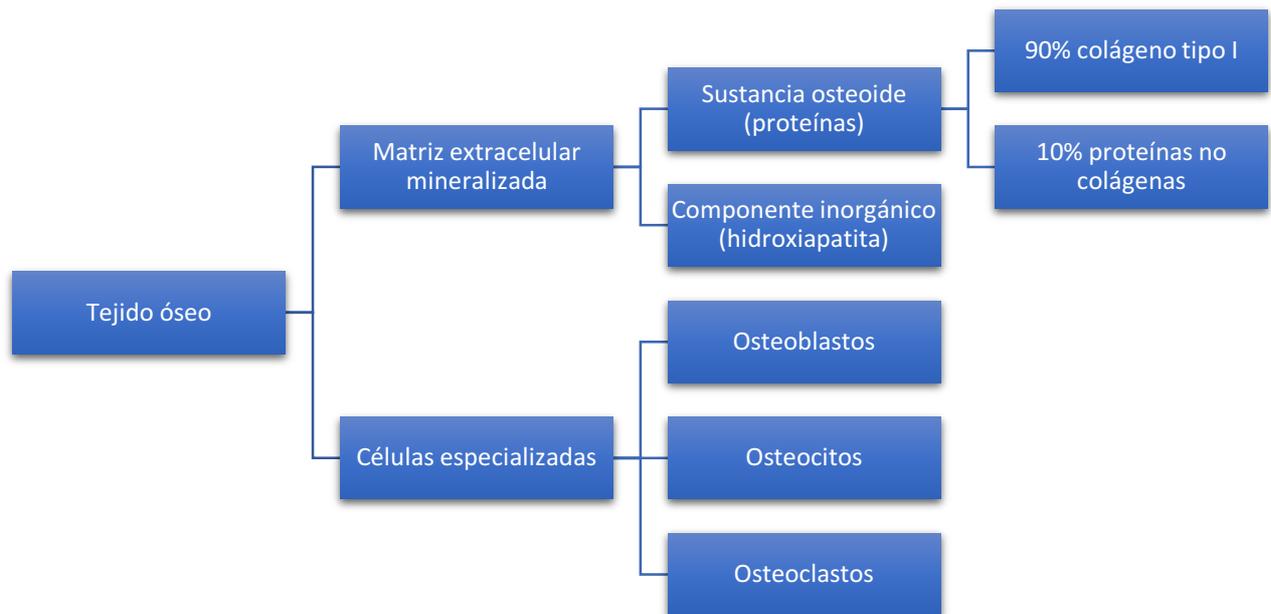


Figura 1: Composición del tejido óseo.

#### 2.1.1.1. MATRIZ EXTRACELULAR MINERALIZADA

La matriz extracelular mineralizada está formada por diversas sales inorgánicas y por sustancia osteoide (componente orgánico), producida por los osteoblastos y constituida en un 90% por fibras de colágeno tipo I (COLT-1), que representan la proteína estructural fundamental de la matriz ósea. Mientras que el 10% restante está compuesto por una serie de proteínas no colágenas de menor tamaño que modulan la mineralización y la unión de las células a la matriz, proteínas entre las que podemos destacar (Fig. 2):

##### A. Glucoproteínas

- Fosfatasa alcalina (ALP): enzima producida por osteoblastos y que libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos a un pH óptimo de 8,6 de forma que, por un lado, aumenta la concentración de iones fosfato necesarios para la mineralización de la matriz orgánica y, por otro, bloquea la acción inhibitoria que los ésteres fosfóricos tienen sobre la mineralización.

- Glucoproteínas con secuencia repetida RGD (Arginina-glicina-ácido aspártico): son la osteopontina, osteonectina, fibronectina, trombospondina y sialoproteínas óseas.

La secuencia RGD es reconocida de forma específica por las integrinas de osteoblastos y osteoclastos, permitiendo el anclaje de las células óseas a la matriz ósea y su migración sobre ella, llevando a cabo el proceso de mineralización, remodelado y reparación del hueso.

### B. Proteoglucanos

Proteínas formadas por un núcleo proteico en el que se ensamblan glucosaminoglucanos, macromoléculas sintetizadas por los osteoblastos.

En la matriz osteoide existen al menos cuatro tipos de estas moléculas:

- El condroitín sulfato, el proteoglucano de mayor tamaño y que cumple una función estructural en las zonas de formación ósea.
- El hialuronano, que interviene en la morfogénesis ósea.
- La decorina y el biglucano, dos pequeños proteoglucanos que intervienen como moduladores de factores de crecimiento.

### C. Proteínas con ácido $\gamma$ -carboxiglutámico

Aminoácido modificado que se combina con dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  entre sus dos grupos carbonilo. Distinguimos:

- La osteocalcina, sintetizada por los osteoblastos y cuyas concentraciones en plasma tienen correlación con la mineralización.
- La proteína del osteoide con ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico, que inhibe la mineralización del colágeno en tejidos no óseos.

D. Proteínas séricas retenidas en el mineral óseo

Entre ellas albúmina, inmunoglobulinas, hemoglobina,  $\alpha_1$ -antitripsina,  $\beta_2$ -microglobulina,  $\alpha_2$ -SH-glicoproteína y apolipoproteína Apo A-1 que se encuentran en el tejido óseo en cantidades significativas.

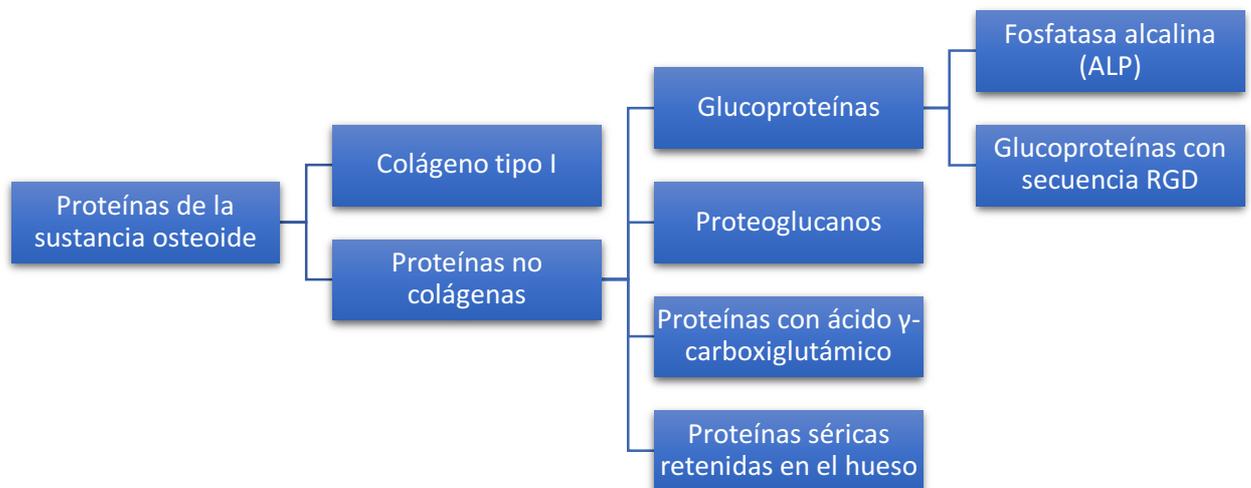


Figura 2: Principales proteínas constituyentes de la sustancia osteoide.

Por otro lado, la fase inorgánica de la matriz extracelular del tejido óseo está compuesta por sales, fundamentalmente de  $\text{Ca}^{2+}$ , entre las que destaca la hidroxiapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ , pequeños cristales minerales de carácter alcalino que se integran entre las fibras de colágeno para formar un tejido rígido, flexible y resistente (4,5).

De esta forma, el colágeno aporta el sustrato sobre el que se depositan los cristales de hidroxiapatita y, a su vez, da al tejido la suficiente tenacidad para evitar la fragilidad de la que se caracteriza el compuesto inorgánico mineralizado.

### 2.1.1.2. OSTEOLASTOS Y OSTEOCITOS

Los osteoblastos derivan de la diferenciación de células de tipo mesenquimatoso, células progenitoras multipotenciales que originan también fibroblastos, condrocitos, adipocitos y células musculares.

Los osteoblastos maduros observados al microscopio óptico son células grandes de forma cuboidea y unos 20-30  $\mu\text{m}$  de diámetro, con núcleo ovalado y citoplasma basófilo azulado (tras tinción con hematoxilina-eosina) por su abundante contenido en ARN. A microscopía electrónica muestran un notable retículo endoplasmático rugoso, característica propia de las células que desarrollan una intensa síntesis proteica (Fig. 3).

Su desarrollo está controlado, en gran medida, por dos genes:

- El gen CBF A1 (*core-binding factor A1*), específico de los progenitores del osteoblasto y que codifica el factor de transcripción del mismo nombre. Este factor regula la expresión de genes de proteínas específicas de los osteoblastos como: osteopontina, osteocalcina, colágeno tipo I, sialoproteínas óseas y el ligando del receptor-activador del factor nuclear- $\kappa\text{B}$  (RANK-L), que se describe más adelante.
- El gen *lhh* (*Indian hedgehog*), que junto con el anterior, es necesario para el desarrollo embrionario del hueso y la actividad de los osteoblastos.

Los osteoblastos son células metabólicamente activas que expresan proteínas como: osteocalcina, osteopontina, osteonectina y otros proteoglicanos y glucoproteínas, además de factores señalizadores solubles como BMPs (proteínas morfogenéticas óseas), TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante beta), IGF I y II (factor de crecimiento semejante a insulina I y II), IL-1 (interleuquina 1) y PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas).

La expresión de estos productos por parte de los osteoblastos se produce durante la formación, remodelación y reparación ósea, ya que estas células son las responsables

de la síntesis y secreción de los compuestos orgánicos e inorgánicos de la matriz extracelular del hueso.

Durante el proceso, muchos osteoblastos van quedando atrapados envueltos en matriz osteoide, convirtiéndose en osteocitos incluidos en lagunas óseas. Los osteoblastos que no quedan atrapados en el hueso por la acción osteogénica, pueden derivar a células limitantes o de revestimiento, adoptando una morfología aplanada.

En el hueso ya formado, los osteocitos incluidos en lagunas óseas de la matriz mineralizada tienen forma estrellada, con numerosas y finas prolongaciones comunicadas entre sí y que discurren por una red de canales o conductos calcóforos formados antes de que mineralice la matriz osteoide, permitiendo además su comunicación con la superficie ósea (Fig. 3 y 4).



Figura 3: Osteoblastos y osteocitos (tomada de Anatpat-Unicamp).

Precisamente, una de las funciones principales de los osteocitos, es detectar los estímulos mecánicos y las variaciones de tensión y morfología ósea producidas por las cargas que soporta la superficie, traduciéndolos en remodelado óseo.

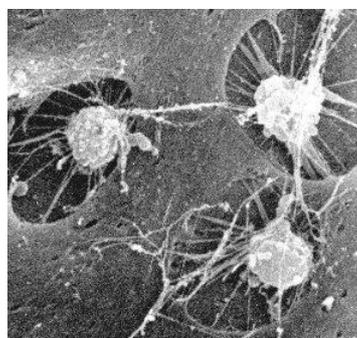


Figura 4: Microfotografía de osteocitos en laguna óseas (tomada de Genomasur).



Una etapa fundamental de este remodelado es la reabsorción ósea por parte de los osteoclastos, quedando los osteocitos fuera de las lagunas como células de revestimiento en reposo.

### 2.1.1.3. OSTEOCLASTOS

Los osteoclastos son células óseas que derivan embriológicamente de células progenitoras hematopoyéticas.

Morfológicamente, son células enormes que pueden llegar a tener entre 20 y 100  $\mu\text{m}$  de diámetro y multinucleadas, con más de 10 núcleos por célula (Fig. 5).



Figura 5: Osteoclastos (tomada de Anatpat-Unicamp).

Los osteoclastos y sus células precursoras expresan en su superficie el receptor RANK del ligando RANK-L, producido por los osteoblastos. A través de esta vía, unión receptor RANK con RANK-L, además de la unión de citoquinas como IL-1 e IL-6, TNF-  $\alpha$  (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ) o M-CSF (factor estimulador de colonias de macrófagos), los osteoclastos se activan y diferencian.

Para entender mejor la acción biológica de los osteoclastos, debemos hablar de sus principales reguladores, el sistema OPG/RANK/RANK-L (Fig. 6).

El receptor RANK (receptor activador del factor nuclear  $\text{kB}$ ) es una proteína presente en la membrana de preosteoclastos y osteoclastos maduros, cuya activación induce al osteoclasto a reabsorber hueso y a no morir por apoptosis (muerte celular programada).

El ligando encargado de activar el receptor RANK es RANK-L, una molécula anclada a la membrana de los osteoblastos cuya principal función es, mediante la unión a RANK, estimular la diferenciación y activación de los osteoclastos e inhibir su apoptosis.

Existe una tercera molécula en juego, la osteoprotegerina (OPG) o factor de inhibición de la osteoclastogénesis. La OPG se expresa en diferentes tejidos humanos además del hueso, y su papel en éste es inhibir la maduración y activación de los osteoclastos al unirse al ligando RANK-L de los osteoblastos e impedir la unión de RANK.

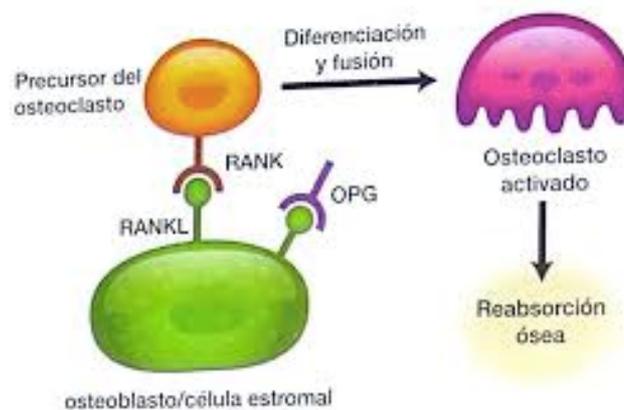


Figura 6: Sistema OPG/RANK/RANK-L (tomado de IQB. MedCiclopedia).

La reabsorción ósea es un complejo proceso que incluye la disolución de la fase mineral inorgánica de la matriz ósea y la posterior degradación de las proteínas de la fase orgánica.

Tras la diferenciación y activación de los osteoclastos, éstos se adhieren a la superficie ósea mediante integrinas que reconocen de forma específica proteínas de la matriz osteoide. La desmineralización se produce mediante la acidificación (se alcanza un pH de 4,4) del microespacio creado en la interfase superficie ósea-osteoclasto mediante el intercambio de iones y la actividad enzimática, produciendo la disolución del componente mineral y la posterior degradación de las proteínas de la matriz orgánica gracias a proteasas como la catepsina K, secretada por osteoclastos, y la colagenasa, secretada por osteoblastos (6,7) (Fig.7).

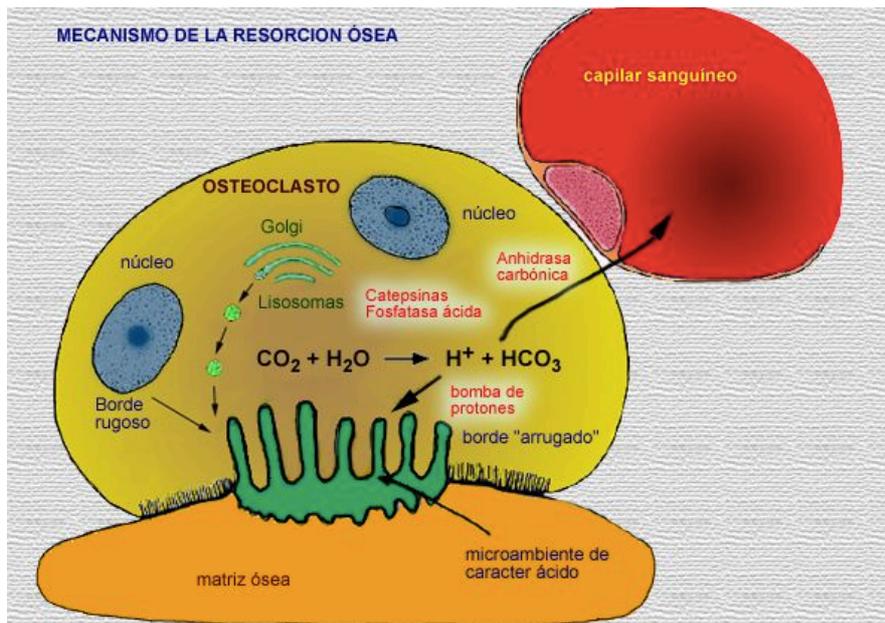


Fig. 7: Esquema de la reabsorción ósea (tomada de IQB. MedCiclopedia).

### 2.1.2. REMODELADO ÓSEO Y PROCESO DE OSEOINTEGRACIÓN

El remodelado óseo se produce a lo largo de toda la vida, supone un continuo proceso de reabsorción y formación en el que las zonas de hueso que son destruidas son sustituidas por tejido óseo recién formado. Este proceso podemos dividirlo en 3 fases: reabsorción, inversión y formación.

Cuando los precursores de los osteoclastos son atraídos a un lugar determinado del hueso, se inicia la reabsorción principalmente por la acción de RANK-L, pero también por citoquinas como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  o M-CSF, que hacen que los preosteoclastos se diferencien a osteoclastos. Mediante la disolución de la fase mineral de la matriz osteoide por la acidificación del medio y la degradación de las proteínas de la fase orgánica, comienzan a reabsorber el hueso, de forma que durante aproximadamente dos semanas, labran una pequeña cavidad en él.

Al finalizar esta fase de reabsorción, la cavidad labrada por los osteoclastos se tapiza por células mononucleares, que terminan de degradar el colágeno y depositan proteoglicanos, lo que se conoce como fase de inversión, reposo o reversión.

Tras ello, comienza la fase de formación, en la que se reclutan precursores de osteoblastos que proliferan y se diferencian disponiéndose en monocapa sobre la zona y comenzando a sintetizar osteoide que va rellenando la cavidad. Esta etapa se prolonga entre 2 y 4 meses. La mineralización de las láminas de osteoide se va produciendo poco a poco, conforme se depositan las sucesivas capas.

Como resultado de todo el proceso de remodelación, se obtiene un pequeño volumen de hueso nuevo que ha sustituido al hueso viejo (Fig. 8).

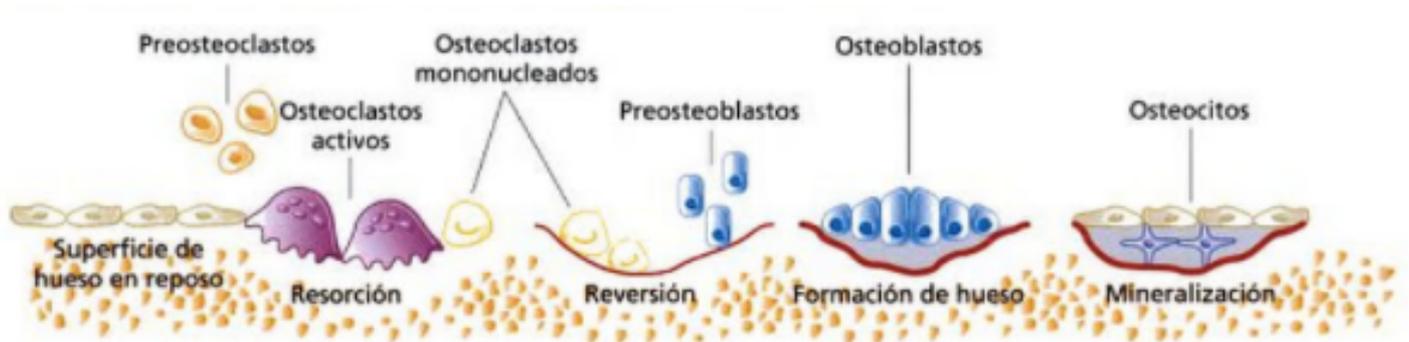


Figura 8: Esquema del remodelado óseo (tomada de McCauley L.K y Nohutcu R.M (8)).

Como hemos dicho anteriormente, para que se pueda conseguir la oseointegración, debe llevarse a cabo un proceso de remodelación del tejido óseo circundante al implante para formar hueso nuevo a su alrededor.

Los osteoclastos son los responsables de reabsorber la zona necrótica producida por el fresado óseo durante la preparación del lecho receptor del implante. Junto a ellos intervienen, como hemos visto, otras células que llegan a través del aporte vascular,

como los osteoblastos, cuya tarea es crear hueso nuevo capaz de interactuar con la capa de óxido de titanio de la superficie del implante para integrarlo biológicamente.

Posteriormente, los osteoblastos se diferencian a osteocitos, que quedan incluidos en la matriz ósea mineralizada.

Si analizamos el proceso de oseointegración desde un punto de vista ultraestructural, debemos hablar también de la biointegración, que se define como la unión bioquímica directa entre hueso vivo y la superficie del implante, independientemente de cualquier mecanismo mecánico de interunión. De este modo, el espacio existente entre el tejido óseo mineralizado y la capa de óxido de titanio, aparece lleno de una matriz formada por proteoglicanos y glucoproteínas (9).

Una red de colágeno rodea los osteocitos insertándose en la capa de glucoproteínas y fusionándose con la capa superficial de óxido de titanio.

Las trabéculas óseas crecen acercándose al implante y a través de los vasos sanguíneos se aporta nutrición y elementos celulares para la remodelación. De esta forma, aumenta el número de fibroblastos y osteoblastos que, al acercarse al implante, se unen también a la capa de óxido de titanio y forman sustancia fundamental que llena los espacios trabeculares.

Por tanto, la interfase implante-tejido oral es una zona altamente dinámica sometida a una intensa actividad remodeladora por parte de las células óseas y la matriz extracelular (10). Para que se lleve a cabo esta actividad, es vital una buena vascularización de la zona del lecho del implante, por lo que el fresado óseo y la inserción del implante deben ser lo menos traumáticos posible.

Hoy en día los nuevos diseños y tratamientos de superficie de los implantes y la continua investigación e innovación en torno a ello, están permitiendo en algunos casos reducir los tiempos de oseointegración y carga de los implantes, que de forma general, se establecen en 2-3 meses en mandíbula y de 4 a 6 meses en maxilar superior,

permitiendo al paciente poder disfrutar de la restauración de la función perdida en el menor tiempo posible.

## **2.2. IMPLANTOLOGÍA**

### **2.2.1. EVOLUCIÓN HISTÓRICA**

El hombre, desde sus inicios, se preocupó de reponer los dientes perdidos con diferentes soluciones rehabilitadoras. Los materiales, instrumentos y procedimientos quirúrgicos y protésicos necesarios han ido evolucionando ante la constante necesidad de lograr rehabilitaciones más eficaces y satisfactorias para los pacientes.

La primera sustitución artificial de un diente perdido de la que se tiene constancia es una implantación necrópsica realizada durante el Neolítico (hace unos 9000 años) en Argelia. El cráneo encontrado era de una mujer joven que presentaba un fragmento de falange de un dedo introducido en el alveolo del segundo premolar superior derecho.

Los restos antropológicos más antiguos de implantes dentales colocados *in vivo* tienen su origen en la cultura maya. Corresponden a una mandíbula que data del año 400 y que presenta tres fragmentos de concha introducidos en los alveolos de los incisivos. Los estudios radiológicos determinaron la formación de hueso compacto alrededor de los “implantes”, lo que hace suponer que fueron implantados en vida.

Existen antecedentes similares en el antiguo Egipto, donde se trasplantaban dientes humanos y/o de animales o se implantaban piedras y metales preciosos (11–13).

Siguiendo la línea cronológica, Abulcasis, médico y cirujano andaluz islámico, narra en sus escritos del siglo X cómo cuando se ha perdido uno o dos dientes, pueden reponerse en los alveolos uniéndolos con hilos de oro, describiendo así los primeros reimplantes dentarios.

Esta técnica fue desarrollándose durante varios siglos. Los nobles y clases pudientes recibían trasplantes dentarios de donantes plebeyos, sirvientes y soldados.

Pero estas técnicas se fueron abandonando durante el siglo XIX ante los continuos fracasos y problemas morales (extraer un diente a un pobre para implantarlo en un rico) e higiénicos (posible transmisión de enfermedades), dejando paso a los primeros implantes metálicos intraalveolares durante el siglo XIX y principios del XX con materiales como platino, oro, plomo, plata o iridio en sus inicios (14).

Durante el siglo XX y paralelamente a otras investigaciones, se utilizaron diferentes sistemas de implantes que podemos clasificar según su modalidad de colocación y diseño en:

-Implantes subperiósticos o yuxtaóseos: se colocaban directamente sobre la cresta alveolar, lo que provocaba muchos problemas de infecciones y fracasos debido a que los implantes no penetraban en el hueso, sino que simplemente estaban cubiertos por encía. Actualmente están totalmente en desuso (Fig. 9).

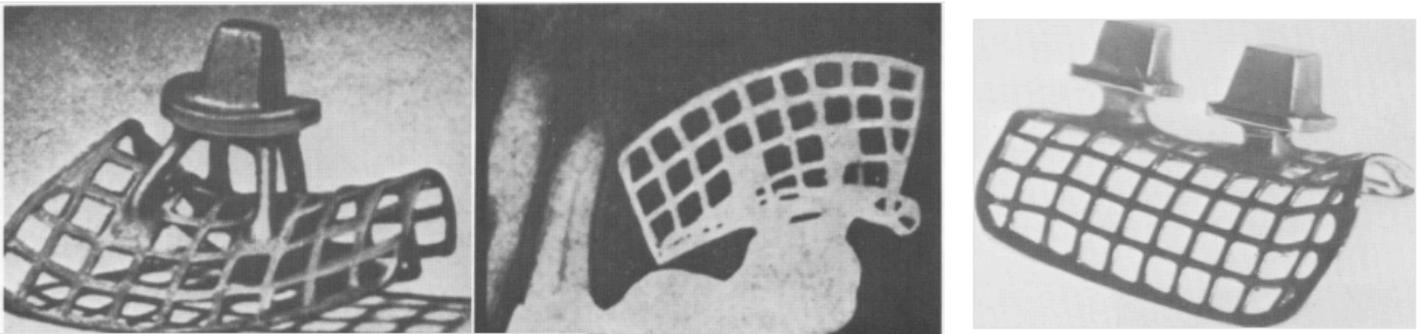


Figura 9: Implantes subperiósticos o yuxtaóseos (tomada de Linkow LI (15)).

-Implantes intraóseos: colocados dentro del hueso alveolar. Su diseño ha ido evolucionando hasta los implantes actuales, con forma de raíz y roscados, similares a un tornillo, bien cilíndricos o bien cónicos, con diferentes diseños, tamaños y características macro y microscópicas, siendo los únicos aceptados en la actualidad.

Durante esta evolución se utilizaron diferentes diseños que fueron entrando en desuso poco a poco, como por ejemplo: los implantes en forma de canastilla (Fig. 10), en espiral (Fig. 11), en agujas (Fig. 12) o en láminas (Fig. 13) (15).

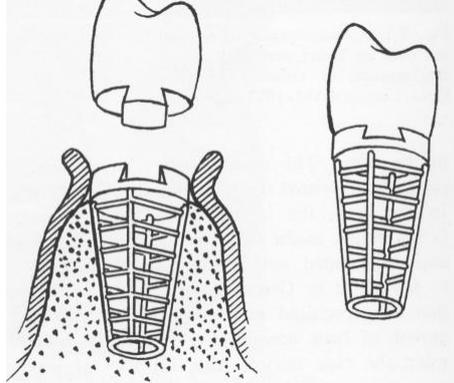


Figura 10: Implantes en forma de canastilla (tomada de Linkow LI (15)).

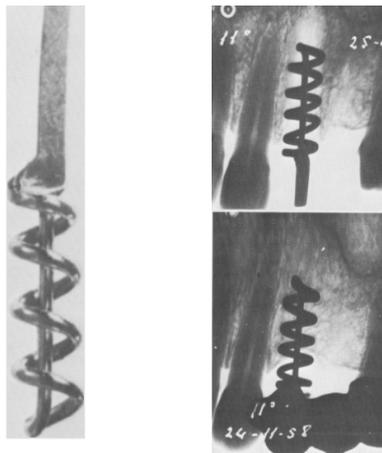


Figura 11: Implantes en forma de espiral (tomada de Linkow LI (15)).

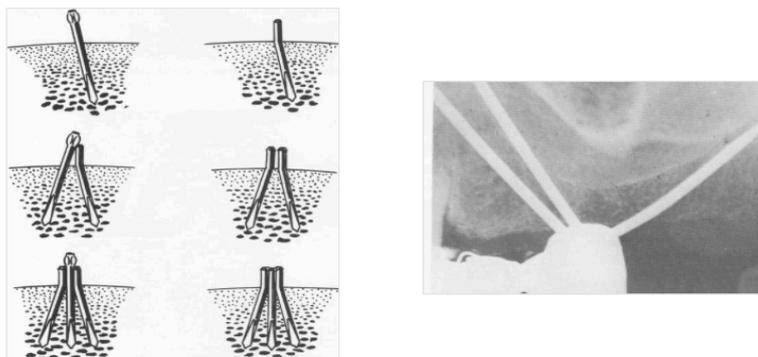


Figura 12: Implantes en forma de agujas (tomada de Linkow LI (15)).



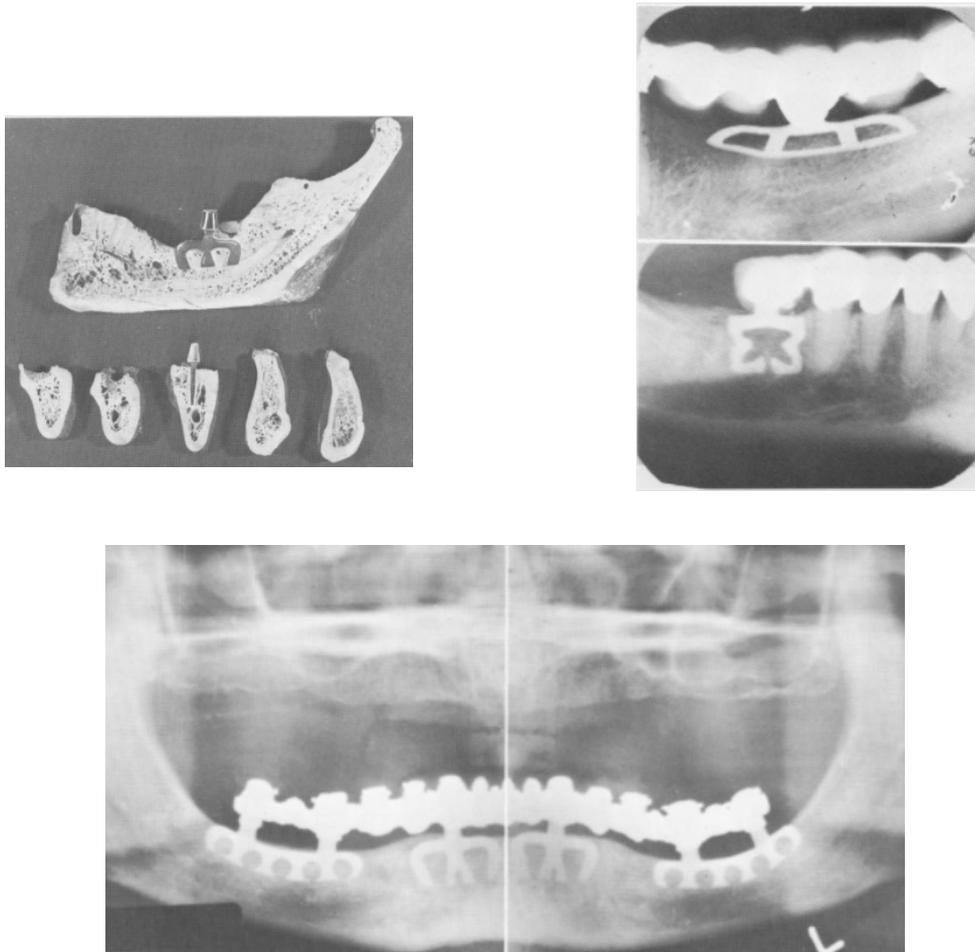


Figura 13: Implantes en lámina. A) corte de cresta ósea. B) radiografías periapicales. C) ortopantomografía (tomadas de Linkow LI (15)).

Greenfield en 1910, introdujo la importancia de normas sanitarias de limpieza y esterilidad y conceptos tan innovadores y actuales como la relevancia de la íntima asociación entre hueso e implante, la curación del tejido bucal y la inmovilidad del implante, aconsejando un periodo de curación de 3 meses sin ningún tipo de sobrecarga. Sin embargo, el problema estaba en encontrar el material idóneo (16–18).

No fue hasta 1952, cuando en Suecia el Dr. Branemark, considerado el padre de la implantología actual, descubrió de manera fortuita ese material idóneo tan ansiado: el titanio.

Branemark y su equipo estaban estudiando la anatomía y fisiopatología de las lesiones del tejido óseo, la microcirculación ósea y los problemas de cicatrización de las heridas. Con el objetivo de evaluar los cambios tisulares bajo condiciones experimentales controladas, utilizaron la técnica de la microscopía *in vivo*, consistente en introducir una cámara en el organismo para la observación del mismo. En este caso, el dispositivo óptico estaba encerrado en tubos de titanio mecanizado y fue colocado en tibias de conejo. De esta forma se podían observar los cambios circulatorios y celulares en el tejido de un organismo vivo (16–18).

Pero en el momento de su remoción pasado un tiempo, tras la cicatrización y la remodelación del tejido óseo, descubrieron que el hueso se había unido firme e íntimamente al titanio, y era imposible extraer los dispositivos ópticos envueltos en tubos de titanio sin dañar el hueso, ya que éste se había unido firmemente hasta tal punto que se rompía antes la unión hueso-hueso, produciendo una fractura, que la unión hueso-titanio. Este hecho supuso un hallazgo sorprendente, ya que hasta el momento, no se creía posible que algún metal pudiese integrarse directamente en el hueso (19,20).

Gracias a este hecho fortuito, Branemark desarrolló el concepto de “oseointegración” que definió, como hemos citado anteriormente, como “la conexión directa estructural y funcional entre hueso vivo, ordenado, y la superficie de un implante sometido a carga funcional” (1).

Branemark resaltó entonces la necesidad de comprender los aspectos biológicos de los procesos de cicatrización y oseointegración, cambiando la dirección de su trabajo y rodeándose de expertos en física, química y biología además de ingenieros y expertos en materiales, que bajo su liderazgo sentaron las bases de la implantología actual desarrollando, no sólo los materiales idóneos, sino estudiando el diseño macroscópico y microscópico más propicio y las técnicas más adecuadas para la inserción y mantenimiento del implante.

### 2.2.2. FACTORES QUE AFECTAN A LA OSEOINTEGRACIÓN

Siguiendo la filosofía del Dr. Branemark, en 1981 Albrektsson y cols. definieron los factores esenciales que afectan a la oseointegración (21).

1. Material del implante.
2. Diseño macroscópico y dimensional del implante.
3. Calidad superficial del implante (diseño microscópico).
4. Estado del hueso receptor.
5. Técnica quirúrgica.
6. Condiciones de carga del implante.

El material y diseño macro y microscópico del implante son factores en los que la ingeniería tiene un papel significativo, por lo que, como bien apuntó Branemark en el nuevo rumbo de sus investigaciones, la evolución en este sentido depende de la formación de un buen y completo equipo multidisciplinar. De estos factores hablaremos en profundidad más adelante.

El estado del hueso receptor, la técnica quirúrgica y las condiciones de carga del implante, son factores propiamente clínicos que dependen del odontólogo y del propio paciente. Dentro de los factores clínicos, podemos comentar que:

- A. El estado del hueso receptor es, probablemente, el único factor en el que los ingenieros no pueden intervenir ni directa ni indirectamente, ya que es un factor clínico que el odontólogo u estomatólogo debe estudiar cuidadosamente antes de la intervención quirúrgica para la colocación del implante. Un hueso en malas condiciones, por ejemplo por infección local en la zona del implante tras una extracción, puede derivar en el fracaso del tratamiento.
- B. En cuanto a la técnica quirúrgica, los implantes se deben insertar en el hueso de manera que se provoque el menor trauma sobre los tejidos, para que puedan curar y remodelarse adecuadamente, evitando además cualquier riesgo de infección

periimplantaria con un ambiente quirúrgico lo más aséptico posible. Principalmente se debe tener en cuenta que el hueso es sensible al calor, por lo que para evitar el sobrecalentamiento producido por el fresado óseo, se debe irrigar con suero fisiológico abundante como refrigerante y utilizar una serie progresiva de fresas con determinadas formas y velocidades de rotación. Y, por otro lado, el lecho creado debe ser ligeramente menor que el diámetro del implante para, en primer lugar, lograr una estabilidad primaria del implante suficiente, y en segundo lugar facilitar al máximo la colonización celular de la superficie del implante y ayudar a que se produzcan los mínimos micromovimientos posibles durante todo el proceso que debe llevarse a cabo para alcanzar la oseointegración.

C. Las condiciones de carga del implante se deben controlar no sólo para conseguir una adecuada oseointegración, sino para mantenerla a largo plazo.

Tras la formación de nuevo hueso ordenado alrededor del implante, si son adecuadas la magnitud, dirección y frecuencia de la carga recibida, se favorecerá la remodelación ósea necesaria para el mantenimiento de esta oseointegración, de forma que se llegue a un estado estable con una distribución favorable de las cargas funcionales en el hueso.

### **2.3. MATERIALES PARA LA FABRICACIÓN DE IMPLANTES DENTALES**

La mejora de la oseointegración a corto y largo plazo depende de múltiples factores que debemos tener en cuenta.

En el contexto de la biomedicina, el titanio y sus aleaciones, juntos con los aceros inoxidable y las aleaciones de cromo-cobalto, han sido los metales históricamente más utilizados para la fabricación de implantes dentales, además de otras aplicaciones biomédicas. Pero también se han utilizado otros materiales, como las cerámicas o la zircona.

### 2.3.1. PROPIEDADES QUE DEBE CUMPLIR EL MATERIAL

- A. Biocompatibilidad, ya sea un material bioinerte o bioactivo.
- B. Buenas propiedades mecánicas para soportar las fuerzas de la masticación y cumplir correctamente la función de reposición de los dientes.
- C. Resistencia a la corrosión, ya que los fluidos orales son altamente corrosivos.
- D. Radiopacidad, para poder controlar su relación con el hueso y el medio vivo circundante.
- E. Ligereza.
- F. Esterilizable.
- G. Buena disponibilidad y fácil procesado.
- H. Económico.

#### 2.3.1.1. BIOCOMPATIBILIDAD

En un sentido amplio, la RAE define “biomaterial” como: “material tolerado por el organismo, utilizado para prótesis y otros fines”, es decir, un material natural o sintético diseñado para actuar con sistemas biológicos con el objetivo de tratar, aumentar o reemplazar algún tejido, órgano o función del cuerpo. Dentro de estas definiciones entrarían, por ejemplo, los biomateriales utilizados para válvulas cardíacas, lentes de contacto, prótesis de cadera, etc., además de los implantes dentales.

Según el origen o naturaleza del biomaterial, podemos clasificarlos en:

- A. Biomateriales de origen biológico, como: colágeno, hidroxiapatita o quitina.
- B. Biomateriales de origen artificial, como: cerámicas, metales, polímeros o materiales compuestos por alguno de los anteriores.

Los biomateriales poliméricos son utilizados en biomedicina, por ejemplo, para fabricar catéteres, prótesis cardíacas valvulares, cementos óseos o lentes de contacto.

Los biomateriales metálicos se utilizan cuando es imprescindible que el material tenga propiedades físicas adecuadas para soportar carga, como ocurre en las prótesis de

cadera o los implantes dentales. Estas propiedades físicas adecuadas las poseen por ejemplo las aleaciones de cobalto, cromo o titanio.

Mientras que las biocerámicas, pueden utilizarse en la fabricación de implantes que no soporten cargas, como en el caso de prótesis en cirugías de oído medio, o como recubrimiento sobre otros biomateriales que si tengan capacidad para soportar cargas, como los metales. La aplicación como recubrimiento en tratamientos de superficie de otros biomateriales, se lleva a cabo también con biomateriales de origen biológico, como los citados anteriormente (22,23).

Otra forma de clasificar los biomateriales es según el carácter de la biocompatibilidad que manifiestan, distinguiendo entonces materiales bioinertes o bioactivos.

A grandes rasgos, los biomateriales bioinertes son materiales no tóxicos y biológicamente inactivos, mientras que los bioactivos son biomateriales no tóxicos pero sí biológicamente activos.

Los biomateriales metálicos y no metálicos se han estudiado en el campo de la rehabilitación ortopédica desde comienzos del siglo XX.

En los años 60 del siglo pasado, se estudió ampliamente la aplicación de cerámicas de alta pureza de óxido de aluminio, carbono, compuestos de silicio-carbono y aleaciones con un grado intersticial extrabajo (ELI). Todos ellos materiales biocompatibles y bioinertes, químicamente estables dentro de organismos vivos.

A partir de la década de los 80, las investigaciones dieron paso al estudio de sustratos bioactivos que pudiesen influir positivamente en la respuesta del organismo vivo al biomaterial (2).

Todas estas investigaciones han sido la base a los estudios actuales, con el objetivo de obtener un biomaterial ideal con modificaciones superficiales que influyan conveniente y directamente en el comportamiento a corto y largo plazo de la interrelación implante-tejidos circundantes.

### 2.3.1.2. PROPIEDADES MECÁNICAS

Las fuerzas ejercidas sobre la prótesis implantorretenida y, en consecuencia, sobre el propio implante durante el desarrollo de las funciones que debe cumplir el complejo implanto-prótesis, incluyen componentes de tracción (someter al material a dos fuerzas opuestas y que en consecuencia tienden a alargarlo o estirarlo), compresión (someter al material a dos fuerzas con la misma dirección y sentido contrario, y que en consecuencia tienden a acortarlo, deformarlo o disminuir su volumen) y cizallamiento (deformación lateral por el efecto de una fuerza externa tangencial a la superficie sobre la que actúa).

La fatiga es el proceso de cambio estructural permanente, progresivo y localizado que ocurre en un material sujeto a tensiones variables en algún punto o puntos y que produce deformaciones, grietas o la fractura completa tras un número suficiente de fluctuaciones. La resistencia a la fatiga se puede definir como el nivel de tensión que produce la rotura después de un determinado número de ciclos de carga (24).

Todos los fracasos consecuencia de la fatiga del material, se pueden explicar por las leyes mecánicas que correlacionan las dimensiones y forma del material, en este caso del implante, con las propiedades mecánicas del mismo (25,26).

A mayor carga aplicada (en valor absoluto y por la repetición de ciclos de carga), mayor esfuerzo mecánico y, por tanto, mayor posibilidad de exceder el límite de resistencia a la fatiga del material (25–27).

Principalmente, debemos tener en cuenta la resistencia a la tracción (definida anteriormente), la ductilidad y el módulo de elasticidad del material.

La ductilidad es la capacidad que presentan algunos materiales, como los metales y sus aleaciones, de deformarse plásticamente (de forma permanente e irreversible) sin romperse al ser sometidos a una fuerza, permitiendo obtener alambres o hilos finos. Los materiales no dúctiles se califican como frágiles. La ductilidad es importante porque se refiere al potencial de deformación permanente de los pilares protésicos o de los implantes en las zonas de grandes fuerzas de tensión, principalmente en la conexión del implante (2).

Los metales poseen alta resistencia a la tracción y ductilidad, mientras que, por ejemplo las cerámicas y carbonos, son materiales frágiles con ductilidad nula o casi nula.

Los organismos que rigen los estándares de consenso para los metales, como la ASTM (*American Society for Testing and Materials*), la ISO (*International Organization for Standardization*) y la ADA (*American Dental Association*), marcan un mínimo de ductibilidad del material del 8% para minimizar las fracturas por fragilidad (26,28–31).

El módulo de elasticidad de un material se define como la relación entre la fatiga y la correspondiente deformación en un material sometido a un esfuerzo que está por debajo del límite de elasticidad del material. Indica la rigidez, cuanto más rígido es un material mayor es su módulo de elasticidad.

El módulo de elasticidad del implante es inversamente proporcional a la fuerza transmitida a través de la interfase hueso-implante. Es decir, cuanto mayor es el módulo de elasticidad del material, menor es la transmisión de la fuerza a la interfase hueso-implante y, por tanto, al hueso.

Lo ideal es que el módulo de elasticidad del material sea lo más similar posible al del hueso (isoelasticidad) para que se produzca una distribución uniforme de la tensión y la interfase hueso-implante resista todas las fuerzas, especialmente de cizallamiento.

### 2.3.1.3. RESISTENCIA A LA CORROSIÓN

La ASTM (norma G15), define la corrosión como la reacción química o electroquímica entre un material, normalmente un metal, y su medio, que produce un deterioro del material y sus propiedades.

En rasgos generales, según el mecanismo de ataque podemos clasificar la corrosión en:

-Oxidación directa o corrosión seca: proceso de corrosión en ausencia de electrolito y a altas temperaturas. Se da en metales expuestos a gases y vapores calientes.



-Corrosión electroquímica o húmeda: proceso de corrosión que se da cuando el metal se encuentra en contacto con un medio de conductividad electrolítica, como puede ser el agua, soluciones salinas o la simple humedad de la atmósfera.

En concreto, los procesos de corrosión en la cavidad oral se producen por corrosión electroquímica o húmeda. La resistencia a la corrosión supone un factor de gran importancia dada la gran capacidad corrosiva de los fluidos orales, que actúan como electrolitos, en especial la saliva, que contiene gran cantidad de iones (32).

Hay que tener en cuenta que los implantes, aunque intraóseos, también se comunican con la cavidad oral, donde las concentraciones de oxígeno y electrolitos son diferentes de las de los fluidos de los tejidos, además de que el pH varía considerablemente por el metabolismo bacteriano dentro de la cavidad oral (33–37).

Electroquímicamente, la corrosión es la pérdida de electrones por parte de los átomos metálicos, alterando la estabilidad y la duración de la estructura.

En el medio oral, principalmente debemos tener en cuenta la corrosión galvánica, que se produce cuando dos metales distintos entran en contacto dentro de un electrolito, produciéndose la aparición de corrientes entre los dos, como puede ocurrir en la relación del implante y la supraestructura protésica que soporta.

Este fenómeno depende de la pasividad de las capas de óxidos que se forman sobre el metal, es decir, la capacidad que otorga esta capa de óxidos al metal para permanecer prácticamente inerte en un medio en el que, de otro modo, se comportaría como un metal activo y por tanto cedería sustancias al medio a través de mecanismos de corrosión electroquímica (32).

Esta capa de óxidos tiene sólo nanómetros de espesor y está compuesta, generalmente, por óxidos o hidróxidos de los elementos metálicos con mayor afinidad por el oxígeno, siendo los principales metales reactivos el titanio, el niobio, el circonio, el tantalio y las aleaciones de éstos. Las propiedades químicas de esta capa de óxidos juegan un importante papel en la biocompatibilidad y capacidad de oseointegración de los implantes, ya que limita la interfase entre el medio biológico y la estructura metálica, determinando la respuesta del organismo y la resistencia a la corrosión del implante en el medio oral (26).

### 2.3.2. BIOMATERIALES PARA IMPLANTES DENTALES

Teniendo en cuenta las propiedades que debe cumplir el material utilizado para la fabricación de implantes dentales, varias organizaciones internacionales como la ASTM o la ISO, han establecido las bases para la estandarización de dichos materiales, indicando que el titanio y sus aleaciones son el material de primera elección en la actualidad, aunque se han utilizado también aleaciones de cromo, cobalto, aceros austeníticos, niobio o aleaciones de circonio, además de cerámicas, carbonos y materiales poliméricos.

#### 2.3.2.1. ALEACIONES DE Cr-Co

El primer uso biomédico de las aleaciones de cromo-cobalto fueron los implantes dentales. Este hecho se dio gracias a su resistencia a la degradación en el medio oral. Pero actualmente se utilizan principalmente en cirugía ortopédica por sus propiedades mecánicas, quedando su uso en implantología relegado a la fabricación de prótesis sobre implantes. En cuanto a su uso para supraestructuras de prótesis sobre implantes junto con implantes de titanio, no se ha observado corrosión galvánica significativa entre ellos (32,38).

#### 2.3.2.2. ALEACIONES DE Ni-Cr-Ti

El uso de las aleaciones de níquel-cromo-titanio como materia prima para los implantes dentales se vio cuestionado por la susceptibilidad de las aleaciones de níquel a la corrosión, además de su dificultad para restablecer la capa pasiva de óxidos. Debido a su pobre resistencia a la corrosión, se produce la liberación de productos de corrosión, principalmente níquel, pudiéndose producir reacciones de hipersensibilidad y otras reacciones tisulares que pueden llevar al fracaso del implante (39).

#### 2.3.2.3. CARBONO

Los implantes de carbono vítreo que comenzaron a usarse en la década de 1960, tenían un módulo de elasticidad muy similar a la dentina y al hueso pero, por otro lado, aunque la rigidez era altamente adecuada, la ductibilidad y la resistencia a la tracción y la compresión eran muy deficientes. En consecuencia, el cuerpo de carbono del implante era incapaz de soportar las cargas fisiológicas en la cavidad oral, por lo que dejaron de fabricarse (40).

#### 2.3.2.4. CERÁMICAS

En contraposición, los implantes cerámicos que se usaron un tiempo durante la década de 1960, tenían una buena resistencia máxima a la compresión pero una rigidez inadecuada en comparación con el hueso. La fragilidad natural de la cerámica y su consecuente susceptibilidad a fallo en tensión y cizallamiento, requería diseños geométricos del implante la mayoría de veces no compatibles con las limitaciones anatómicas del hueso disponible. El módulo de elasticidad de los implantes cerámicos era aproximadamente treinta y tres veces mayor que el del hueso cortical, lo que producía escasez de estrés en la interfase hueso-implante. Esto resultaba inadecuado ya que el implante, al ser muy rígido, absorbía una cantidad desproporcionada de carga y el hueso en la interfase se volvía atrófico por desuso al no estimarse la remodelación ósea por carga funcional (41).

#### 2.3.2.5. MATERIALES POLIMÉRICOS

Los materiales poliméricos comenzaron a usarse para la fabricación de implantes dentales durante los años 30 del pasado siglo. Pero debido a su composición, los cambios de temperatura o ambiente afectan a sus propiedades físicas. Además, presentan pobres propiedades mecánicas. En comparación con el hueso, la mayor parte de los polímeros tienen un módulo de elasticidad inferior, con magnitudes cercanas a los tejidos blandos.

Por estas características, los polímeros se han dirigido a su utilización como recubrimiento en tratamientos de superficie de implantes y otras aplicaciones dentales como la fabricación de membranas para regeneración tisular guiada, pero no para su uso como materia prima para implantes dentales (2).

### 2.3.2.6 CIRCONA

El dióxido de circonio o circona ( $ZrO_2$ ) es un material cerámico biocompatible y estético, ya que es de color blanco. Los implantes de  $ZrO_2$  son bioinertes, radiopacos y presentan una alta resistencia a la corrosión, a la flexión y a la fractura, aunque un módulo de elasticidad superior (200 GPa) al del titanio (42,43).

Actualmente, hay pocas casas comerciales que comercialicen implantes de circona, y todos ellos son monobloques implante-pilar (Fig. 14), lo que dificulta las opciones de rehabilitación protésica posterior (dando sólo opción a prótesis cementadas) y prácticamente obliga a realizar una cirugía guiada para conseguir una paralelización y posición del implante precisas.

Además, se recomiendan únicamente para implantes unitarios o intermedios, nunca para extremos libres ni arcadas edéntulas. Por el momento no se considera a la circona como material sustitutorio del titanio, sino sólo como un material que poco a poco puede ir abriéndose paso en el mercado.



Figura 14: Implante de circona (tomada de Bredent®).

### 2.3.2.7. TITANIO

El titanio es un elemento químico de símbolo Ti y número atómico 22, perteneciente al grupo de los metales de transición. Es el cuarto metal más abundante en la superficie terrestre y posee puntos de fusión y ebullición altos (1668,85 °C y 3287,85 °C, respectivamente), que lo hacen por ejemplo adecuado para uso en estructuras espaciales. Es un metal ligero (4,5 g/cm<sup>3</sup>), tiene una densidad de un 45% menos que el acero (7,8 g/cm<sup>3</sup>) y sólo un 60% más que el aluminio (2,7 g/cm<sup>3</sup>).

La excelente biocompatibilidad del titanio y sus aleaciones está bien documentada. El titanio, como material bioinerte, tiene escasa o nula influencia en los tejidos vivos que lo rodean, no cediendo ninguna sustancia en cantidades perjudiciales, por lo que no provoca reacciones no deseadas en el medio biológico.

La mayoría de autores coinciden en explicar el alto componente bioinerte y la gran biocompatibilidad del titanio, principalmente por su gran resistencia a la corrosión, lo que permite además una favorable oseointegración. Esto se fundamenta en que cuanto menor sea la cantidad de residuos o sustancias cedidas al medio biológico por parte del biomaterial, mayor será el contacto entre el tejido circundante y dicho biomaterial, y mejor la respuesta de estos tejidos a la presencia del implante (44).

Además, se ha estudiado que el módulo de elasticidad del titanio (110 GPa) es incluso la mitad o menos del de otros metales como el acero inoxidable de uso quirúrgico o las aleaciones de cromo-cobalto. Al tener un módulo de elasticidad más próximo al hueso (20 GPa), disminuye el fenómeno de relajación de tensiones en el tejido óseo circundante, favoreciendo así la remodelación ósea necesaria para alcanzar y mantener una correcta oseointegración (45).

Por otro lado, el titanio es muy reactivo a altas temperaturas con el oxígeno, el nitrógeno y el carbono. Sin embargo, a intervalos de temperatura corporal (alrededor de los 36 °C), es excepcionalmente resistente al ataque por ácidos, bases, compuestos halogenados, agua salada, gases corrosivos y medios orgánicos, ya que se crea la capa superficial de óxidos mencionada anteriormente. Al contrario que el titanio, el dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) es un compuesto estable que le aporta al titanio esa gran resistencia

química y a la corrosión. En contacto con el medio biológico, el titanio con su capa de  $TiO_2$  de entre 3-10 nm (46) es tan resistente a la corrosión como el niobio o el tantalio y significativamente más que el acero inoxidable o las aleaciones de cromo-cobalto (44).

Considerando las características y propiedades comentadas anteriormente, queda justificado el uso mayoritario y ampliamente extendido del titanio como principal biomaterial para la fabricación de implantes dentales, siendo actualmente el material de elección por excelencia al cumplir de forma adecuada, a diferencia del resto de materiales, todos los requisitos y cualidades que se requieren para este uso concreto.

#### 2.3.2.7.1. GRADOS DE TITANIO Y ALEACIÓN DE TITANIO

Según las normas internacionales (ISO 5832-2 y ASTM F67-00) hay cuatro grados de titanio CP (comercialmente puro) usados en odontología (grados de 1 a 4) y un grado de aleación de titanio (grado 5).

El titanio comercialmente puro se compone de un mínimo de 98,9% de titanio, siendo el resto elementos intersticiales como el oxígeno (O), el nitrógeno (N), el carbono (C), el hierro (Fe) o el hidrógeno (H). Según la proporción de elementos intersticiales se distinguen 4 tipos o grados normalizados de titanio para aplicaciones biomédicas o titanio quirúrgico (Tabla 1).

ELEMENTOS INTERSTICIALES						
	Fe	O	N	C	H	Ti
<b>GRADO 1</b>	0,20	0,18	0,03	0,10	0,0125	99,47
<b>GRADO 2</b>	0,30	0,25	0,03	0,10	0,0125	99,30
<b>GRADO 3</b>	0,30	0,35	0,05	0,10	0,0125	99,18
<b>GRADO 4</b>	0,50	0,40	0,05	0,10	0,0125	98,93
<b>GRADO 5</b>	ALEACIÓN DE TITANIO					

Tabla 1: Composición de los distintos grados de titanio (en %), según normas ASTM.

Conforme disminuye el grado de pureza del titanio comercialmente puro, o dicho de otro modo, conforme aumenta el grado desde el grado 1 al grado 4 (mayor concentración de elementos intersticiales), aumenta la rigidez, resistencia mecánica y dureza del titanio. Por otro lado, se vuelve menos fluido en estado líquido, disminuye la ductibilidad, la resistencia a la corrosión y se dificulta su colado.

El grado 1 es el más puro y por tanto, el más maleable al ser el de menor contenido en hierro y oxígeno. El grado 2 es más común y abundante que el 1. En los inicios de la utilización del titanio para implantes dentales, todos ellos eran fabricados en titanio grado 2, pero la demanda de mejores propiedades mecánicas y físicas dieron paso a su utilización en prótesis. El titanio grado 3 es el menos común de los cuatro grados.

El 4 es el más fuerte de los cuatro grados y el que mayor proporción de hierro y oxígeno presenta. Por estas características, se suele utilizar titanio comercialmente puro de grado 2 y 4 para la confección de estructuras protésicas. El de grado 2 se utiliza principalmente para prótesis fija; mientras que el de grado 4 para prótesis removible, cuando se necesita obtener la fabricación de resortes, ganchos, etc., que requieren cierta elasticidad pero a la vez resistencia a la corrosión que no pueden proporcionar otras aleaciones.

A partir de cierta concentración de elementos intersticiales, ya no se considera al titanio como comercialmente puro y se conoce como "aleación de titanio", siendo éste el titanio grado 5. El titanio grado 5 o aleación de titanio-aluminio-vanadio (Ti-6Al-4V o Ti64) ha demostrado exhibir una de las más atractivas combinaciones de propiedades mecánicas y físicas, resistencia a la corrosión y compatibilidad dentro de todos los biomateriales metálicos (47). Esta aleación está formada por un 90% de titanio, 6% de aluminio que disminuye el peso específico y mejora el módulo de elasticidad, y un 4% de vanadio que disminuye la conductividad térmica y aumenta la dureza (2).

La principal ventaja de la aleación de titanio comparada con otros grados de titanio es su resistencia. La aleación de titanio (930 MPa de resistencia a la tensión) es cuatro veces más fuerte que el grado 1 de titanio CP (240 MPa) y casi el doble de fuerte que el grado 4 (550 MPa). La resistencia máxima y la resistencia a la fatiga son consideraciones fundamentales dadas las variaciones de los perfiles de carga a los que los implantes son

sometidos en boca y las posibles fracturas de los componentes debido a materiales o diseños inadecuados.

El módulo de elasticidad (rigidez) de los cuatro grados de titanio es similar (103 GPa), y de la aleación de titanio sólo ligeramente más alta (113 GPa). El titanio y su aleación tienen el módulo de elasticidad más cercano al hueso (20 GPa), ya que pesar de ser casi 6 veces mayor que el de la cortical ósea, se asimila más a la rigidez del hueso que el de cualquier otro metal utilizado como biomaterial (2).

En la actualidad continúan las investigaciones en este campo, con el objetivo de mejorar las propiedades del material y acortar el periodo de oseointegración.

### 2.3.3. RESPUESTA CELULAR FRENTE AL MATERIAL

De forma sencilla, los primeros eventos a nivel químico, molecular y celular en el momento de la colocación del implante, son los siguientes (48–50):

A. La superficie del material entra en contacto con el agua y las proteínas de los fluidos fisiológicos. Si las propiedades superficiales son las adecuadas, las proteínas se adsorben al material, es decir, quedan retenidas en su superficie.

B. Tras ello, las células interactúan a través de uniones débiles no específicas con la capa proteica adherida a la superficie del material.

C. Posteriormente, se forman interacciones adhesivas más fuertes gracias a las integrinas, proteínas de membrana de las células osteogénicas que, a su vez, reconocen regiones específicas de las proteínas de la matriz extracelular ósea.

D. En función de la densidad de estas adhesiones y su distribución, las células osteogénicas forman complejos moleculares más estables denominados adhesiones focales que conectan las proteínas extracelulares con el citoesqueleto celular.



E. Por último, las adhesiones focales se agrupan formando complejos de mayor tamaño y se inician cascadas de señalización celular que modulan procesos como la proliferación, migración o diferenciación.

La excelente respuesta de la aleación de titanio en el organismo a corto y largo plazo se debe a las propiedades específicas de su superficie, ya que es ésta la que interactúa directamente con el medio desde que el implante dental entra en contacto con los tejidos circundantes.

Como ya hemos comentado, el titanio y sus aleaciones producen una capa de óxidos altamente protectores al exponerse al medio y reaccionar con el oxígeno. De esta forma, se evita el contacto directo del metal con el medio circundante haciendo que la superficie del implante no entre directamente en contacto con los tejidos, sino que lo haga a través de la capa de óxidos de su superficie.

Por ello, las propiedades y características químicas y superficiales de esta capa de óxidos y la superficie del implante, son los aspectos más importantes desde el punto de vista de la biocompatibilidad y la oseointegración.

La modificación de estas propiedades y características tienen como objetivo aumentar la rugosidad superficial y favorecer los procesos osteoinductivos, estimulando la diferenciación de los osteoblastos, que son los responsables de la síntesis de matriz ósea. Esto se consigue, además de incrementando el área superficial al aumentar la rugosidad, mediante la estimulación de la actividad química hidrofílica, aumentando la humectabilidad para permitir que las células óseas lleguen más rápidamente a la superficie, entrando en contacto osteogénico con ella y reduciendo así el tiempo de maduración del hueso.

## **2.4. DISEÑO**

El diseño del implante, tanto a nivel macroscópico como microscópico, es clave en cuanto al comportamiento clínico de los mismos y el éxito final del tratamiento.

A nivel macroscópico, el diseño del implante es importante para una correcta transmisión de cargas durante las funciones que debe cumplir el complejo implanto-

prótesis, ya que esto va a determinar el consecuente buen desarrollo del remodelado óseo y la estabilización del hueso receptor, de forma que no sólo se logre la oseointegración, sino que se mantenga a corto y largo plazo.

El correcto diseño de los implantes puede compensar el riesgo de cargas oclusales excesivas, pobres densidades óseas y, por otro lado, posiciones, número o tamaño de los implantes no ideales (2).

#### 2.4.1. DISEÑO MACROSCÓPICO

Desde un punto de vista macroscópico, podemos dividir el implante en dos partes: el cuerpo y la cabeza o conexión (Fig. 15).



Figura 15: implantes dentales en los que distinguimos cuerpo y cabeza o conexión. A la izquierda, un implante de conexión interna. A la derecha, uno de conexión externa (tomada de Biomet 3i ®).

En cuanto al cuerpo, existen tres tipos de implantes:

- A. Implantes cilíndricos o impactados, bien de paredes paralelas o bien un cilindro con forma cónica, frecuentemente con perforaciones con el objetivo de que se cree hueso en su interior de forma que se consiga una retención mecánica. Se introducen por fricción dentro de un lecho óseo preparado para tal fin. Fueron muy utilizados en los años 80, pero actualmente están en desuso (Fig. 16).



Figura 16: Implantes impactados (tomada de IMZ®).

- B. Implantes con cuerpo similar a un tornillo, con rosca, pero que se introducen a presión en el hueso, como los anteriores (Fig. 17).



Figura 17: Implante impactado con rosca y forma de raíz (tomada de Frialit®).

En el pasado, el diseño del implante se condicionó por la facilidad quirúrgica de colocación, por lo que los implantes cilíndricos o a presión, que son los más sencillos de insertar, fueron muy populares en la década de 1980, registrando tasas de éxito iniciales elevadas (51,52). Sin embargo, tras 5 años de carga, los resultados publicados de los implantes cilíndricos incluyen pérdidas de hueso crestal y fallos del implante con una tasa de fracaso del 20%, relacionados con condiciones de fatiga por sobrecarga y cargas perjudiciales de cizallamiento en el hueso, por lo que los implantes a presión dejaron paso a los roscados con forma de tornillo (53).

C. Implantes con forma de tornillo, que se introducen roscados en un lecho óseo preparado para ello y ligeramente más pequeño. Son los utilizados en la actualidad y pueden presentar paredes paralelas o cónicas, además de rosca y microtopografía superficial que aumentan la superficie de contacto hueso-implante y permiten la fijación ósea inicial y la consecuente obtención de estabilidad primaria (54).

Podemos encontrarlos con diferentes longitudes, diámetros y características morfológicas según la casa comercial.



Figura 18: Diferentes tipos de implantes (tomada de BTI®).

Respecto a la cabeza o conexión del implante con la supraestructura protésica, existen diferentes formas geométricas según la casa comercial: cuadrada, hexagonal, octogonal, dodecagonal, cónica, cónica-almendrada, etc. Y por otro lado, se clasifican en conexión externa o interna dependiendo de si dicha figura geométrica está presente o ausente en la parte más coronal (55) (Fig. 19-22).



Figura 19: Conexión externa (izquierda). Conexión interna (derecha) (tomada Misch. Implantología contemporánea. 2009).

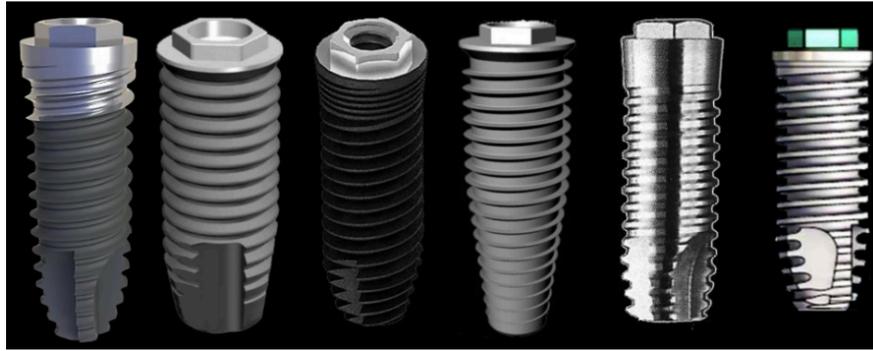


Figura 20: Diferentes implantes de conexión externa (tomada de Misch. Implantología contemporánea. 2009).



Figura 21: Detalle de diferentes conexiones externas (tomada de Misch. Implantología contemporánea. 2009).



Figura 22: Detalle de diferentes conexiones internas (tomada de Misch. Implantología contemporánea. 2009).

Branemark desarrolló y patentó originariamente un diseño de cabeza de implante que presentaba una conexión externa en la que de la parte más superficial emergía un hexágono de 0,7 mm de altura y 2,7 mm de diámetro (Fig. 23).

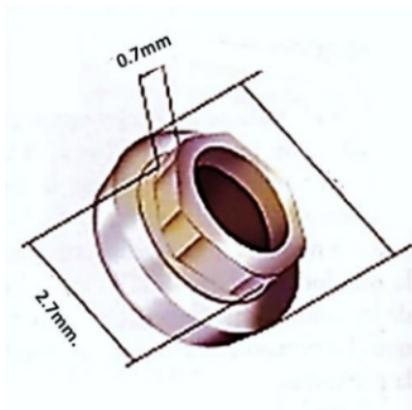


Figura 23: Detalle de la conexión externa de Branemark (tomada de Misch. Implantología contemporánea. 2009).

Más tarde, se comprobó que esta conexión sometía al implante a un comportamiento biomecánico desfavorable, principalmente cuando el implante es sometido a fuerzas laterales excesivas, produciéndose un aflojamiento de la estructura implanto-prótesis, progresiva deformación del hexágono y *gap* en la interfase de unión del pilar protésico y el propio implante. Consecuentemente, se produce una mayor transferencia de estrés y micromovimientos al tornillo y al implante, lo que puede conducir a roturas o pérdida de la oseointegración, respectivamente.

Con el objetivo de disminuir estos inconvenientes y mejorar la estabilidad de la conexión, se introdujeron diferentes cambios como la mejora del diseño del tornillo, aumento de las dimensiones del hexágono, la plataforma protésica y el torque de los tornillos (2,56).

Sin embargo, los implantes de conexión interna en los que la forma geométrica de la conexión está en el interior de la cabeza del implante y los aditamentos protésicos se introducen en él, al recibir fuerzas no axiales sobre la estructura presentan una mejor absorción y distribución de las mismas, ya que la conexión aporta mayor superficie de contacto, mayor estabilidad en la zona de unión pilar protésico-implante y menor *gap* en comparación con la conexión externa. Consecuentemente, se produce menor índice de aflojamiento y fractura de tornillos. Por ello es la conexión más utilizada actualmente (57).

En cuanto a diseño macroscópico, otro enfoque que se siguió en el pasado pretendía reducir las complicaciones terapéuticas relacionadas con la placa bacteriana, presentando una superficie metálica pulida en la porción crestral del implante, ya que de este modo se acumula menos placa que en las superficies rugosas (58).

El problema de esta filosofía fue que la porción crestal lisa se colocaba inicialmente por debajo del reborde óseo y se fomentaba la pérdida de hueso marginal por la extensión de una anchura biológica después de descubrir el implante en la segunda fase quirúrgica y por las fuerzas de cizallamiento tras la carga oclusal (59). Por ello se pasó a dejar esta parte crestal lisa por encima del nivel óseo, no teniéndola en cuenta dentro de los milímetros totales de longitud del implante, sino siendo una parte independiente del mismo. La intención es alejar la conexión implante-prótesis del hueso, y con ello alejar la colonización bacteriana de la interfase hueso-implante, siendo los denominados implantes “de cuello pulido” o *tissue level* (Fig. 24 y 25).

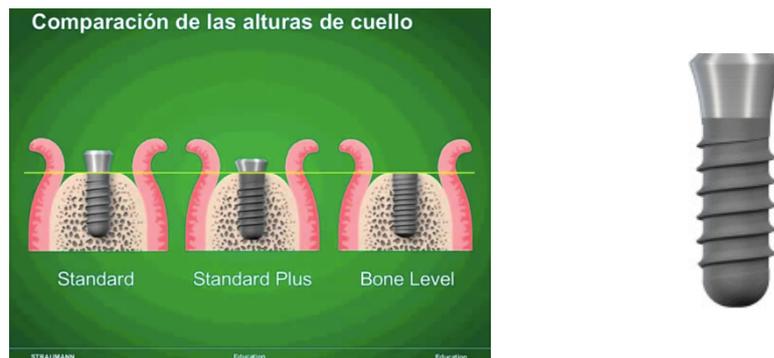


Figura 24: Implantes de cuello pulido o *tissue level* (tomada de Straumann®).

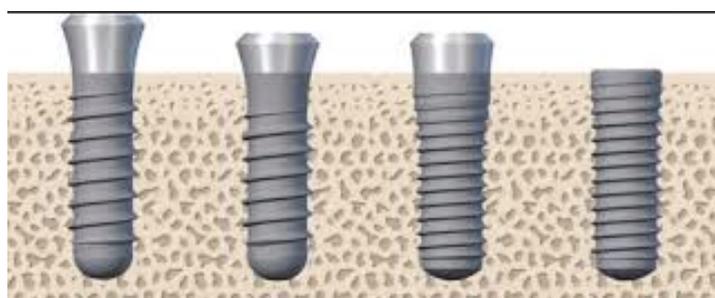


Figura 25: De izquierda a derecha: 3 implantes de cuello pulido o *tissue level* y uno a nivel de hueso, sin cuello pulido o *bone level* (tomada de Straumann®).

En general un implante de titanio de cualquier forma y dimensión puede oseointegrarse siempre que se obtenga una buena estabilidad primaria gracias a una buena técnica quirúrgica que evite un trauma excesivo en el tejido óseo.

Sin embargo, el diseño macroscópico del implante influye enormemente en la forma en la que se consigue la oseointegración y cómo se va a mantener a largo plazo al ser sometido el implante a cargas funcionales.

En la actualidad, como hemos comentado anteriormente, los únicos implantes aceptados son los roscados y en forma de raíz, que respecto a los cilíndricos impactados que se utilizaron en el pasado, ofrecen gracias a la rosca del implante y al fresado de un lecho ligeramente menor al diámetro del propio implante, una mejor estabilidad primaria para evitar micromovimientos no deseados del implante hasta que se consiga la oseointegración.

En cuanto al diseño, no sólo influye la forma general del implante, sino también su diámetro y longitud (parámetros cuya elección está sujeta a la cantidad de hueso disponible). Pero principalmente se debe tener en cuenta posibles variables en cuanto al diseño de la rosca (paso y altura de la misma) y el cuerpo del implante en toda su longitud, ya que tienen un importante papel en la transmisión del estrés oclusal y carga de la prótesis al hueso que lo soporta, pudiendo aumentar o disminuir el riesgo de aflojamiento del tornillo, pérdida de hueso crestal, pérdida de hueso en el cuerpo del implante, periimplantitis e incluso fractura del cuerpo del implante. Esta decisión es, incluso, más importante cuando los factores de fuerza son mayores de lo habitual (por ejemplo en pacientes bruxistas), la densidad del hueso es pobre o el tamaño del cuerpo del implante es menor.

En cuanto al diseño de la rosca, se pueden variar tres parámetros de su geometría:

-Paso de rosca: es la distancia medida entre las espiras adyacentes de un implante. Cuanto menor sea el paso de rosca, más espiras tendrá el implante y por tanto mayor será el área de superficie para el contacto hueso-implante por unidad de longitud del cuerpo del implante (60) (Fig. 26).





Figura 26: Implantes con diferentes pasos de rosca (tomada de Straumann® y Biomet 3i®).

-Forma de la rosca: es otra característica importante en la geometría global de la rosca, pudiendo ser, principalmente, cuadradas, en V, en arbotante y en arbotante invertido (Fig. 27).

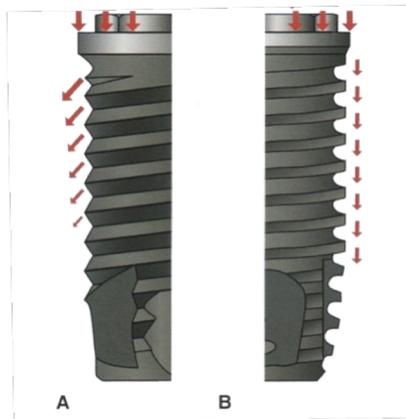


Figura 27: A. Implante dental con rosca en forma de V. B. Implante dental con rosca cuadrada (tomada de Misch. Implantología contemporánea. 2009).

-Profundidad de la rosca: es la distancia entre el diámetro mayor y menor de la rosca, siendo a mayor profundidad mayor el área de superficie del implante.

Si atendemos al diseño del cuerpo del implante en cuanto a la forma general, debemos considerar que el extremo apical del implante debe ser plano mejor que en punta, ya que la geometría puntiaguda tiene menor área de superficie, incrementando así el nivel de estrés en esa región del hueso (2).

#### 2.4.2. DISEÑO MICROSCÓPICO

A nivel microscópico, los primeros eventos que se producen tras la colocación del implante en su lecho receptor (contacto con la sangre, adsorción de proteínas y otras moléculas, adhesión celular, etc.) dependen, como hemos comentado anteriormente, de la interacción de la superficie del material con el medio biológico. La respuesta del medio receptor y los procesos que se produzcan en estos primeros momentos, se ven influenciados por las propiedades superficiales del material y son los que pueden llevar o no a una buena y temprana oseointegración.

Entre los factores a considerar en cuanto al diseño de los implantes, la calidad superficial del implante (físicoquímica y topográfica) es de gran importancia. De hecho, todas las interacciones biológicas y mecánicas que se dan entre el implante y los tejidos circundantes son a través de la interfase creada entre dichos tejidos y la superficie del material implantado. Debemos pues, tener en cuenta tanto propiedades físicoquímicas como topográficas.

Para conocer las propiedades físicoquímicas del titanio hay que conocer las propiedades de la capa de óxido de titanio que se deposita sobre su superficie de manera natural y espontánea, en contacto con el aire y otros medios. Consecuentemente, los agentes químicos y biológicos no interaccionan directamente con el titanio, sino con esta capa estable de óxido de titanio que cubre su superficie.

Esta capa protege al material del aumento incontrolado de la oxidación, reacciones químicas y biológicas indeseables y de la corrosión. Del análisis de las propiedades superficiales de la capa de óxido de titanio se puede concluir principalmente que (3):

- la naturaleza protectora de la capa de óxido deriva de su integridad natural y estabilidad química en un amplio rango de pH, electrolitos y fluidos corporales.
- la capa superficial de óxido de titanio se reconstituye rápidamente tras una pérdida local de esta pasivación, por ejemplo, por el efecto de desgaste mecánico.

-la baja solubilidad de los óxidos de titanio y su escasa tendencia a formar compuestos de titanio cargados, son aspectos muy relevantes para la biocompatibilidad del titanio, al hacer que no se cedan sustancias perjudiciales al medio que lo rodea (61).

En cuanto a las propiedades topográficas, podemos decir que la rugosidad y textura superficial son las más influyentes en la respuesta del medio circundante tras la colocación del implante. En gran medida las casas comerciales se centran en ellas para conseguir superficies especialmente diseñadas para favorecer el proceso de bio y oseointegración.

Por ello, son muchos los tratamientos de superficie que se han aplicado al titanio para aplicaciones biomédicas, y su clasificación se puede hacer desde distintos puntos de vista. De forma sencilla y en función de la propiedad superficial que principalmente modifican o, dicho de otro modo, según el efecto que persiguen, podemos distinguir dos grandes grupos:

A) modificación morfológica y topográfica.

B) modificación físico-química, de la composición y la estructura de la capa de óxido o la formación controlada de un nuevo recubrimiento en la superficie.

Siguiendo esta clasificación, los tratamientos más significativos por ser los más empleados al haber obtenido buenos resultados de comportamiento biológico, mecánico y químico, para cada uno de los grupos, son (3,62):

A) Arenado y grabado ácido.

B) Recubrimiento con diferentes materiales (por ejemplo: hidroxiapatita, colágeno, materiales poliméricos o melatonina).

Como hemos dicho, la topografía superficial (rugosidad y textura) puede considerarse la más importante de las propiedades superficiales que influyen en la respuesta del organismo a la presencia del implante, además de la más ampliamente estudiada tanto *in vitro* como *in vivo*. Se ha observado que al aumentar la rugosidad del titanio por encima de la obtenida al ser mecanizado, el implante mejora la respuesta osteoblástica

*in vitro* y la oseointegración *in vivo*, ya que ésta se acelera, muestra mayor cantidad de hueso en contacto con el implante y aumenta la resistencia al aflojamiento, puesto que necesitan pares de torsión superiores para su extracción (63).

#### 2.4.2.1. TRATAMIENTOS DE SUPERFICIE

##### 2.4.2.1.1. PARÁMETROS DE CARACTERIZACIÓN DE LAS SUPERFICIES

En primer lugar, podemos definir la rugosidad superficial de forma general como el conjunto de las irregularidades superficiales de paso relativamente pequeño, correspondiente a las huellas dejadas en la superficie por el procedimiento de elaboración u otras influencias. En el Sistema Internacional la unidad de rugosidad es el micrómetro o micra ( $1 \text{ micra} = 1 \mu\text{m} = 0,001 \text{ mm}$ ).

Para comenzar a analizar las diferentes opciones actuales de las que disponemos dentro del campo de los tratamientos de superficie que pueden darse al titanio para implantes dentales, debemos, en primer lugar, hablar de ciertos parámetros que nos ayudan a comparar y caracterizar las superficies.

Los parámetros más comunes y utilizados en general son parámetros de descripción vertical del perfil (rugosidad en altura), como Ra, Rq, Ry o Rz. Pero también hay parámetros de descripción horizontal como Pc (número de picos del perfil por unidad de longitud) o HSC (número de crestas emergentes por unidad de longitud).

Ra: media aritmética de los valores absolutos de las desviaciones del perfil desde la línea central. Se calcula en  $\mu\text{m}$  y es el parámetro habitualmente utilizado para cuantificar la rugosidad de las superficies.

Rq: media de la raíz cuadrada de las desviaciones del perfil, es el valor medio de la raíz cuadrada de las desviaciones del perfil respecto a la línea media, dentro de la longitud de la muestra. Este parámetro es más sensible que Ra a valores extremos debido a la operación cuadrática.

Rz: altura de las irregularidades en diez puntos, o dicho de otro modo, media de los valores absolutos de los cinco picos más altos ( $Y_{pi}$ ), más el valor medio absoluto de los cinco valles más profundos ( $Y_{vi}$ ), dentro de la longitud de la muestra. Este parámetro es sensible a los cambios pronunciados en las características topográficas de la superficie.

Ry: altura máxima del perfil. Valor que describe la distancia entre el pico más alto del perfil ( $Y_p$ ) y el fondo del valle más profundo ( $Y_v$ ) dentro de la longitud de la muestra.

#### 2.4.2.1.2. ARENADO

Dentro de los tratamientos de superficie, el chorreado o arenado con partículas es uno de los más utilizados. El efecto conseguido varía principalmente en función del material utilizado y el tamaño de las partículas.

Si analizamos la adhesión en función del Ra, parece claro que al aumentar la rugosidad aumenta la adhesión, pero depende también del tipo de naturaleza y tamaño de las partículas de proyección y del tipo de rugosidad obtenido (3).

Se han utilizado tamaños de partículas diferentes para el arenado del titanio y sus aleaciones, desde unos pocos micrómetros que dejan rugosidades inferiores a  $R_a = 0,1 \mu\text{m}$  (64), tamaños medios de entre  $25-75 \mu\text{m}$  obteniendo rugosidades de  $R_a = 0,15-0,5 \mu\text{m}$  (25,26,65–67) o mayores, entre  $200-600 \mu\text{m}$ , para rugosidades incluso de  $R_a = 2-6 \mu\text{m}$  (27,68,69). Las partículas con las que se han obtenido mejores resultados para el arenado de implantes dentales son las formadas por alúmina y sílice, es decir, óxidos inertes y abrasivos. Y de entre estos dos, por ser el más estudiado (65,66,70–73), fácil de encontrar en el mercado y tener un coste asequible dentro del campo de los abrasivos, el óxido de aluminio o alúmina es uno de los más extensamente empleados.

#### 2.4.2.1.3. GRABADO ÁCIDO

Otro de los tratamientos de superficie más usados es el grabado ácido, que consiste en baños de diferentes ácidos: ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fluorhídrico, etc., de forma que se produce una microtexturización en la superficie del titanio por sustracción de materia sin dejar residuos. Además, de este modo se consigue un tratamiento uniforme de la superficie y se controla la pérdida de la sustancia metálica del cuerpo del implante (74).

Estos baños pueden ser en un solo ácido o una combinación de ellos (técnica dual con dos ácidos o técnica triácido) obteniéndose mejores resultados al combinarlos (25,64–66,75). La rugosidad previa al grabado, la mezcla ácida, la temperatura de baño y el tiempo de grabado son variables que afectan a dicho proceso.

#### 2.4.2.1.4. COMBINACIÓN ARENADO Y GRABADO ÁCIDO

El uso de un método dual, chorreado y grabado ácido, presenta ciertas ventajas ya que con el chorreado se consigue producir una macrotextura, que seguida del grabado ácido que crea una microtextura, consigue obtener finalmente una superficie constituida por huecos y agujeros uniformemente dispersos.

Hay publicaciones que apoyan esta técnica dual frente a utilizar sólo chorreado o sólo grabado, ya que parece ser que favorece la oseointegración (76–78), se mejoran las propiedades osteoconductoras y la capacidad de inducir la proliferación celular (68,79,80).

#### 2.4.2.1.5. RECUBRIMIENTO CON FOSFATO CÁLCICO

Como hemos comentado, la matriz extracelular mineralizada del tejido óseo está formada por componente orgánico (fundamentalmente colágeno) y por componente inorgánico formado predominantemente por compuestos de fosfato de calcio,

principalmente en forma de hidroxiapatita, perteneciente a la familia de los materiales cerámicos (81).

En consecuencia, los compuestos de fosfato cálcico utilizados como recubrimiento del titanio para implantes dentales parecen dar buenos resultados en cuanto a contacto hueso-implante y formación de hueso nuevo periimplantario. Esto se basa en que el fosfato cálcico libera iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$ , de forma que los fluidos corporales en contacto con el implante se saturan de estos iones y el organismo precipita sobre la zona nanocristales de apatita biológica que sirve de sustrato para los osteoblastos en la producción de hueso nuevo (82–85).

El fosfato cálcico puede depositarse sobre la superficie del implante mediante distintas técnicas como pulverización catódica, proyección de partículas (*plasma spraying*), deposición electroforética o precipitación biomimética. Esta última intenta simular el proceso natural de precipitación de cristales de apatita biológica a partir de fluidos biológicos simulados (a temperatura y pH similares a los del organismo) (86). Otro método es el proceso DCD® (*Discrete Crystalline Deposition*), que consiste en la deposición de cristales de fosfato de calcio a escala nanométrica sobre la superficie del titanio. El fosfato cálcico se suspende en una solución en la que se sumerge el titanio, induciendo a las partículas a “autoensamblarse” en la superficie.

La técnica de proyección de partículas ha sido una de las más utilizadas, pero se han relacionado fracasos clínicos de implantes por la delaminación y desprendimiento del recubrimiento depositado mediante esta técnica (87).

En resumen, podemos decir que en la actualidad la gama de diferentes diseños y tratamientos de superficie disponibles en el mercado es muy extensa, no existiendo una opción claramente más válida que otra, al menos, de forma consensuada y demostrada.

Se precisan estudios exhaustivos de caracterización de la morfología y naturaleza química de la superficie resultante, para poder identificar cómo éstas influyen en la adhesión de proteínas y, finalmente, en el comportamiento celular.

## 2.5. MELATONINA

### 2.5.1. DEFINICIÓN, BIOSÍNTESIS Y FUNCIONES GENERALES

Dentro de los tratamientos de superficie más novedosos se encuentra la aplicación tópica de melatonina sobre el implante.

La melatonina es una hormona sintetizada y secretada por la glándula pineal, un órgano de aproximadamente 120 mg de peso con forma de cono aplanado situado entre los tubérculos superiores del mesencéfalo, en la fosa pineal (Fig. 28).

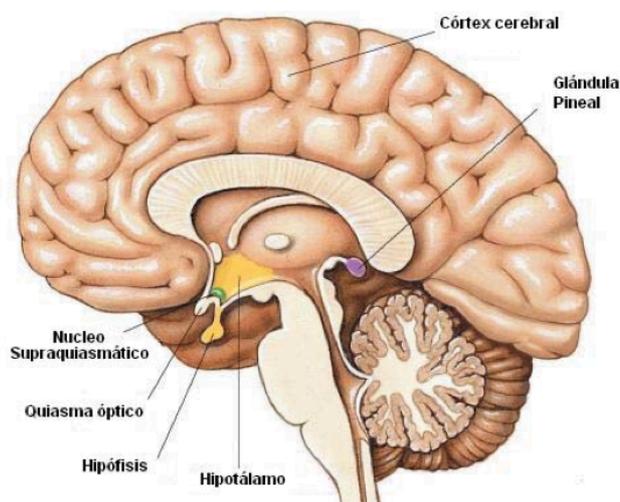


Figura 28: Localización anatómica de la glándula pineal (tomada de Guardia Muñoz (88)).

Inicialmente se definió como una hormona que mediaba las variaciones anuales en la capacidad reproductora de animales con ciclos de reproducción estacionales, pero actualmente se sabe que influye en numerosos aspectos de la biología circadiana, acciones mediadas por la unión de la hormona a receptores de membrana (89,90), además de estar relacionada con aspectos de la fisiología intracelular (91,92).

En la actualidad, se considera a la melatonina no como una hormona en el sentido clásico, sino como un protector celular conservado evolutivamente basándonos en dos hechos:



Por un lado, la melatonina no se sintetiza en un órgano específico. Las enzimas requeridas para la síntesis de la melatonina se encuentran, además de en la glándula pineal, también en otros tejidos como la retina, el timo, el bazo, los linfocitos B, los ovarios, los testículos y el intestino. Aunque es cierto que la melatonina extrapineal se produce por órganos específicos para su uso propio, siendo únicamente la melatonina pineal la que sale al torrente sanguíneo.

Por otro lado, la melatonina no actúa en órganos diana específicos, sino que alcanza diferentes tejidos y, al ser muy lipofílica, tiene la capacidad de actuar a todos los niveles de la célula, además de acumularse en diversas organelas como el núcleo y la mitocondria (93,94).

La melatonina participa en una gran variedad de procesos celulares, neuroendocrinos y neurofisiológicos. Entre ellos, podemos destacar el control del ciclo diario del sueño. Muchos de los procesos bioquímicos y fisiológicos de nuestro organismo están sujetos a un ciclo circadiano que se repite aproximadamente cada 24 horas, y que, como en el caso de la síntesis y secreción de la melatonina por la glándula pineal, están determinados por osciladores endógenos fotosensibles en el sistema nervioso central. De esta forma la melatonina se produce de manera circadiana y no se almacena, sino que se libera a sangre al ser sintetizada y alcanza niveles máximos durante la noche, induciendo el sueño al actuar sobre el sistema nervioso central por medio de receptores específicos (ML-1, ML-2, ML RR). Por ello, el efecto regulador del ciclo circadiano sugiere a la melatonina para el tratamiento del insomnio y la mejora de la calidad del sueño (88).

Por otro lado, la melatonina está considerada uno de los más potentes y completos antioxidantes conocidos, por su capacidad para eliminar, depurar o neutralizar radicales libres, principalmente el radical hidroxilo ( $\text{HO}\bullet$ ), pero también radicales peroxilo ( $\text{ROO}\bullet$ ), peróxidos de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}$ ) y peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ) (95).

La elevada capacidad de difusión de la melatonina es una de sus principales características físico-químicas para explicar su gran efecto antioxidante, ya que al ser

una molécula muy lipofílica puede atravesar cualquier membrana celular o de organelas subcelulares, pudiendo actuar, como ya se ha mencionado, a todos los niveles celulares (membrana, citosol, núcleo, mitocondria).

Esto unido a su alto potencial redox (alrededor de 0,74 V) que la dota de una alta capacidad para ceder un electrón y reducir cualquier molécula a su alcance, hacen que su capacidad antioxidante sea más eficaz que la de otros antioxidantes conocidos (89,96,97).

### 2.5.2. INFLUENCIA A NIVEL ÓSEO

A nivel de la formación ósea, la melatonina estimula la proliferación y síntesis de colágeno tipo I en osteoblastos humanos cultivados *in vitro* (98) .

En cultivos preosteoblásticos, se ha observado que aumenta la expresión génica de la sialoproteína ósea y otros marcadores proteicos de hueso, entre ellos la fosfatasa alcalina (ALP) y la osteocalcina, de una manera dosis-dependiente, acelerando la diferenciación (99).

Por otro lado, se ha estudiado que gracias a su capacidad antioxidante puede interferir e inhibir la reabsorción ósea debido a la inhibición de la actividad osteoclástica, ya que como hemos mencionado, uno de los mecanismos a través de los cuales los osteoclastos reabsorben matriz ósea es a través de la producción de radicales libres y el intercambio de iones.

Además, Koyama (100) observó que la aplicación tópica de melatonina en dosis entre 5 y 500  $\mu\text{M}$ , disminuía de manera dosis-dependiente la expresión del ARNm de RANK, además de aumentar los niveles tanto de OPG como del ARNm de OPG en líneas celulares preosteoblásticas MC3T3-E1, inhibiendo así la osteoclastogénesis al bloquear la diferenciación de los preosteoclastos.

Por lo tanto, la melatonina podría ayudar a la oseointegración de los implantes gracias a su efecto a nivel de la formación ósea, estimulándola, y a nivel de la reabsorción ósea, inhibiéndola. Por lo que podría ser usada como un potencial agente terapéutico en situaciones en las que sea favorable un aumento de la formación ósea, como cicatrización de fracturas, osteoporosis u oseointegración de implantes dentales.

Estudios *in vivo* demuestran que tras 4 semanas de aplicación local junto al implante, aumenta el hueso, la densidad trabecular y el BIC (porcentaje de hueso en contacto con el implante) (101). Y tras 2 semanas ya se observa aumento del BIC, aumento del hueso total periimplantario y también del hueso interrosca, y disminución del tejido conjuntivo total periimplantario e interrosca (89).

## **2.6. ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA. CUANTIFICACIÓN DE ARNm ESPECÍFICOS**

### **2.6.1. SÍNTESIS PROTEICA**

Como se sabe, los ácidos nucleicos, ácido desoxirribonucleico (ADN/DNA) y ácido ribonucleico (ARN/RNA), son polímeros de nucleótidos unidos en largas cadenas mediante enlaces fosfodiéster. El ADN forma una doble cadena helicoidal (con uniones por enlaces de puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals y electrostáticas). Mientras que el ARN forma una cadena sencilla plegada sobre sí misma, por lo que constituye una estructura menos estable.

El ADN contiene la información genética necesaria para la síntesis de proteínas, responsables de la mayoría de funciones celulares. Esta información debe pasar por dos procesos hasta llevarse a cabo la síntesis proteica: transcripción y traducción (Fig. 29).

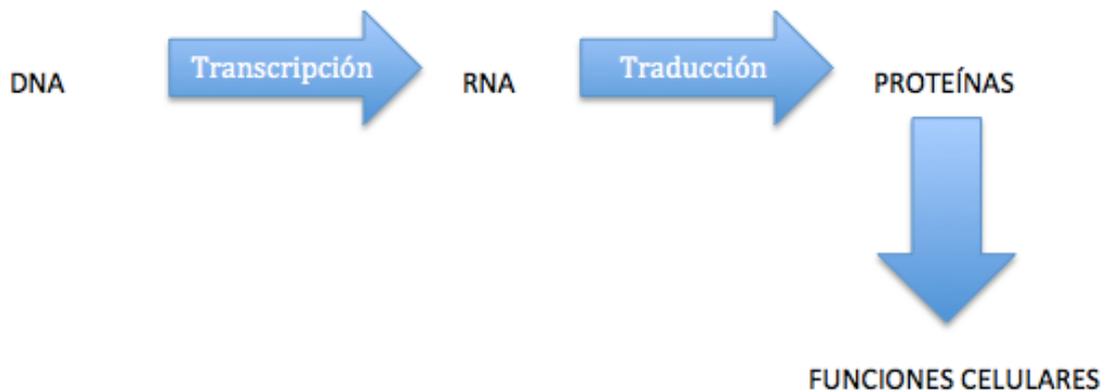


Figura 29: Proceso para la síntesis proteica.

La transcripción es el proceso mediante el cual el mensaje genético de un fragmento de ADN es copiado, con las bases complementarias correspondientes, en una molécula de ARN mensajero (ARNm).

La traducción es el proceso mediante el cual se lleva a cabo la síntesis de proteínas siguiendo las instrucciones contenidas en el ARNm.

Una vez realizada la transcripción del código genético contenido en el ADN y formado el ARNm que contiene la información que determina la secuencia de aminoácidos de la proteína, este ARNm viaja desde el núcleo celular, atravesando su envuelta, hasta los ribosomas, donde los ARN de transferencia (ARNt) llevan los aminoácidos para su incorporación al polipéptido en crecimiento.

El ribosoma, del que forman parte los ARN ribosomales (ARNr), lee el ARNm y ensambla los aminoácidos suministrados por los ARNt a la proteína en crecimiento. Por lo tanto, la expresión de un gen puede estimarse cuantificando tanto el producto final, la proteína traducida, como el intermedio, el ARNm específico para la síntesis de la proteína en cuestión. Actualmente el análisis de la expresión de múltiples genes es más factible valorando la cantidad del ARNm específico de cada gen presente en la muestra.

## 2.6.2 PCR CUANTITATIVA O EN TIEMPO REAL

La llamada PCR (*Polymerase Chain Reaction* o reacción en cadena de la polimerasa) es un procedimiento inventado en 1985 por Kary Mullis para sintetizar *in vitro* grandes cantidades de una región determinada de ADN. Es decir, consigue que un pequeño segmento de ADN presente en una concentración muy baja, que pasaría desapercibido en un análisis cualquiera, se multiplique millones de veces y de este modo pueda ser detectado con mayor facilidad.

Entre las diferentes aplicaciones de la PCR encontramos:

- modificación del ADN amplificado (mutagénesis *in vitro*).
- PCR analítica: para determinar la presencia de una secuencia concreta de ADN en una muestra. Por ejemplo para identificación de mutaciones, análisis forenses, análisis de paternidad, diagnóstico de virus, etc.
- PCR en tiempo real (RT-PCR) o PCR cuantitativa: permite determinar la expresión de un gen en una muestra (organismo, tejido, célula) mediante la medición cuantitativa de la fluorescencia emitida al añadir un elemento fluorescente en la mezcla de reacción en la que se amplifica el ARNm de dicho gen.

De forma sencilla, podemos dividir el proceso de una PCR básica en los siguientes pasos:

- Recogida de la muestra, que puede ser ADN o ARN. En caso de ser ARN, debe transformarse en ADNc (ADN copia o complementario del ARN de la muestra), ya que es más estable.
- Desnaturalización: calentar la muestra a alta temperatura para que las dos cadenas que forman la doble hélice del ADNc se separen.
- Acoplamiento o hibridación: añadir al inicio y al final del fragmento de ADNc que queremos analizar los *primers* o cebadores, secuencias de ADN complementarias y específicas para el gen estudiado.

-Amplificación o extensión: duplicación del segmento de interés de ADN gracias a una enzima ADN-polimerasa termorresistente, generalmente la Taq polimerasa aislada originalmente del organismo *Thermus aquaticus* (Fig. 30).

Este proceso de desnaturalización, acoplamiento y amplificación se repite cada vez que termina un ciclo, aumentando exponencialmente la cantidad de ADN, lo que permite obtener suficiente cantidad de ADN amplificado para realizar el estudio genético correspondiente.

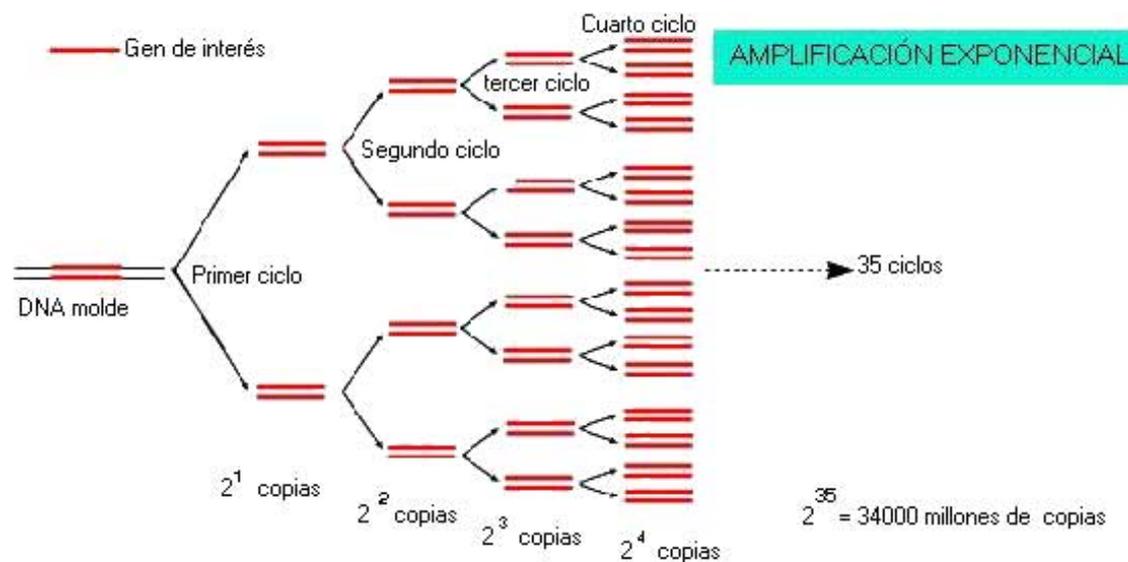


Figura 30: Representación de la amplificación exponencial de un gen (tomada de IQB. MedCiclopedia).

Los métodos de PCR cuantitativa a tiempo real presentan diferentes ventajas respecto a las técnicas convencionales de PCR, que requieren someter la muestra a electroforesis, siendo un proceso menos fiable y exacto.

Como ventajas, podemos destacar que no se requiere la manipulación después de la reacción de PCR, ya que los resultados están disponibles en cuanto acaba la reacción (a tiempo real), es posible realizar la amplificación y detección de un gen normalizador o control (*housekeeping gene* o control positivo interno) en el mismo ensayo y hay disponibles comercialmente cebadores y sondas fluorescentes, como las *Taqman*,

específicas para la mayor parte de los genes de interés, siendo el ensayo muy específico y la metodología altamente sensible.

Para llevar a cabo este proceso, necesitamos ADN polimerasa, un tampón adecuado con la concentración de magnesio óptima, dos oligonucleótidos cebadores que acoten la región a amplificar, una sonda fluorescente específica y un termociclador, que permite separar las dos cadenas de ADN a alta temperatura y acoplar los cebadores a temperatura más baja para empezar una nueva ronda de síntesis.

Como se ha indicado, en cada ciclo de reacción se duplica el número de moléculas que sirven de sustrato para el siguiente ciclo y se produce por tanto una amplificación del producto.

Una de las sondas más empleadas son las sondas TaqMan, que están diseñadas para alinearse con una secuencia diana situada entre las secuencias dianas de los cebadores. La sonda está marcada dualmente, con un marcador *reporter* (R) en el extremo 5' y con un *quencher* (Q) en el extremo 3'. Mientras la sonda está intacta, en su forma libre, la fluorescencia emitida por el *reporter* es absorbida por el *quencher*. La Taq polimerasa que está sintetizando el nuevo segmento de ADN puede degradar (hidrolizar) la sonda situada en ese fragmento, por lo que el *reporter* y el *quencher* se separan, de forma que el *quencher* no puede absorber la fluorescencia del *reporter* y se produce un incremento de la emisión de fluorescencia (Fig. 31).

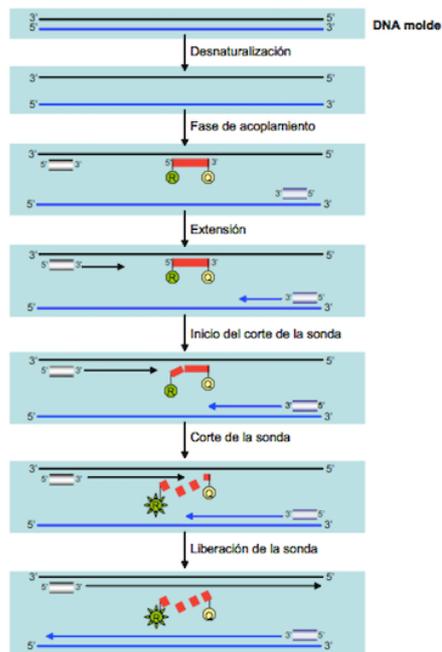


Figura 31: Representación del proceso de una PCR cuantitativa (tomada de Fernández M. 2006 (102))

La cantidad de fluorescencia emitida es directamente proporcional a la cantidad de producto generado en cada ciclo de la reacción de PCR y se puede utilizar como medida cuantitativa. Este incremento de fluorescencia puede ser leído a “tiempo real” (durante el transcurso de la reacción) por un detector, tras lo que un programa de ordenador calcula la emisión de fluorescencia  $\Delta R_n$  utilizando la ecuación:

$$\Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$$

Siendo  $R_n^+$  la emisión de fluorescencia del producto en cada punto y  $R_n^-$  la emisión de fluorescencia basal.

Para apreciar cómo transcurre el proceso, generalmente se emplea un programa que dibuja una gráfica de amplificación, donde los  $\Delta R_n$  se representan respecto al número de ciclos de la amplificación.

En el proceso de PCR cuantitativa pueden introducirse variaciones debidas a pequeñas diferencias en las cantidades iniciales de ARN o a diferencias en cuanto a la eficiencia de la síntesis de ADNc y la amplificación en la reacción de PCR. Es por ello que la PCR cuantitativa requiere la corrección de estas variaciones experimentales mediante la



normalización respecto a un gen control endógeno (*housekeeping gene*). Un gen control ideal es aquel que se expresa de forma constante en diferentes tejidos de un organismo, en los diferentes estados de desarrollo y cuya expresión no se ve afectada por ningún tratamiento experimental.

## 2.7. LIMPIEZA Y ESTERILIZACIÓN

### A. Limpieza

Una superficie verdaderamente limpia es aquella que atómicamente no contiene otros elementos que no sean los propios del material que lo constituye.

Los contaminantes pueden ser partículas, películas continuas como aceite o huellas dactilares, impurezas atómicas o capas moleculares causadas por la inestabilidad termodinámica de la superficie.

Incluso después de reaccionar con el ambiente, las superficies como metales, óxidos o cerámicas, tienden a disminuir su energía a través de la unión de elementos y moléculas.

Una preparación y esterilización defectuosas, no eliminar completamente gases adsorbidos y residuos orgánicos e inorgánicos, producen reacciones adversas del receptor del biomaterial. Incluso implantes que parecen inicialmente funcionales, pueden fallar atribuyéndose la posible causa a una limpieza y/o esterilización deficiente durante el proceso de fabricación, o a un manejo inadecuado durante la cirugía de colocación de los implantes.

Si no se lleva a cabo un proceso de limpieza adecuado y minucioso sobre la superficie del biomaterial, pueden permanecer restos de lubricantes usados durante la fabricación, residuos tras los diferentes tratamientos de superficie, disolventes de limpieza y otras sustancias indeseables (37,103).

## B. Esterilización

La esterilización por rayos gamma es un método establecido desde principios de los años 70. Sin embargo, su uso biofarmacéutico y biomédico se ha incrementado principalmente en los últimos años, reemplazando otros métodos más establecidos y costosos como el del óxido de etileno, que además, puede dejar residuos indeseables y potencialmente tóxicos como el etilenglicol o la etilenclorhidrina.

La radiación gamma es uno de los tres tipos de radiación natural, junto con la alfa y la beta. Es una forma de radiación electromagnética, como los rayos X o la luz ultravioleta, con una longitud de onda corta (menos de una décima de nanómetro), es decir, una longitud de onda energética por ionización (alteración de electrones).

Es un método físico de esterilización, ya que los rayos pasan a través del material eliminando las bacterias al romper el ADN bacteriano e inhibir la división bacteriana.

La fuente más común de rayos gamma utilizada es la que proviene del isótopo radiactivo Cobalto 60, aunque pueden usarse otros radionúclidos como el Cesio 137. El Cobalto 60 funciona como isótopo fuente y se obtiene específicamente para el proceso de radiación gamma a partir del Cobalto 59 no radiactivo.

Los fotones de alta energía se emiten desde el Cobalto 60 para producir ionización a través de un material (alteración de electrones). Este proceso no produce residuos ni transmite radioactividad al producto esterilizado y se conoce como “proceso frío”, porque apenas aumenta la temperatura del material esterilizado. Esto permite esterilizar los implantes dentales en su envase y empaquetado final, ya que la esterilización no depende de la humedad, temperatura, vacío o presión, como ocurre en otros procesos como la esterilización por vapor en autoclave o la esterilización por calor seco.

Las variables a tener en cuenta en el proceso son el tiempo de exposición y la dosis de radiación, es decir, cuánta energía se absorbe cuando el material está expuesto a la

fuentes de radiación. La medición de la radiación se expresa en kilograys (kGy), siendo cada gray la absorción de un joule de energía de radiación por un kilogramo de materia.

En contraposición a otras técnicas como la esterilización de vapor, que puede originar depósitos de sustancias orgánicas que causan una mala adhesión tisular, la reactividad química de las radiaciones gamma es baja comparada con la de los gases, a menudo altamente reactivos, por lo que el riesgo de inducir en el implante una reacción química perjudicial para el paciente, en este caso para las células, es mínimo. Además no deja residuos y es una técnica respetuosa con el medio ambiente (104).

En la industria se conocen los límites para la esterilización de los diversos tipos de biomateriales, pudiendo ser todos ellos esterilizados adecuadamente. El control de la limpieza, preembalado y esterilización correctos ha supuesto un gran avance en la implantología dental contemporánea.



### **3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

---



### 3.1. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, la demanda estética y funcional de los pacientes es cada vez mayor, lo que desencadena un intento continuo por disminuir los tiempos de espera para la oseointegración entre la colocación del implante y la restauración protésica implantorretenida.

La hipótesis de partida, basada en los trabajos citados anteriormente, es que se consigue una mejor oseointegración con implantes tratados, con mayor rugosidad que los mecanizados. A partir de ello, este proyecto se justifica ya que apenas hay estudios que combinen un patrón de rugosidad microtexturizada obtenida a través de grabado ácido dual con recubrimiento de la superficie del implante con fosfatos de calcio y adición de melatonina. Siendo además un campo todavía poco conocido y estudiado el de la aplicación de melatonina, no habiéndose realizado hasta nuestro conocimiento, estudios *in vitro* con osteoblastos cultivados sobre titanio y adición de melatonina.

Los estudios *in vitro* a corto plazo, realizados al cultivar osteoblastos sobre distintos sustratos, son los únicos que nos pueden ayudar a tener información sobre cuáles son los primeros eventos de reacción entre el implante y las células osteogénicas. Además de ayudarnos a identificar y seleccionar aquellos sustratos más convenientes para la rápida curación y regeneración del huésped y, en última instancia, inferir en la respuesta a largo plazo.

Además, las investigaciones publicadas hasta el momento parecen confirmar el efecto osteogénico de la melatonina y su papel en el metabolismo óseo, lo que clínicamente puede traducirse en su utilización como agente terapéutico en situaciones en las que se desee un aumento de la formación ósea.

De esta forma, nuestro trabajo se enmarca dentro de las actuales investigaciones y tendencias en el ámbito de la implantología oral, dirigidas hacia la búsqueda de nuevas moléculas y tratamientos de superficie que influyan sobre el comportamiento celular y consigan reducir, de este modo, el periodo de oseointegración y carga de los implantes,

## JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

consiguiendo así mejorar la calidad de vida de los pacientes, al poder disfrutar de sus restauraciones protésicas sobre implantes en un menor periodo de tiempo.



### 3.2. OBJETIVOS

En base a los antecedentes expuestos, los objetivos propuestos para el desarrollo de este trabajo fueron los siguientes:

1. Estudiar la topografía superficial de discos de titanio grado 5 mecanizados, tratados con técnica de grabado ácido dual y grabado ácido dual más recubrimiento con fosfato cálcico.
- 2.- Analizar la influencia de la rugosidad del titanio sobre la adhesión, proliferación, morfología y diferenciación de células osteoblásticas humanas cultivadas *in vitro* sobre dichos discos de titanio.
- 3.- Evaluar el efecto de la adición de melatonina como tratamiento superficial del titanio sobre la adhesión, proliferación, morfología y diferenciación de dichas células osteoblásticas humanas.



## **4. MATERIAL Y MÉTODO**

---



Para llevar a cabo nuestro estudio, utilizamos 120 discos de titanio grado 5 o aleación de titanio (Ti6Al4V) mecanizados y con diferentes tratamientos de superficie.

En primer lugar, analizamos la topografía superficial y rugosidad de los discos mediante microscopio óptico y microscopio confocal de escaneado láser. Posteriormente, se lavaron y esterilizaron mediante rayos gamma para prepararlos para el cultivo *in vitro* de células osteoblásticas humanas. Tras él, se observó mediante técnicas de fluorescencia y microscopio electrónico de barrido, el comportamiento celular en las diferentes superficies estudiando cómo la rugosidad y la adición de melatonina influyó en su morfología, adhesión y proliferación a corto plazo.

Por último, se llevó a cabo una cuantificación de ARNm específicos mediante una técnica de PCR a tiempo real para correlacionar la expresión génica de genes diana con su consecuente síntesis de proteínas relacionadas con la diferenciación osteoblástica, estudiando de nuevo la influencia de la rugosidad y la adición de melatonina.

A continuación, se describirá de manera pormenorizada los materiales utilizados y su preparación para llevar a cabo el estudio, además de las diferentes técnicas y métodos para la evaluación del comportamiento celular.

#### **4.1. DISCOS DE TITANIO**

Los 120 discos de titanio grado 5 empleados en el presente estudio fueron:

- 40 discos de 6 x 2 mm de titanio mecanizado (grupo M).
- 40 discos de 6 x 2 mm de titanio tratado mediante grabado ácido dual (ácido fluorhídrico y ácido clorhídrico) (grupo G).
- 40 discos de 6 x 2 mm de titanio tratado mediante grabado ácido dual (ácido fluorhídrico y ácido clorhídrico) y recubrimiento de fosfato cálcico (grupo GF).

#### 4.1.1. FABRICACIÓN Y TRATAMIENTO DE SUPERFICIE

Todos los discos fueron fabricados en las instalaciones de Biomet 3i® (BIOMET 3i Dental Ibérica. Paterna. España) a partir de las mismas varillas de titanio grado 5 o aleación de titanio, aluminio y vanadio (Ti6Al4V) utilizadas para la fabricación de implantes dentales (Fig. 33 y 33).

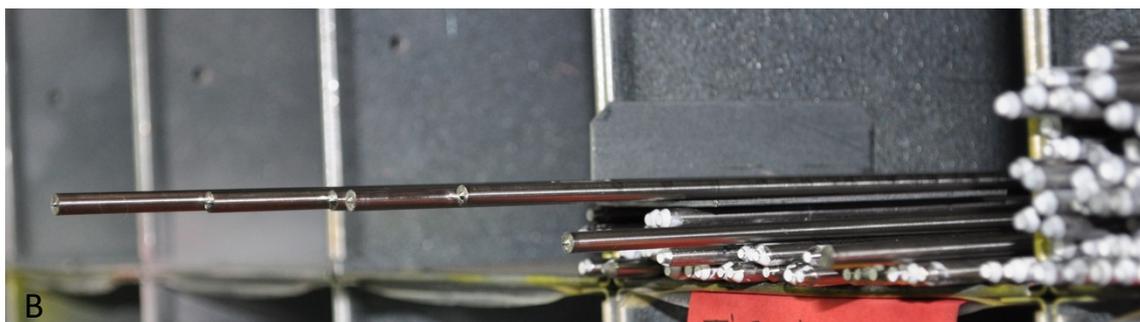


Figura 32: A y B. Varillas de Ti6Al4V (tomada en Biomet 3i®).



Figura 33: Detalle de un implante dental fresado de una varilla de Ti6Al4V (tomada en Biomet 3i®).

#### 4.1.1.1. MECANIZADO DE LOS DISCOS

Los discos fueron fresados y mecanizados a partir de dichas varillas en tornos automáticos (Star Micronics® . Otelfingen, Suiza) (Fig. 34).



Figura 34: Fresadora SR-20 Star Micronics® (tomada en Biomet 3i®).

#### 4.1.1.2. BAÑOS DE ULTRASONIDOS

Tras el mecanizado, todos los discos se lavaron en cubas de ultrasonidos industriales (ATU Ultrasonidos®. Valencia. España) (Fig. 35-37) con una solución jabonosa a una temperatura controlada de 60°C para eliminar restos de aceite y otros posibles residuos del proceso de mecanizado. Tras ello, se secaron en horno de convección forzada (JP Selecta®. Barcelona. España) (Fig. 38).

Los ultrasonidos son ondas acústicas producidas mediante vibraciones mecánicas que forman micro-burbujas que se comportan como miles de minúsculos cepillos. De este modo, esta cavitación arranca la suciedad sin dañar o rayar la superficie a limpiar, incluso en zonas de difícil acceso.



Figura 35: Cubas industriales de ultrasonidos (tomada en Biomet 3i®).

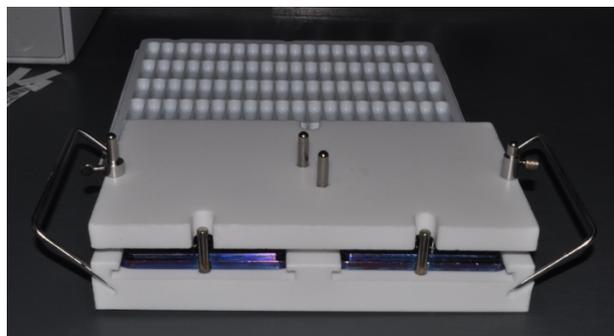


Figura 36: Soporte para limpieza en cuba de ultrasonidos (tomada en Biomet 3i®).





Figura 37: Soporte de limpieza en el interior de una cuba de ultrasonidos (tomada en Biomet 3i®).



Figura 38: Horno de convección forzada (tomada en Biomet 3i®).

Tras ello, 40 discos seleccionados aleatoriamente fueron separados para constituir el grupo M o grupo control.

#### 4.1.1.3. GRABADO ÁCIDO DUAL

Tras los lavados en ultrasonidos y secado en horno de convección forzada, se procedió al tratamiento de grabado ácido dual de los 40 discos del grupo G y los 40 del grupo GF (a los que posteriormente se les aplicó un recubrimiento de fosfato cálcico).

## MATERIAL Y MÉTODO

Los 80 discos se grabaron con ácido fluorhídrico (HF) durante un minuto. Tras ello, pasaron por un lavado rápido con agua destilada y se volvieron a grabar, esta vez con ácido clorhídrico (HCl), consiguiendo una topografía superficial de poros entre 1-3  $\mu\text{m}$  de diámetro (Fig. 39 y 40).

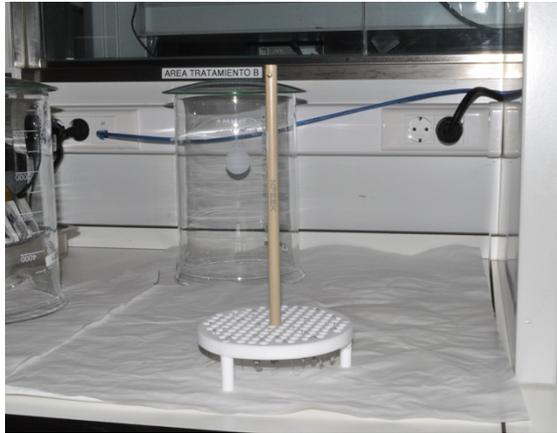


Figura 39: Soporte de los discos para el tratamiento de grabado ácido (tomada en Biomet 3i®).

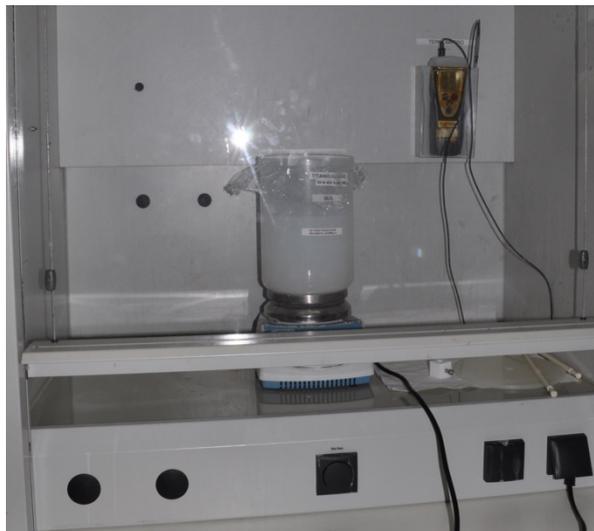


Figura 40: Procedimiento de grabado ácido (tomada en Biomet 3i®).

Posteriormente, los discos se pasaron a una disolución de bicarbonato en agua para neutralizar la acción del ácido y se volvieron a lavar en agua destilada.

A continuación se pasivaron con ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) para obtener una superficie homogénea (Fig. 41) y se lavaron de nuevo con agua destilada, dando por finalizado el

proceso de grabado ácido dual. Tras ello, los 40 discos del grupo G terminaron su tratamiento de superficie, mientras que los 40 discos del grupo GF pasaron a la segunda fase, el recubrimiento con fosfato cálcico mediante un proceso de DCD®.



Figura 41: Pasivación con ácido nítrico (tomada en Biomet 3i®).

#### 4.1.1.4. RECUBRIMIENTO CON FOSFATO CÁLCICO

Para el recubrimiento de los discos del grupo GF, se utilizó hidroxiapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ , una forma de fosfato cálcico, en suspensión de etanol al 99,5%.

Se procedió al secado y molienda de la hidroxiapatita para disminuir el tamaño de los cristales a escala nanométrica (20-100 nm de diámetro). Posteriormente, se suspendió en una solución a pH básico y concentración de partículas inferior a 0,5%, en la que se sumergieron los discos. De esta forma, se obtuvo una deposición de cristales de hidroxiapatita a escala nanométrica, con una distribución uniforme y homogénea sobre los poros creados por el grabado ácido, dando por finalizado el tratamiento de superficie.

#### 4.1.2. MICROSCOPIA ÓPTICA

Tras la preparación de los discos, se numeraron e identificaron en envases individuales del 1 al 40 los 40 discos de cada grupo, pudiendo de este modo hacer un seguimiento concreto y adecuado de cada uno de ellos en cualquier momento de la investigación.

Se escogieron al azar 2 discos de cada grupo y fueron observados y fotografiados empleando un microscopio óptico (OPMI Pico Dental, Carl Zeiss®. Oberkochen. Alemania) para observar las superficies y las diferencias entre ellas a pocos aumentos (35x).

#### 4.1.3. MICROSCOPIA CONFOCAL DE ESCANEADO LÁSER

Posteriormente, se midió la rugosidad superficial de todos los discos empleando un microscopio confocal de escaneado láser (MicroSpy Topo. Fries Research & Technology GmbH®. Bergisch Gladbach. Alemania) (Fig. 42).



Figura 42: Microscopio confocal de escaneado láser MicroSpy Topo® (tomada en Biomet 3i®).

Se realizaron 3 mediciones superficiales aleatorias en cada disco analizando el valor medio de rugosidad (Ra), parámetro habitualmente elegido para cuantificar la rugosidad de las superficies, con un objetivo de 100x (Fig. 43). Obteniendo de este modo un total de 360 mediciones.

Los datos obtenidos fueron procesados con el programa de análisis FRT Mark III (Fries Research & Technology GmbH®), para la evaluación y presentación de informes de medición (Fig. 44 y 45).

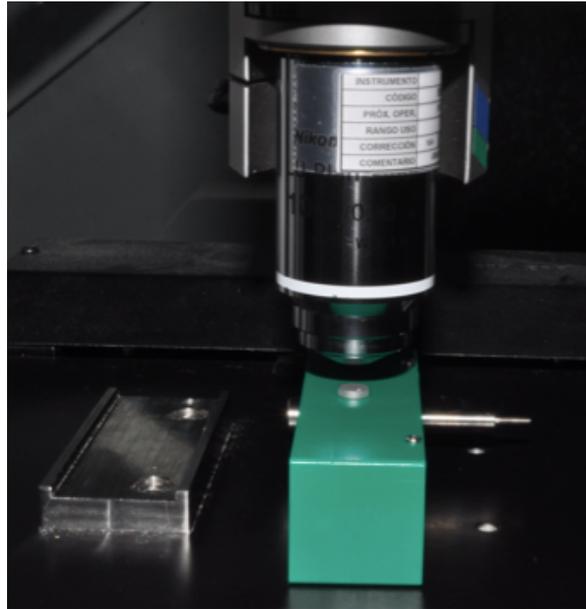


Figura 43: Disco sobre soporte de medición del microscopio confocal (tomada en Biomet 3i®)

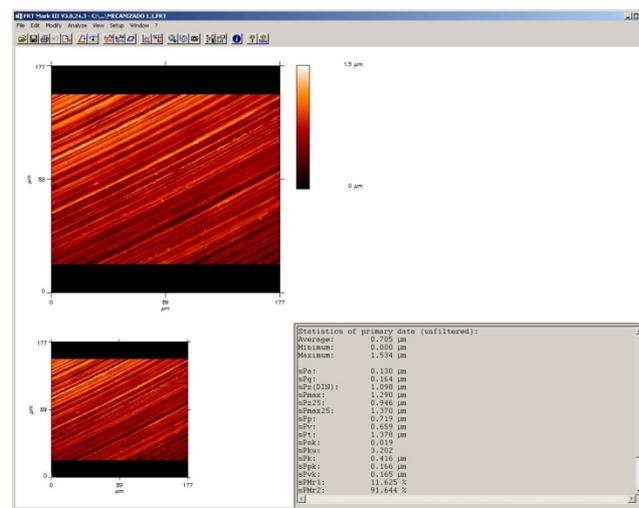


Figura 44: Imagen de una ventana del programa FRT Mark III durante el análisis de la medición de un disco mecanizado (tomada en Biomet 3i®).

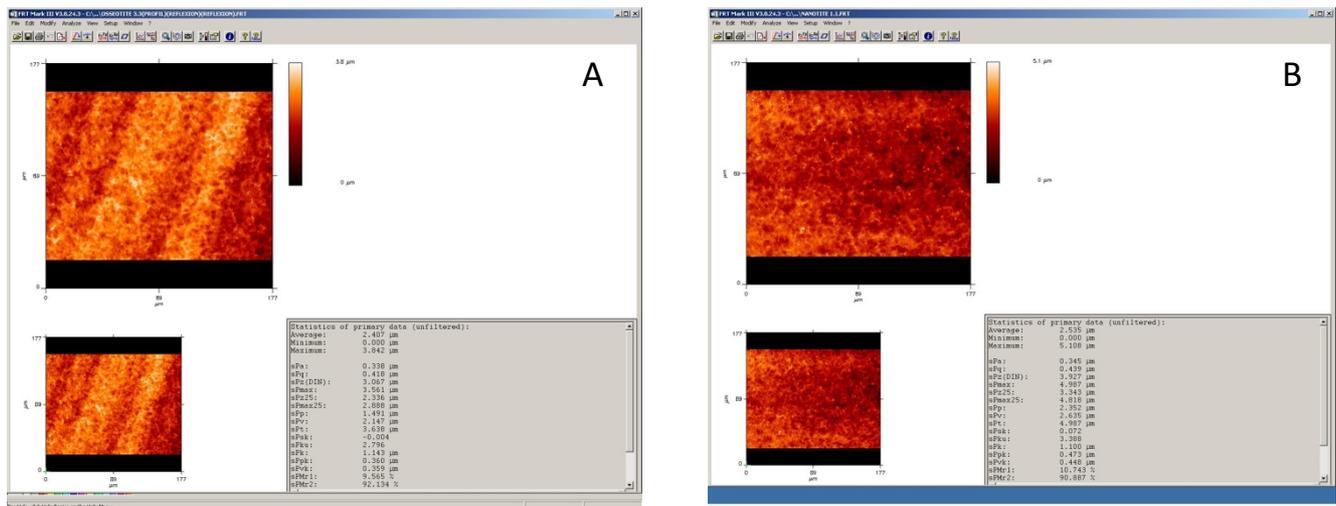


Figura 45: Imagen de una ventana del programa del programa FRT Mark III durante el análisis de la medición de un disco del grupo G (A) y del grupo GF (B) (tomada en Biomet 3i®)

#### 4.1.4.LIMPIEZA

Tras las mediciones realizadas con el microscopio confocal de escaneo láser, todos los discos volvieron a lavarse para eliminar posibles residuos introducidos durante su manipulación.

Los 40 discos del grupo M y los 40 del grupo G, se lavaron de nuevo en cubas de ultrasonidos industriales con una solución jabonosa a una temperatura controlada de 60°C y se secaron en horno de convección forzada.

Mientras que los discos del grupo GF, para no afectar al recubrimiento de hidroxiapatita, se lavaron con agua a un pH ligeramente básico a 70°C durante 15 minutos, y posteriormente se secaron en horno de convección forzada.

#### 4.1.5. ESTERILIZACIÓN POR RAYOS GAMMA

Tras el secado, todos los discos fueron introducidos en su empaquetamiento individual final sellado en sobres de plástico transparente y esterilizados mediante rayos gamma en Steris Corporation (Steris Corp. Applied Sterilization Technologies®. Harwell. Reino

Unido) manteniéndolos estériles hasta que se procedió a la apertura para ser empleados en los cultivos celulares.

El proceso se llevó a cabo utilizando como fuente de radiación el isótopo Cobalto 60 con una dosis de radiación gamma entre 25 y 38 kGy (condiciones indicadas para implantes de titanio). Las condiciones de esterilidad tras el proceso se garantizan durante 5 años, siempre que el empaquetamiento original se mantenga íntegro y sellado.

## **4.2. CULTIVO CELULAR *IN VITRO* DE LA LÍNEA CELULAR MG63**

### **4.2.1 CULTIVO CELULAR**

Para el cultivo *in vitro* se seleccionó la línea celular comercial MG63 (ATCC, referencia CRL-1427), con características osteoblásticas y obtenida a partir de un osteosarcoma humano.

Las células se cultivaron rutinariamente en frascos en un medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*) conteniendo un 10% de suero fetal bovino (inactivado por calor tras tratamiento durante 30 min a 56°C) (Fig. 46), glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, aminoácidos no esenciales a una concentración 1x, penicilina (100 unidades/mL) (Fig. 47) y estreptomycin (100 µg/mL). Fueron incubadas a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>/95% aire y al 100% de humedad relativa. El medio se cambió cada 2-3 días y cuando las células alcanzaron una densidad igual al 85-90% del estado de confluencia (es decir, cubriendo aproximadamente el 85-90% de la superficie sobre la que estaban adheridas) se trataron con una disolución de tripsina-EDTA (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc®. Waltham. EEUU) (Fig. 48). Se resuspendieron en medio de cultivo y se sembraron en nuevos frascos a una dilución de 1/5.

## MATERIAL Y MÉTODO



Figura 46: A) Medio de cultivo DMEM. B) Suero fetal bovino.



Figura 47: A) Aminoácidos no esenciales. B) Piruvato sódico.



Figura 48: A) Glutamina. B) Penicilina-Estreptomicina. C) Tripsina-EDTA.



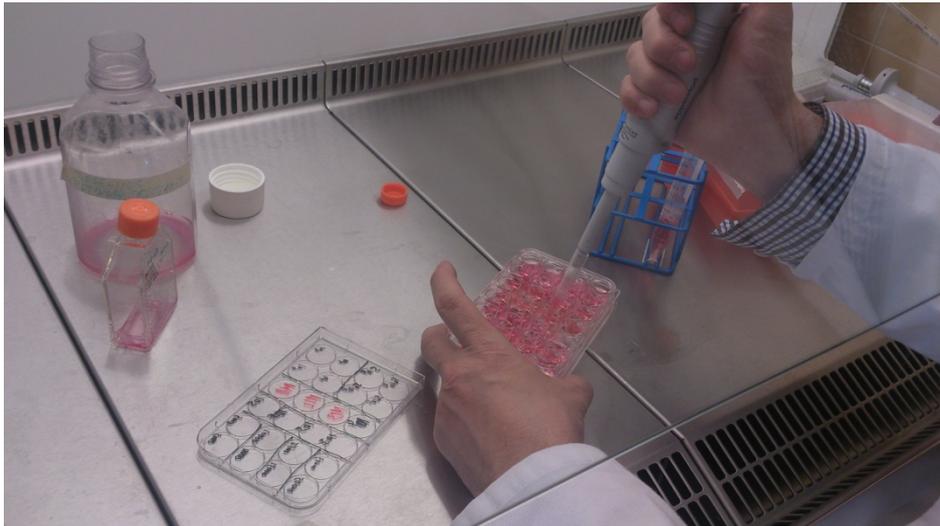


Figura 49: Manipulación de los cultivos celulares trabajando en condiciones de asepsia en el interior de una cabina de flujo laminar.

#### 4.2.2 SIEMBRA PARA LOS ENSAYOS

Los discos de titanio previamente esterilizados, se distribuyeron colocando un disco por pocillo en placas de 24 pocillos (superficie de cada pocillo,  $1.9 \text{ cm}^2$ ).

Con el fin de humectar los discos, se añadió a cada pocillo 1 mL de PBS precalentado a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Las placas se mantuvieron en el incubador a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 1 hora.

Las células MG63, cultivadas en las condiciones descritas, se trataron con una disolución de tripsina-EDTA para levantarlas del frasco de cultivo, se resuspendieron con medio de cultivo y se determinó su concentración mediante conteo de una alícuota en un hemocitómetro. Las células se diluyeron con medio de cultivo para obtener una suspensión de 6.400 células/mL.

Se retiró el mililitro de PBS de cada pocillo y se añadió a cada uno 1,5 mL de la suspensión de células. Por tanto, las células se sembraron a una densidad aproximada de 5.000 células/ $\text{cm}^2$ . Durante el proceso de siembra la suspensión de células se agitó regularmente para que se mantuviesen distribuidas homogéneamente por todo el

## MATERIAL Y MÉTODO

volumen, evitando su sedimentación. Las placas se introdujeron en el incubador y se mantuvieron en las condiciones descritas. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días.

Para determinar el efecto de la melatonina sobre las células MG63, en el medio de cultivo de la mitad de los discos de cada grupo se añadió melatonina (melatonina en polvo. Sigma® San Luis. EEUU) (Fig. 50). Se preparó una disolución de melatonina 100 mM disuelta en etanol al 96%, apto para cultivos celulares, que se esterilizó mediante filtración a través de un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Las alícuotas se mantuvieron a -20 °C hasta su uso. Cuando fue necesario cambiar el medio de cultivo conteniendo melatonina, se sacó del congelador una alícuota de melatonina 100 mM y se añadió al medio de cultivo el volumen necesario de manera que la concentración final fuese 50  $\mu\text{M}$ . El resto del volumen de esa alícuota de melatonina se desechó. Al ir disuelta en etanol, la concentración final de éste en el medio de cultivo fue del 0.048 %. Para evitar que cualquier efecto que esta concentración de etanol pudiese tener en las células pudiese ser atribuido a la melatonina, al medio de cultivo de las células cultivadas en ausencia de melatonina también se le añadió la misma cantidad de etanol.



Figura 50: Melatonina en polvo Sigma®.

### 4.2.3. ANÁLISIS DE ADHESIÓN, PROLIFERACIÓN Y MORFOLOGÍA CELULAR

#### 4.2.3.1. DISTRIBUCIÓN DE LOS DISCOS

Los discos se colocaron en placas de cultivo de 24 pocillos. La distribución se realizó colocando en cada una de ellas 5 discos de cada grupo (en orden consecutivo del 1 al 20) (Figura 51).

Como se ha mencionado, en la mitad de los discos de cada grupo se llevó a cabo la adición de melatonina a una concentración final de 50  $\mu$ M.

GF1	GF2	GF3	GF4	GF5		GF6	GF7	GF8	GF9	GF10	
G1	G2	G3	G4	G5		G6	G7	G8	G9	G10	
M1	M2	M3	M4	M5		M6	M7	M8	M9	M10	

GF11	GF12	GF13	GF14	GF15		GF16	GF17	GF18	GF19	GF20	
G11	G12	G13	G14	G15		G16	G17	G18	G19	G20	
M11	M12	M13	M14	M15		M16	M17	M18	M19	M20	

Figura 51: Representación de la distribución de los discos del 1 al 20 en las placas de cultivo.

### 4.2.3.2. PROCESADO DE LOS DISCOS

Tras concluir el periodo de incubación (24 y 72 horas) se seleccionaron 5 discos sin adición de melatonina y 5 con adición de melatonina de cada grupo y tiempo de cultivo. Es decir, un total de 30 discos para el análisis de adhesión y otros 30 discos para el de proliferación. Tras ello, estos mismos 60 discos se emplearon para el estudio de morfología celular.

Se retiró el medio de cultivo de cada pocillo y se lavaron los discos dentro de los pocillos con 1 mL de PBS preenfriado a 4°C, proceso que se repitió hasta un total de 3 veces. Tras retirar el PBS, se fijaron las células 30 minutos con glutaraldehído al 2,5 % en PBS, a temperatura ambiente.

Se retiró el glutaraldehído y se lavaron de nuevo 4 veces con PBS, tras lo que se tiñeron con 1,5 mL de eosina (Merck® Darmstadt, Alemania) disuelta al 2% en agua desionizada (obtenida por el sistema de desionización MilliQ) y acidulada ligeramente con ácido acético (0,7 g de eosina disueltos en 35 mL de agua de calidad MilliQ, a lo que se añadieron 10 mL de ácido acético glacial).

Tras incubar 3 minutos, se retiró la eosina y se añadió 1,5 mL de PBS en cada pocillo. Se retiró el PBS y se añadió de nuevo 1,5 mL. Este proceso de lavados se repitió dos veces más.

Por último, se incubaron con una disolución de 30 µM del fluoróforo DAPI, disuelto en PBS y mantenido en oscuridad a 4°C. Las muestras se mantuvieron en esta disolución a 4°C hasta su observación con el microscopio de fluorescencia.

Posteriormente, los discos se observaron con un microscopio de fluorescencia (Leica DM 4000 B, Leica Microsystems®, Wetzlar, Alemania). Se tomaron imágenes con la cámara digital DFC-310 XF (Leica Microsystems®), empleando los sistemas de filtros adecuados y el *software* Leica Applications Suite versión 4.4.0 (Leica Microsystems®) (Fig. 52 y 53). Para ello, se fueron colocando los discos de forma individual sobre un portaobjetos para su observación, manteniendo siempre una capa de líquido cubriendo la superficie de las células, ya que para su observación al microscopio no se colocó cubreobjetos sobre los discos para evitar dañar las células, por lo que se vigiló, si el tiempo de observación se alargaba, que la superficie del disco no llegase a secarse.

#### 4.2.3.3. ANÁLISIS DE ADHESIÓN Y PROLIFERACIÓN CELULAR

Para el análisis de adhesión y proliferación celular se tomaron entre 13-15 fotografías (para abarcar la superficie completa del disco) de cada uno de los 30 discos para el análisis de adhesión tras 24 horas y de los 30 para el análisis de proliferación tras 72 horas. Se empleó el objetivo 5x y filtro para la excitación y emisión propias del fluoróforo DAPI. Las fotos se tomaron de forma secuencial recorriendo la totalidad de la superficie de “arriba a abajo” y de “izquierda a derecha” (entre 3-4 fotos de lado a lado y 4 repeticiones de izquierda a derecha o derecha a izquierda). De forma que con el programa Photoshop CC versión 2015.1 (Adobe Systems Incorporated®. Mountain View. EEUU) (la función automática de Merge), se generó la imagen total compuesta del área superficial de cada disco (Fig. 54). Las imágenes calibradas se analizaron con el programa Image-Pro Plus versión 6.0.0.260 (MediaCybernetics®. Washington. EEUU). Se descompuso la imagen en las diferentes capas de colores y en la correspondiente al azul se fijaron los umbrales de intensidad para seleccionar de forma automática las zonas correspondientes a los núcleos celulares teñidos con el DAPI. La imagen fue examinada para corregir posibles errores cometidos durante la selección automática. Tras convertir la imagen a una imagen en blanco y negro, se contó automáticamente el número de partículas (núcleos) presentes en toda la superficie del disco. Mediante el mismo programa se determinó la superficie útil del disco, lo que permitió calcular la densidad celular (estimada como número de núcleos por unidad de superficie) (Fig. 55-57).

## MATERIAL Y MÉTODO

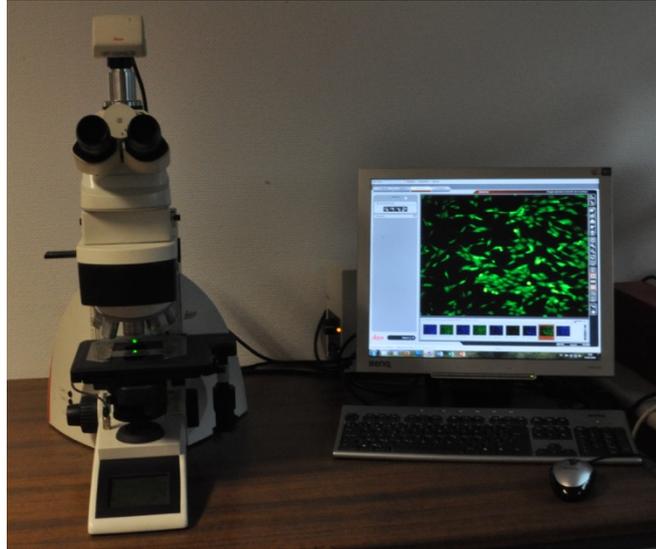


Figura 52: Microscopio de fluorescencia Leica DM 4000 B.



Figura 53: Detalle del análisis de un disco en el microscopio de fluorescencia Leica DM 4000 B.

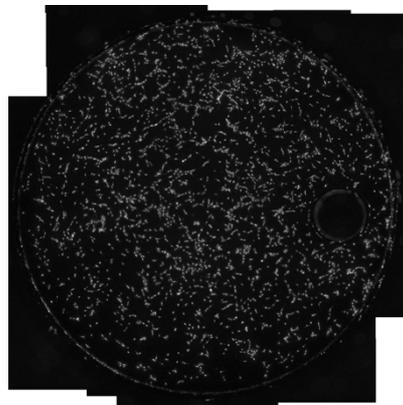


Figura 54: Fotografía del disco completo G6 (5×).

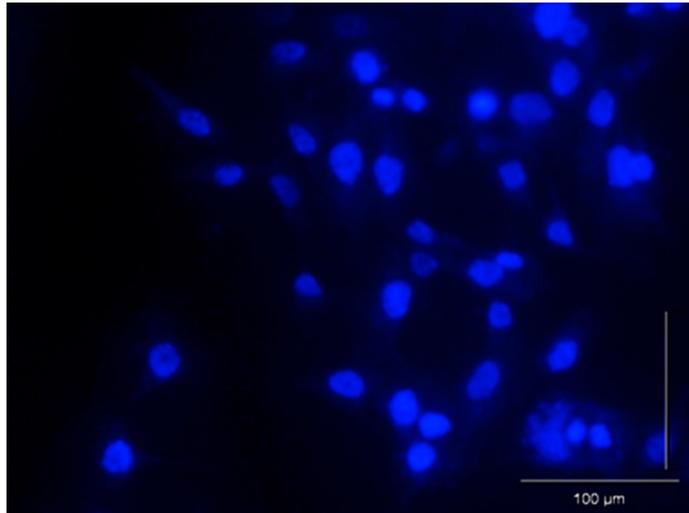


Figura 55: Microfotografía de un disco del grupo G mostrando la fluorescencia debida al DAPI.

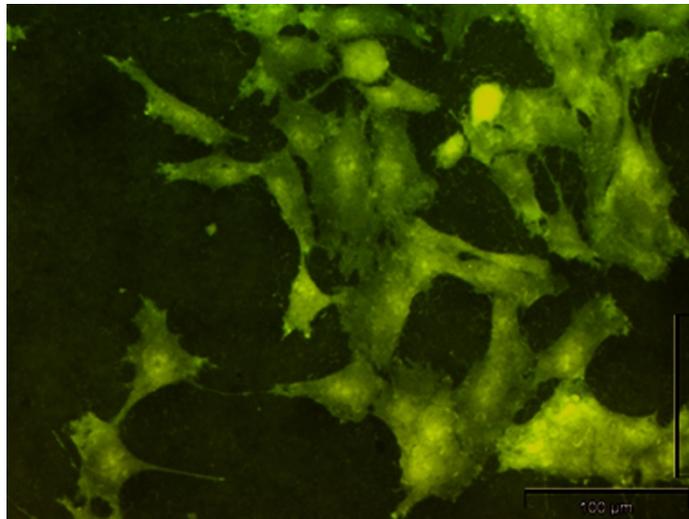


Figura 56: Microfotografía de un disco del grupo G mostrando la fluorescencia debida a la eosina.

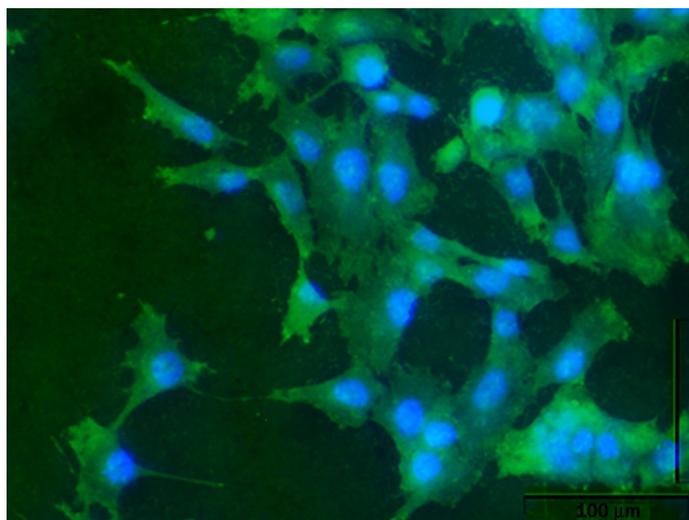


Figura 57: Composición de las microfotografías mostradas en las figuras 55 y 56.

#### 4.2.3.4. ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA CELULAR

Para llevar a cabo el análisis morfométrico, se emplearon los 60 discos del estudio de adhesión y proliferación celular. En cada uno de ellos se seleccionaron al azar 5 regiones empleando el objetivo 10x y se tomaron 2 imágenes de cada una de ellas, una con los filtros adecuados para ver la fluorescencia debida al DAPI (región de longitud de onda del azul); y otra con los filtros adecuados para la fluorescencia debida a la eosina (región de longitud de onda del verde). Ambas imágenes al superponerse nos dan una imagen compuesta más clara para el correcto estudio de los diferentes patrones morfológicos al poder determinar la presencia de una o más células (uno o más núcleos observados al incorporar el fluoróforo DAPI) y su morfología (superficie celular observada al teñirse las proteínas celulares con eosina) (Fig. 58).

Las imágenes se analizaron con el programa Image-Pro Plus. En cada una de las 5 fotografías compuestas de cada disco se delimitó el citoplasma celular de las células MG63 cultivadas, obteniendo valores del área total de la célula y el índice de redondez (Fig. 59). Tras ello, se seleccionaron las 500 primeras mediciones de cada grupo (M, G y GF y sus respectivos grupos en que se adicionó melatonina) para su análisis estadístico.

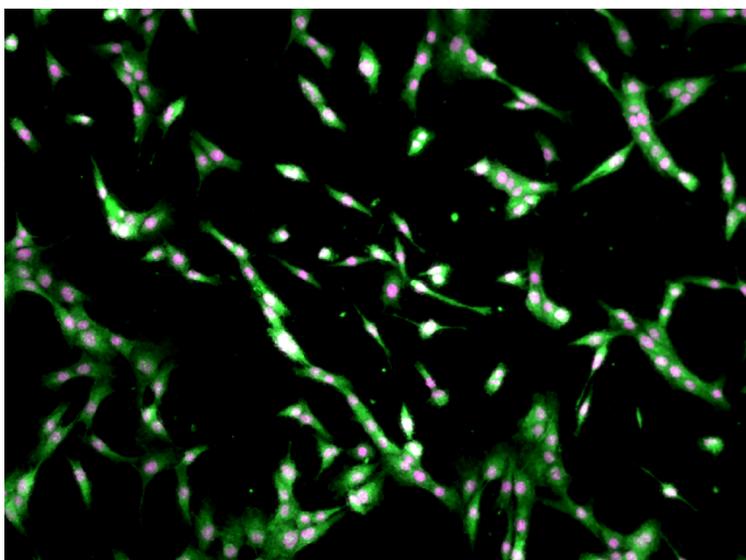


Figura 58: Microfotografía compuesta de parte de la superficie del disco G6 a 10x.



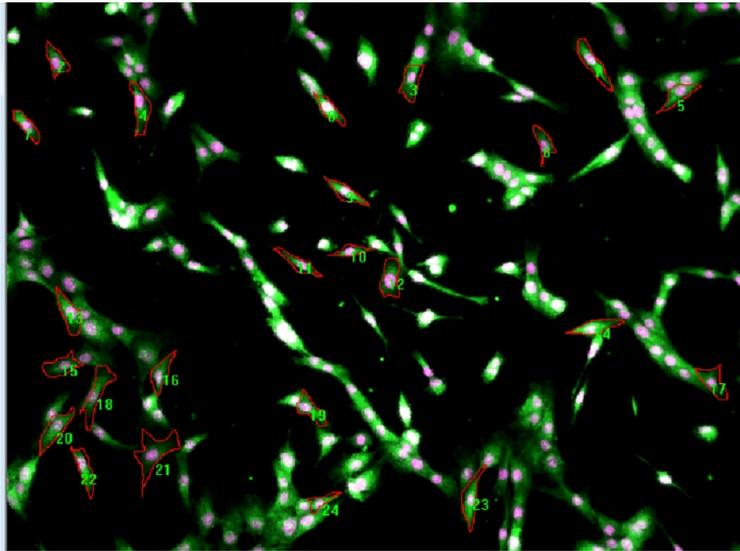


Figura 59: Delimitación del citoplasma celular de algunas células del disco G6 mostradas en la figura 58.

#### 4.2.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

##### 4.2.4.1. PROCESADO DE LAS MUESTRAS PARA SU OBSERVACIÓN A SEM

Para el estudio con microscopio electrónico de barrido (SEM) (Jeol JSM 6300. Oxford Instruments Ltd®. Abingdon. Reino Unido) se prepararon 12 discos seleccionados al azar (2 discos de cada grupo por cada tiempo de cultivo, uno con adición de melatonina y otro sin adición de melatonina) de entre los discos utilizados para el análisis de adhesión y proliferación celular tras 24 y 72 horas de cultivo, respectivamente. La toma de imágenes a SEM se realizó únicamente tras el cultivo para poder optimizar la información obtenida de los discos empleados en el estudio, ya que para la observación a SEM tienen que procesarse recubriéndolos con oro, como veremos a continuación, y tras ello no habrían podido utilizarse para el cultivo. Pero en las mismas imágenes pudo realizarse un análisis cualitativo de las diferentes superficies, ya que al ser periodos cortos de cultivo, los discos presentaban parte de la superficie libre de células.

## MATERIAL Y MÉTODO

Las muestras para observación con SEM deben cumplir dos condiciones: estar secas y ser conductoras.

El proceso de secado debe llevarse a cabo preservando al máximo la estructura original de la muestra.

Para ello, tras realizar el análisis morfométrico el medio acuoso de los discos se sustituyó por etanol absoluto hasta realizar el proceso de “punto crítico” mediante el cual se deshidratan las células en atmósfera de CO<sub>2</sub> de manera controlada para la perfecta conservación del estado y morfología celular, proceso que se llevó a cabo con un secador de punto crítico Polaron E300 (Quorum Technologies®. Lewes. Reino Unido) (Fig. 60).

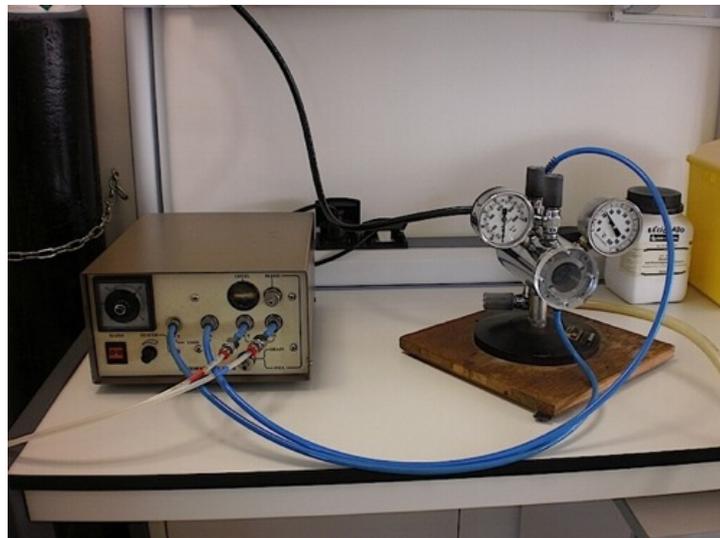


Figura 60: Secador de punto crítico Polaron E3000 (tomada de Servicio de Microscopía Electrónica UPV).

Finalmente, los discos se orificaron mediante un proceso en bajo vacío para hacer conductora su superficie y poder observarla a SEM. Para ello, las muestras se adhirieron a un soporte metálico mediante una tira adhesiva. Una vez fijadas, se introdujeron en un equipo de metalización y gracias a la técnica de evaporización se depositó una finísima capa de oro sobre la superficie de dichas muestras. Para el proceso de orificación se utilizó un recubridor Bal-Tec. Modelo SCD 005 (Leica Microsystems®) (Fig. 61).

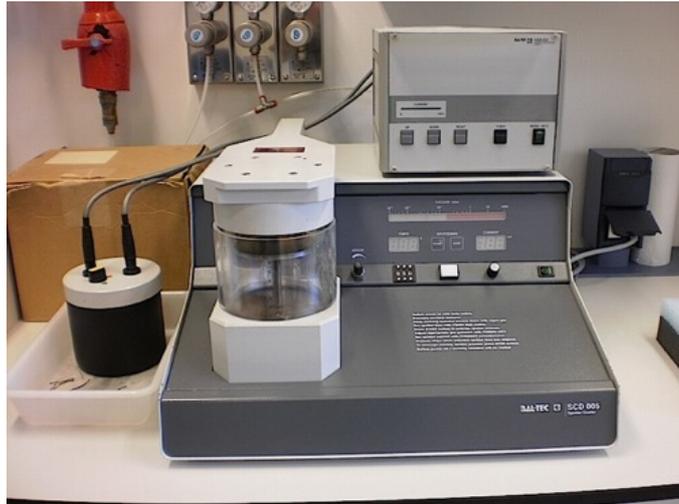


Figura 61: Recubridor Bal-Tec. Modelo SCD 005 (tomada de Servicio de Microscopía Electrónica UPV).

A continuación, se introdujeron las muestras orificadas en el SEM.

Las imágenes obtenidas a través de un microscopio óptico son imágenes de la muestra a mayor aumento, mientras que las obtenidas por el SEM se forman por radiaciones emitidas por la propia muestra, de este modo, la imagen que observamos no corresponde a la muestra ampliada y visualizada a través del microscopio electrónico, sino que es una imagen formada a partir de la información recibida y analizada de dichas radiaciones.

Estas radiaciones provenientes de la muestra son provocadas por el haz de electrones emitido desde el propio microscopio electrónico. El funcionamiento de este microscopio se basa en un haz de electrones procedentes de un filamento que es acelerado y focalizado mediante una serie de lentes electromagnéticas hacia una muestra.

Debido a la interacción que sufren estos electrones con la muestra, se generan una serie de señales que, convenientemente recogidas y amplificadas, permiten obtener información de ésta tanto desde un punto de vista microscópico como de su composición química.

Los aumentos que se pueden conseguir con este microscopio oscilan entre 10x y 200.000x.

Las señales o radiaciones emitidas desde la muestra son de tres tipos y cada de ellas se recoge gracias a un detector diferente:

-Detector de electrones secundarios: recoge los electrones que la muestra emite debido a la interacción con el haz incidente. El número y la intensidad con que estos electrones alcanzan la pantalla fluorescente son inversamente proporcionales a la distancia que han recorrido desde su punto de emisión. Por tanto, su proyección sobre la pantalla representa fidedignamente la topografía de la muestra. Esta representación nos aporta la morfología o relieve de la superficie de la muestra con la típica imagen en blanco y negro. Es la señal más adecuada para la observación de la muestra por ser la de mayor resolución.

-Detector de electrones retrodispersados: recoge los electrones procedentes del haz incidente que son dispersados por la superficie del material en la misma dirección de llegada. La intensidad de retrodispersión del electrón es directamente proporcional a su masa atómica, por lo que elementos diferentes se observan con más o menos brillo según sean más o menos pesados.

Así como los electrones secundarios nos aportaban información sobre la morfología de la muestra, los electrones retrodispersados nos ayudan a tener una imagen composicional, es decir, nos están indicando la presencia de elementos pesados en la muestra que variarán su brillo en función de su número atómico.

Los átomos más pesados, con mayor probabilidad de emitir electrones retrodispersados, proporcionan imágenes claras y, por el contrario, los átomos con menor número atómico proporcionan imágenes más oscuras. De esta forma, obtenemos también una imagen de la superficie pero de menor resolución.

-Detector de rayos X: recoge los fotones que la muestra emite en forma de radiación X debido a la interacción con el haz incidente. Estas señales son recogidas en un espectrómetro de RX, que separa las líneas de energía emitidas por los diferentes

elementos contenidos en la muestra, y por comparación con patrones, permite identificar dichos elementos tanto de forma cualitativa como cuantitativa, ya que la intensidad de la radiación es proporcional a la concentración del elemento.

Por tanto, desde un punto de vista práctico, estas imágenes pueden aportar información microestructural mediante imágenes electrónicas, bien de electrones secundarios o de electrones retrodispersados, e información analítica o composicional mediante la señal de rayos X característicos (Fig. 62).



Figura 62: Microscopio electrónico Jeol JSM 6300 (tomada de Servicio de Microscopía Electrónica UPV).

Se obtuvieron diferentes imágenes de diversas zonas de la superficie de los 12 discos seleccionados aleatoriamente a 25 $\times$ , 100 $\times$ , 500 $\times$ , 1000 $\times$ , 1500 $\times$ , 2000 $\times$ , 3000 $\times$ , 4000 $\times$ , 5000 $\times$ , 6000 $\times$  y 7000 $\times$ .

### 4.2.5. DIFERENCIACIÓN OSTEOBLÁSTICA. CUANTIFICACIÓN DE ARNm ESPECÍFICOS

Para la cuantificación de ARNm específicos se empleó el resto de discos de cada grupo (discos del 21 al 40), que se cultivaron en placas de 24 pocillos de forma análoga a la descrita en el apartado 4.2.3.1.

#### 4.2.5.1. PURIFICACIÓN DEL ARN TOTAL

Con el fin de determinar si el crecimiento de las células sobre los diferentes discos provocaba cambios en la expresión de genes relacionados con la diferenciación osteoblástica de las células, se cultivaron las células MG63 sobre 5 discos de cada grupo sin adición de melatonina y 5 con adición de melatonina, de forma análoga a la descrita en el apartado 4.2, durante 1 y 5 semanas. Obteniendo un total de 30 discos para el cultivo de 1 semana y 30 para el de 5 semanas. A tiempos largos de cultivo la población de células que crecen sobre el disco será minoritaria con respecto a la que poco a poco crezca sobre la superficie de plástico del pocillo no cubierta por el disco. Para evitar la posible influencia que factores que secreten estas células tengan sobre las crecidas sobre los discos, los discos se pasaron a una placa nueva el día 3 (placas mantenidas en cultivo en total 1 y 5 semanas) y los días 13 y 23 (placas mantenidas en cultivo en total 5 semanas) de cultivo.

Cuando se cumplió el tiempo de cultivo (1 y 5 semanas) las células crecidas sobre los discos (o sobre cubreobjetos de vidrio) fueron lisadas y este lisado procesado con el fin de obtener ARN. Se preparó una placa nueva de 24 pocillos, conteniendo 1 mL de TBS frío en cada pocillo, y se mantuvo sobre hielo. Los discos se transfirieron a estos pocillos y, procesando disco a disco, se retiró el TBS del pocillo empleando una pipeta automática y se añadieron 75  $\mu$ L de TBS previamente esterilizado y conteniendo 0,02% del detergente Triton X-100. Con ayuda de la punta de plástico de una pipeta automática de 100  $\mu$ L se raspó la superficie del disco, succionando y echando el líquido varias veces sobre la superficie del disco con el fin de lisar las células y recoger el material solubilizado. Este volumen se pasó a un tubo de 500  $\mu$ L mantenido en hielo. Se añadieron 75  $\mu$ L más de TBS conteniendo Triton X-100 sobre el disco, se repitió el

proceso de raspado y este volumen se pasó de nuevo al tubo (volumen total final teórico recogido de la células lisadas, 150  $\mu$ L).

Para lisar totalmente las células, los tubos con las muestras se congelaron con nitrógeno líquido y se descongelaron rápidamente introduciéndolos en un baño de agua, a 37 °C; este proceso se repitió dos veces más.

Para obtener ARN total, 25  $\mu$ L del lisado de las células se pasaron a un tubo de 1,5 mL y se añadieron 500  $\mu$ L de TRIzol (ThermoFisher Scientific). Tras agitar brevemente, se mantuvo 15 min a temperatura ambiente y posteriormente a -20 °C, hasta que se purificó el ARN.

Para purificar el ARN se siguió el protocolo recomendado cuando se emplea el reactivo TRIzol, y se utilizaron los reactivos adecuados y se tomaron todas las precauciones necesarias para trabajar con ARN. Así, tras dejar que la muestra se atempere a temperatura ambiente, se añadieron 100  $\mu$ L de cloroformo, se agitó el tubo breve pero vigorosamente, se incubó 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 $\times$ g durante 10 min, a 4 °C. Se pasaron 200  $\mu$ L de la fase superior, acuosa, a un nuevo tubo y se añadió 1  $\mu$ L de glucógeno (200  $\mu$ g/ $\mu$ L), para favorecer la precipitación del ARN, y 250  $\mu$ L de isopropanol. Tras incubar 10 min a temperatura ambiente se mantuvieron 15 min a -20 °C. Tras centrifugar en las mismas condiciones descritas en el paso anterior el sedimento, que corresponde al ARN precipitado, se lavó dos veces con etanol a 75 %, se dejó secar a temperatura ambiente, se disolvió en 25  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O y se mantuvo a -80 °C hasta su uso.

#### 4.2.5.2. RETROTRANSCRIPCIÓN Y PCR CUANTITATIVA DE GENES ESPECÍFICOS

La cantidad total de ARN presente en las muestras y su pureza se determinó midiendo la absorbancia de las disoluciones empleando un espectrofotómetro NanoDrop. Para obtener el ADN copia o complementario (ADNc) a partir del ARN se utilizó el kit de transcripción inversa TaqMan *Reverse Transcription* (ThermoFisher Scientific®). Se emplearon 200 ng del ARN total y la retrotranscripción se realizó en un volumen final de

35  $\mu$ L, siguiendo el procedimiento recomendado por la casa comercial. Las muestras de ADNc obtenidas se mantuvieron a -20 °C hasta su uso.

Se cuantificó la expresión de los genes de la fosfatasa alcalina (ALP), colágeno tipo I (COLT-1) (en concreto el gen que codifica las cadenas proteicas alfa-1), osteocalcina (OCN), endopeptidasa transmembrana ligada al cromosoma X y osteonectina (Tabla 2). Como gen doméstico (*housekeeping*) normalizador se empleó el gen GAPDH. La cuantificación de cada gen se realizó por triplicado, empleando placas de 384 pocillos y los ADNc obtenidos según se ha indicado. Se emplearon los *TaqMan gene expression assays* específicos de cada gen y la *TaqMan® Universal PCR Master Mix*, así como las condiciones recomendadas por la casa comercial. La reacción de PCR se realizó en un termociclador 7900HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems® Foster City. EEUU).

SÍMBOLO DEL GEN	PROTEÍNA QUE CODIFICA
<b>ALPL</b>	ALP (fosfatasa alcalina)
<b>COLIA1</b>	COLT-1 (cadena alfa-1 del colágeno tipo 1)
<b>BGLAP</b>	OCN (osteocalcina)
<b>PHEX</b>	Endopeptidasa transmembrana
<b>SPARC</b>	Osteonectina

Tabla 2: Genes evaluados en la RT-PCR.

Mediante el programa de análisis del termociclador 7900HT *Real-Time PCR System* se calculó el valor de Ct (ciclo umbral, *cycle threshold*) de cada muestra amplificada y, para normalizarlos, se le restó el correspondiente al gen GAPDH, obteniendo el valor  $\Delta$ Ct ( $\Delta$ Ct). Se obtuvo el valor promedio de las 3 réplicas analizadas de cada muestra experimental (descartando posibles valores anómalos). Como estado de referencia se consideró el nivel de expresión que mostraban las células crecidas sobre los discos M en



cada una de las situaciones experimentales (cultivo de las células durante 1 o 5 semanas, y en ausencia o presencia de melatonina). Para estimar la expresión relativa de cada gen con respecto a ese estado de referencia se restó a cada valor de dCt el correspondiente al valor promedio de dCt de ese mismo gen calculado en las células cultivadas en los 5 discos M, obteniéndose el valor ddCt ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ ). Por último, se calculó el valor promedio de *fold change* (“veces de cambio, número de veces”, proporción en que un gen se expresa en una muestra con respecto a la expresión observada en otra tomada como referencia) considerando el valor  $2^{-\text{ddCt}}$  de los 5 discos de cada grupo experimental.

### 4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS versión Statistics Standard 21.0 (IBM®. Nueva York. EEUU) y el programa GraphPad Prism versión 6.01 (GraphPad Software® San Diego. EEUU).

#### A. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RUGOSIDAD

La rugosidad fue una de las variables respuesta primaria del estudio estadístico. Se midió en  $\mu\text{m}$  y se obtuvo, para cada disco, como el promedio de 3 valores consecutivos, por lo que se calculó el coeficiente de correlación intraclase para evaluar el grado de reproducibilidad entre esas 3 mediciones. El análisis descriptivo proporcionó los estadísticos más relevantes para la variable rugosidad: media, desviación estándar, mínimo, máximo y mediana. Se proporcionaron también los intervalos de confianza al 95% para la rugosidad media.

La normalidad de la variable se contrastó mediante test de Kolmogorov-Smirnov. La homogeneidad de las varianzas en los diferentes grupos se evaluó mediante test de Levene. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor para determinar si el nivel medio de rugosidad puede o no considerarse homogéneo en los distintos grupos. Las comparaciones múltiples a posteriori estuvieron basadas en la prueba T2 de Tamhane, para ajustar los resultados a la heterocedasticidad detectada. El nivel de significatividad

empleado en los análisis fue el 5% ( $p < 0,05$ ). Para un nivel de confianza del 95% y considerando un tamaño del efecto a detectar  $f = 0,25$  (medio), la potencia alcanzada con el test F del modelo lineal general es 0,68 para detectar diferencias en las medias de rugosidad de los grupos.

### B. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE ADHESIÓN Y PROLIFERACIÓN

Para el estudio estadístico de adhesión y proliferación celular en los 60 discos seleccionados para ello, se tomó como variable primaria la densidad celular (células/mm<sup>2</sup>), obtenida con los datos de recuento total de células por disco y la superficie total neta del disco (mm<sup>2</sup>). Se aplicaron pruebas no paramétricas de Mann-Whitney. El nivel de significatividad empleado en los análisis fue el 5% ( $p < 0,05$ ).

### C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA MORFOLOGÍA CELULAR

Se tomó como variables primarias del estudio morfológico el área e índice de redondez celular. Los datos corresponden a los tomados en los 60 discos seleccionados para el estudio morfológico. Se realizaron mediciones delimitando el citoplasma celular de 500 células por grupo (M, G y GF y sus respectivos grupos en los que se adicionó con melatonina) Y para los dos tiempos de cultivo, 24 y 72 horas. Por tanto, la muestra para el análisis estadístico estuvo constituida por datos de un total de 6000 células (500 células x 6 grupos x 2 tiempos de cultivo). El valor del área (en  $\mu\text{m}^2$ ) se obtuvo marcando el perímetro de cada célula y la redondez considerando el valor calculado por el programa (relación entre el diámetro de un círculo que tuviese la misma área que la medida en la célula y el eje mayor medido en esa célula), siendo el valor 1 el correspondiente a un círculo perfecto y estando relacionado un valor superior a 1 con una menor redondez. Se aplicaron pruebas no paramétricas de Mann-Whitney. De nuevo el nivel de significatividad empleado en los análisis fue el 5% ( $p < 0,05$ ).

#### D. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN MEDIANTE CUANTIFICACIÓN DE ARNm ESPECÍFICOS

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en la cuantificación de los ARNm se realizó comparando los valores de  $2^{-ddCt}$  mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, con un nivel de significatividad de los análisis del 5% ( $p < 0,05$ ).

## CONCLUSIONES

## **5. RESULTADOS**

---



## 5.1. RUGOSIDAD SUPERFICIAL

### 5.1.1. MICROSCOPIA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Las imágenes tomadas con microscopio óptico, nos muestran cómo ya a pocos aumentos pueden apreciarse claramente diferencias entre los discos mecanizados (grupo M) (Fig. 63) y los discos tratados (grupos G y GF) (Fig. 64).

Los discos mecanizados muestran una superficie brillante en la que se aprecian claramente las líneas concéntricas regulares típicas del proceso de mecanizado de los discos. Mientras que en los discos tratados, la superficie presenta un patrón punteado arenoso mate, característico tras el proceso de grabado ácido.

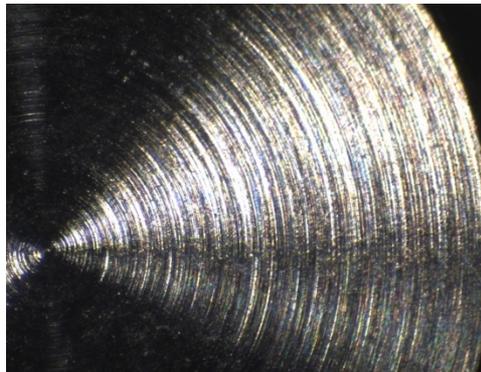


Figura 63: Fotografía de la superficie de un disco del grupo M tomada con microscopio óptico a 35x.



Figura 64: Fotografía de la superficie de un disco del grupo G tomada con microscopio óptico a 35x.

## RESULTADOS

Las microfotografías tomadas con SEM nos muestran, ya a mayores aumentos, estas diferencias en la superficie. En los discos del grupo M, de nuevo se aprecian las líneas que produce el mecanizado (Fig. 65.A), mientras que en los discos tratados, tanto del grupo G como del grupo GF, se observa una microtexturización característica con pocillos irregulares o pequeñas oquedades (Fig. 65.B).

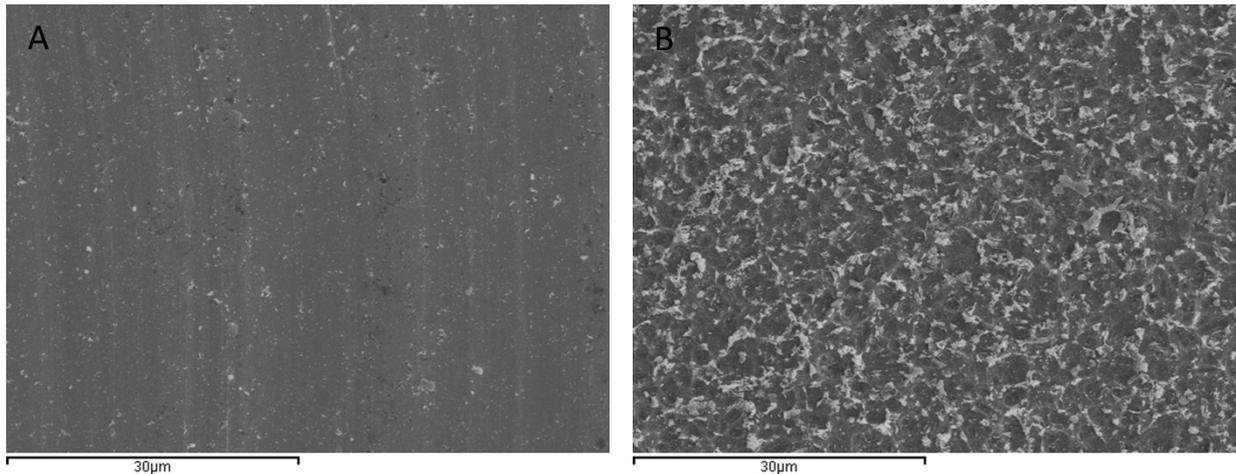


Figura 65: Microfotografías tomadas con microscopio electrónico de barrido a 2000x. A) Imagen de un disco del grupo M. B) Imagen de un disco del grupo G.

### 5.1.2. MICROSCOPÍA CONFOCAL DE ESCANEADO LÁSER

Tras medir la rugosidad de todos los discos del estudio mediante microscopio confocal de escaneado láser, obtuvimos un total de 360 valores de Ra (Tablas 1-3 de Anexos). En primer lugar, realizamos un estudio de homogeneidad de las medidas. Para cada disco se realizaron, como se ha explicado anteriormente, 3 mediciones en 3 puntos distintos elegidos al azar. Debido a la posible heterogeneidad de la superficie del disco, se calculó el coeficiente de correlación intracase (CCI) para evaluar el grado de reproducibilidad entre las 3 mediciones (Tabla 3):



	CCI
1ª vs. 2ª	0,89
1ª vs. 3ª	0,83
2ª vs 3ª	0,88
media 3 comparaciones	0,87

Tabla 3: Reproducibilidad entre mediciones: coeficiente de correlación intraclase (CCI).

Se obtuvieron valores entre 0,80 y 0,90, lo que se interpretaría como una bastante alta reproducibilidad, según la referencia siguiente (Tabla 4):

Rango CCI	Reproducibilidad
>0,90	Muy buena
0,71 - 0,90	Buena
0,51 – 0,70	Moderada
0,31 – 0,50	Mediocre
<0,30	Mala/muy mala

Tabla 4: Correspondencia del rango CCI con la reproducibilidad de las mediciones.

#### 5.1.2.1. ESTUDIO DE LA RUGOSIDAD MEDIA (Ra)

Los resultados del análisis de rugosidad media (Ra), nos muestran que los discos más rugosos fueron los del grupo GF, con un Ra de  $0,354 \pm 0,088 \mu\text{m}$ ; seguidos de los del grupo G con un Ra de  $0,266 \pm 0,037 \mu\text{m}$ ; y por último los discos del grupo M, con un Ra de  $0,131 \pm 0,052 \mu\text{m}$  (Gráfico 1).

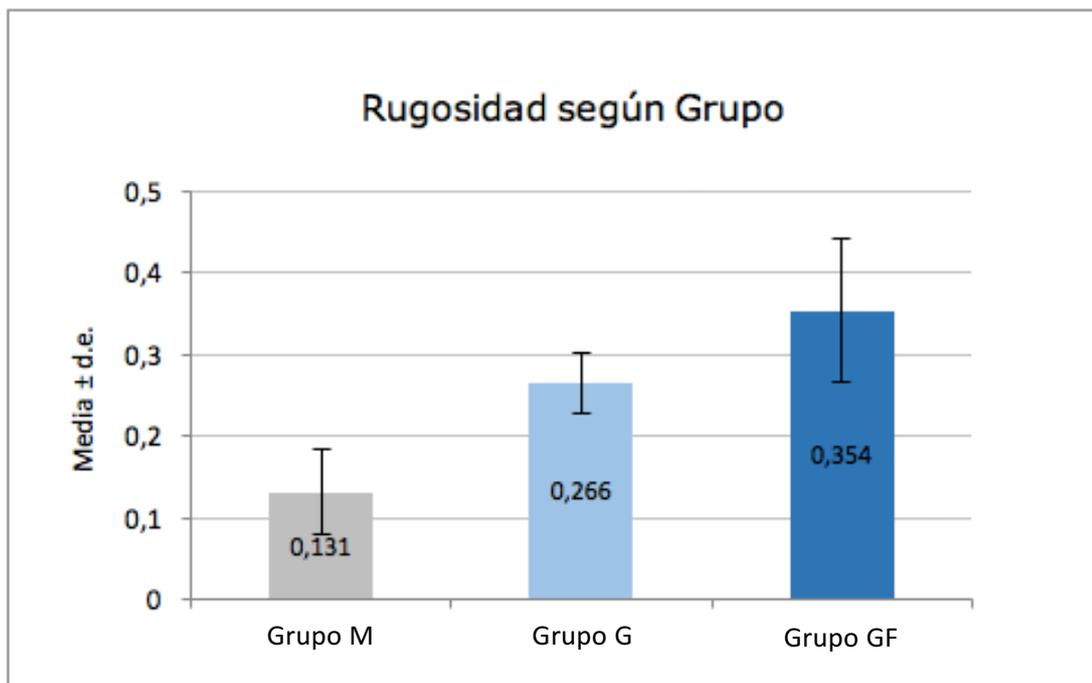


Gráfico 1: Representación gráfica del Ra de los diferentes grupos.

La siguiente tabla (Tabla 5) presenta los datos de rugosidad obtenidos de los diferentes grupos de estudio.

	GRUPO			
	Total	Control M	Test G	Test GF
<b>N</b>	120	40	40	40
<b>Media</b>	0,251	0,131	0,266	0,354
<b>Desviación típica</b>	0,111	0,052	0,037	0,088
<b>IC 95%</b>	0,230 – 0,271	0,115 – 0,148	0,254 – 0,278	0,327 – 0,383
<b>Mínimo</b>	0,063	0,063	0,213	0,225
<b>Máximo</b>	0,585	0,359	0,349	0,585
<b>Mediana</b>	0,256	0,120	0,257	0,327

Tabla 5: Rugosidad según grupos de estudio.

Para cada uno de los grupos puede completarse la información mediante la estimación del intervalo de confianza al 95%: (0,115 – 0,148) para el grupo M, (0,254 – 0,278) para el grupo G y (0,327 – 0,383) para el grupo GF.

Para el grupo G, la mediana fue de 0,257  $\mu\text{m}$ , es decir, la mitad de los discos utilizados en el estudio presentaron un nivel superior de rugosidad. Para el grupo GF, fue de 0,327  $\mu\text{m}$ , mientras que para el grupo M fue de 0,120  $\mu\text{m}$ . El siguiente gráfico de cajas y bigotes representa éstos y otros resultados del estudio estadístico.

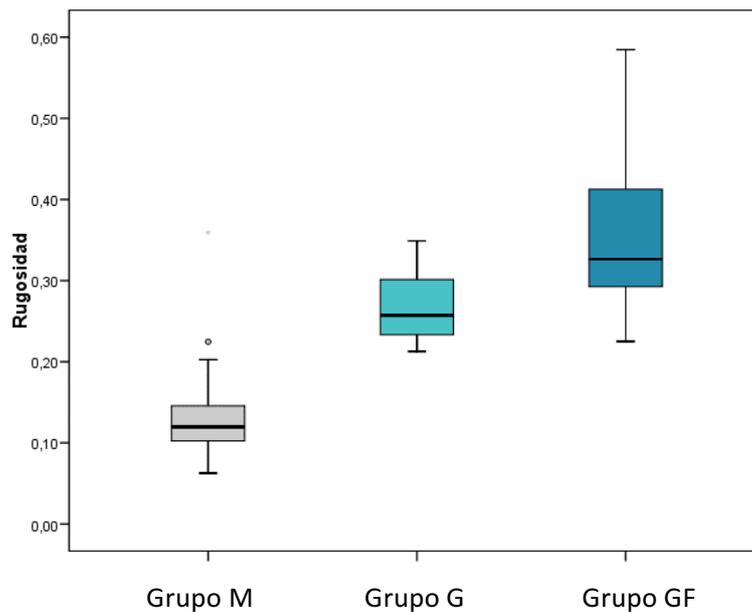


Gráfico 2: Gráfico de cajas y bigotes de los resultados de rugosidad.

La caja concentra al 50% de los casos, siendo la mediana la línea horizontal que la divide. Los bordes superior e inferior de la caja se corresponden con el 1º y 3º cuartil, por debajo de los cuales está el 25% y 75% respectivamente de la muestra. Los “bigotes” se extienden hasta los valores en un rango aceptable, por encima de los cuales están los atípicos (circulados) y los extremos (estrellados).

Se verificó la hipótesis de normalidad y homogeneidad de varianzas, para una aplicación fiable del posterior modelo ANOVA. El test de Kolmogorov-Smirnov concluyó que sólo en el grupo G puede aceptarse un ajuste suficiente a la normal ( $p=0,175$ ). En los otros dos grupos, se advirtió una cierta asimetría a la derecha ( $p<0,001$ ). El test de Levene concluyó que existe heterogeneidad de las varianzas ( $p<0,001$ ). Es decir,

## RESULTADOS

independientemente del nivel medio de rugosidad de cada grupo, la variabilidad observada no es comparable.

Aunque la muestra por grupo fue de tamaño moderado ( $n=40$ ), las desviaciones detectadas hicieron adecuada la transformación de la variable respuesta. Con una transformación de la familia Box-Cox de potencia  $-0,9$  se consiguió la normalización de la variable, pero no la homogeneidad de varianzas. Esto permitió la aplicación fiable del modelo ANOVA, pero para controlar el problema de la heterocedasticidad, se utilizó una prueba de comparación múltiple específica para este tipo de situaciones, el test T2 de Tamhane.

Se encontraron diferencias significativas en la rugosidad media de los 3 grupos ( $p<0,001$ ).

Para comparaciones dos a dos, éstos fueron los resultados:

	CONTROL M	TEST G	TEST GF
CONTROL M			
TEST G	<0,001***		
TEST GF	<0,001***	<0,001***	

\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$

Tabla 6: Comparación de rugosidad media entre pares de grupos. Resultados test T2 de Tamhane.

La rugosidad media del grupo G fue significativamente superior a la del control ( $p<0,001$ ).

La rugosidad media del grupo GF fue significativamente superior a la del control ( $p<0,001$ ).

La rugosidad media del grupo GF fue significativamente superior a la del grupo G ( $p<0,001$ ).

## 5.2. ANÁLISIS DE ADHESIÓN Y PROLIFERACIÓN CELULAR

La totalidad de los datos de densidad celular (células/mm<sup>2</sup>) obtenidos tras el recuento celular en los discos de los diferentes grupos de estudio mediante microscopía de fluorescencia, se muestran en las tablas 4-7 de Anexos, así como los datos necesarios para el cálculo de la densidad celular por grupo (número total de células por disco y superficie total neta del disco). Mientras que la siguiente tabla y el siguiente gráfico, recogen los promedios y desviación estándar (SD) de densidad celular por grupo, en presencia y ausencia de melatonina (Tabla 7; Gráficos 3 y 4).

		DENSIDAD CELULAR (células/mm <sup>2</sup> )	
		MEDIA	DESV. ESTÁNDAR
24 H (ADHESIÓN)	GRUPO M	84,40	39,52
	GRUPO G	89,28	35,93
	GRUPO GF	53,51	16,43
	GRUPO M + M	129,51	28,92
	GRUPO G + M	125,50	35,36
	GRUPO GF + M	93,10	59,92
72 H (PROLIFERACIÓN)	GRUPO M	364,70	61,92
	GRUPO G	306,46	201,83
	GRUPO GF	161,26	79,71
	GRUPO M + M	611,60	74,07
	GRUPO G + M	444,37	125,59
	GRUPO GF + M	109,22	63,89

Tabla 7: Promedios y desviación estándar de densidad celular obtenidos en los diferentes grupos tras 24 y 72 horas de cultivo, tanto en ausencia como en presencia de melatonina.

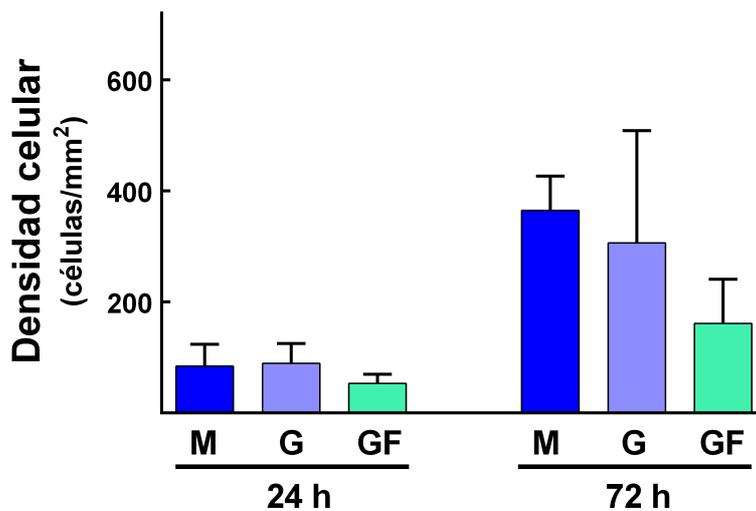


Gráfico 3: Representación gráfica de los promedios y desviación estándar de densidad celular tras 24 y 72 horas de cultivo en ausencia de melatonina.

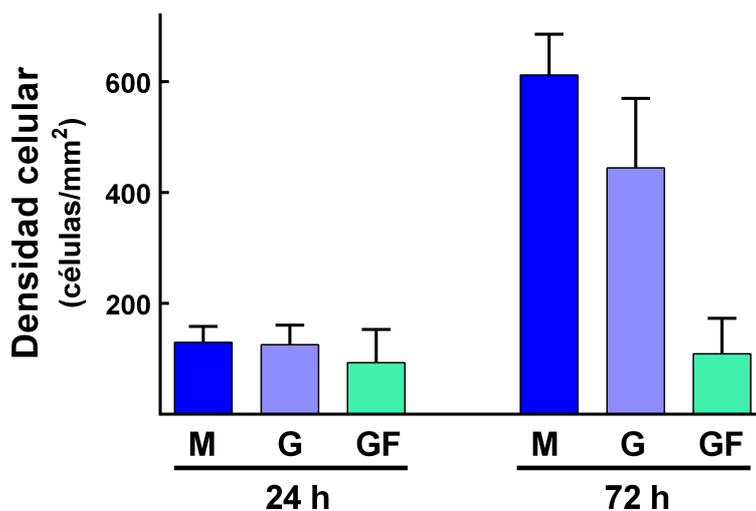


Gráfico 4: Representación gráfica de los promedios y desviación estándar de densidad celular tras 24 y 72 horas de cultivo en presencia de melatonina.

Tras analizar los datos obtenidos mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney aplicado a cada pareja de grupos, pudimos extraer varias apreciaciones. Por un lado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la densidad celular entre

los diferentes grupos sin adición de melatonina tras 24 horas de cultivo ( $p>0,05$ ) (Tabla 8 Anexos). Sin embargo, a las 72 horas de cultivo en ausencia de melatonina, la densidad celular del grupo M fue significativamente mayor que la del grupo GF ( $p<0,01$ ), aunque no hubo diferencias significativas entre los grupos M y G, ni entre G y GF ( $p>0,05$ ) (Tabla 9 Anexos). Como podemos ver en la Tabla 7 y el Gráfico 3, la proliferación fue mayor en el grupo M, seguido del G y menor en el grupo GF.

Por otro lado, tras 24 horas de cultivo en presencia de melatonina no se observaron diferencias significativas entre los grupos ( $p>0,05$ ) (Tabla 10 Anexos), aunque fue mayor la adhesión en el grupo M, seguido del G y posteriormente del GF. Y tras 72 horas de cultivo (Tabla 11 Anexos), se observaron diferencias significativas ( $p<0,05$ ) en la proliferación entre todos los grupos, siendo de nuevo mayor en M, seguido de G y por último de GF.

Además, se observó un aumento de la adhesión y proliferación celular en todos los grupos (excepto en el grupo GF tras 72 horas de cultivo) si comparamos los grupos en presencia de melatonina respecto a sus homólogos sin melatonina. Aunque sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo M respecto al grupo M con melatonina tras 72 horas de cultivo ( $p<0,01$ ) (Tabla 12 y 13 Anexos).

Por último, como era de esperar la densidad celular aumentó en todos los grupos de 24 a 72 horas con diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ), tanto en ausencia (Tabla 14 Anexos) como en presencia de melatonina (Tabla 15 Anexos). La excepción fue el grupo GF en presencia de melatonina, en el que se produjo un aumento pero sin que se alcanzase una diferencia estadísticamente significativa.

### 5.3. ANÁLISIS MORFOLÓGICO

#### 5.3.1. ANÁLISIS CON MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA

El análisis morfológico se llevó a cabo con los datos de área celular total e índice de redondez obtenidos tras delimitar el citoplasma celular de 500 células MG63 de cada grupo de estudio en ausencia y presencia de melatonina, tras 24 y 72 horas de cultivo. Los datos recogidos se muestran en las tablas 16-27 de Anexos.

5.3.1.1. ÁREA CELULAR

En el siguiente gráfico de cajas y bigotes (Gráfico 5), podemos apreciar cómo en todos los grupos, y fundamentalmente en el grupo GF, hay un número de células con áreas elevadas por encima de la media.

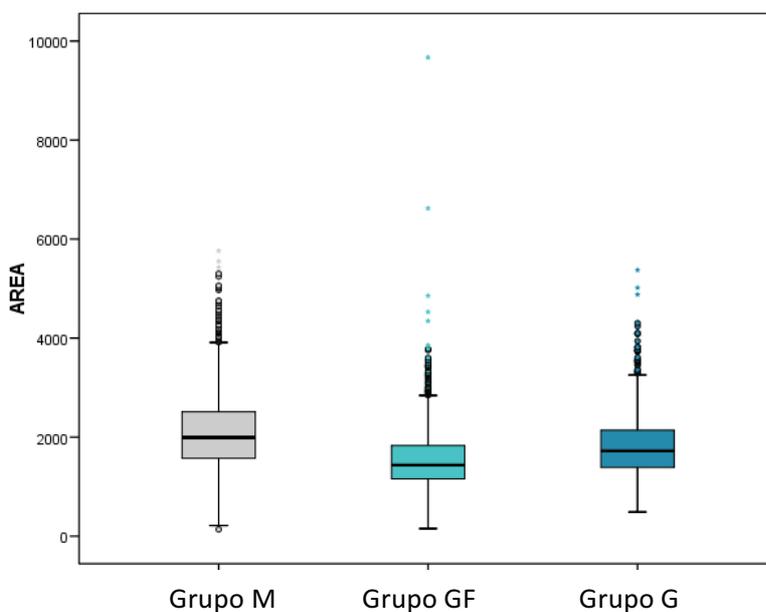


Gráfico 5: Gráfica de cajas y bigotes que representa los valores de área celular obtenidos en los diferentes grupos.

Los siguientes gráficos representan los promedios y desviación estándar del área celular obtenidos (Gráficos 6 y 7):



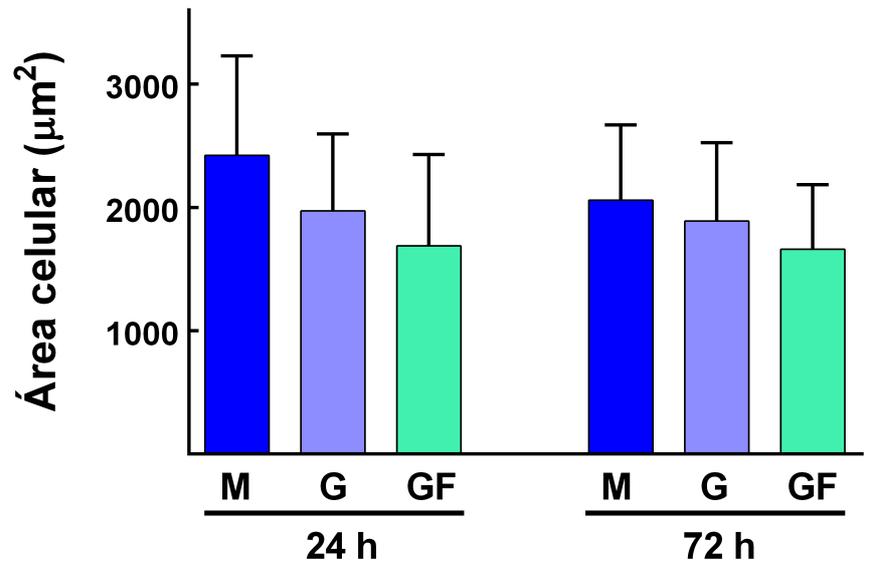


Gráfico 6: Representación gráfica de los promedios y desviación estándar del área celular tras 24 y 72 horas de cultivo en ausencia de melatonina.

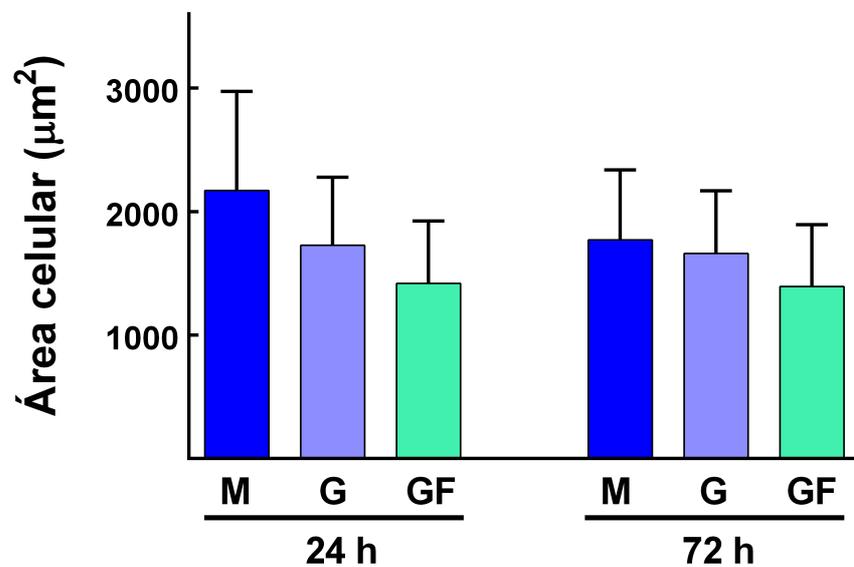


Gráfico 7: Representación gráfica de los promedios y desviación estándar del área celular tras 24 y 72 horas de cultivo en presencia de melatonina.

Como podemos observar, las células del grupo M presentaron mayor área celular media que el resto de grupos, tanto en ausencia como en presencia de melatonina. Y a su vez, las del grupo G mayor superficie que las del GF. Por otro lado, un mayor tiempo de cultivo provocó una disminución de la superficie celular media en cada grupo. En cuanto

al posible efecto de la melatonina, en su presencia todos los grupos mostraron una superficie celular inferior, tanto a 24 como a 72 horas de cultivo.

De igual modo que con el análisis de adhesión y proliferación celular, tras analizar los datos obtenidos mediante el test de Mann-Whitney, pudimos observar diferentes apreciaciones. Por un lado, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el área celular entre los diferentes grupos, tanto en ausencia ( $p < 0,0001$ ) (Tabla 28 Anexos) como en presencia de melatonina ( $p < 0,0001$ ) (Tabla 29 Anexos) tras 24 horas de cultivo. Y lo mismo tras 72 horas de cultivo en ausencia ( $p < 0,0001$ ; Tabla 30 Anexos) y presencia de melatonina ( $p < 0,001$ ; Tabla 31 Anexos). Como se ha mencionado, el mayor tamaño promedio corresponde a las células del grupo M, seguidas de las del grupo G y por último de las del grupo GF, como se puede observar en los Gráficos 6 y 7.

Por otro lado, si comparamos cada grupo en ausencia y presencia de melatonina a cualquier tiempo de cultivo, podemos apreciar cómo la melatonina provocó una disminución en el tamaño de las células de todos los grupos respecto a sus homólogos sin melatonina, con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,0001$ ; Tablas 32 y 33 Anexos).

Además, el área celular disminuyó en todos los grupos al pasar de 24 a 72 horas de cultivo, aunque sólo con diferencias estadísticamente significativas en los grupos M ( $p < 0,0001$ ) y G ( $p < 0,05$ ) en ausencia de melatonina y el grupo M en presencia de melatonina ( $p < 0,0001$ ; Tablas 34 y 35 Anexos).

Estas observaciones pueden verse plasmadas en los siguientes gráficos de distribución de frecuencias (Gráficos 8-11). Podemos apreciar cómo la línea que representa las células del grupo M, se sitúa siempre más a la derecha de la gráfica (células de mayor área), seguida de la línea que representa al grupo G y posteriormente al GF. Y cómo al aumentar el tiempo de cultivo de 24 a 72 horas, las líneas muestran un desplazamiento a la izquierda (las células de la muestra en general reducen su tamaño). Además se aprecia que las gráficas tras 72 horas de cultivo son más estilizadas, presentan una menor dispersión en las áreas celulares medidas, lo que podría indicar que el tamaño de las células de cada grupo se vuelve más homogéneo. Cuando las células se cultivaron en

presencia de melatonina (Gráficos 9 y 11) el resultado fue similar al ya descrito en las células cultivadas en su ausencia, si bien cabe destacar que en todos los grupos, y tanto en los cultivos tras 24 como tras 72 horas, se produce un desplazamiento de las curvas de distribución de frecuencias hacia la izquierda, hacia valores de área celular menores.

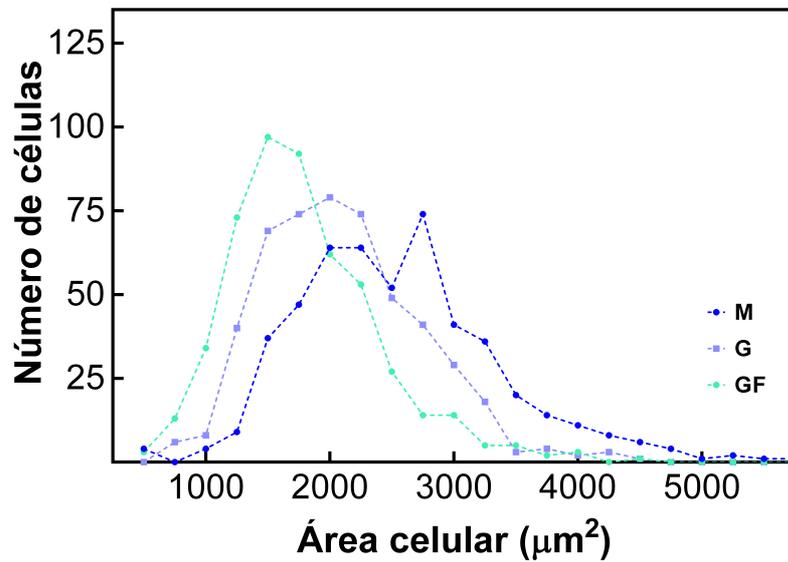


Gráfico 8: Representación del área celular tras 24 horas de cultivo en ausencia de melatonina.

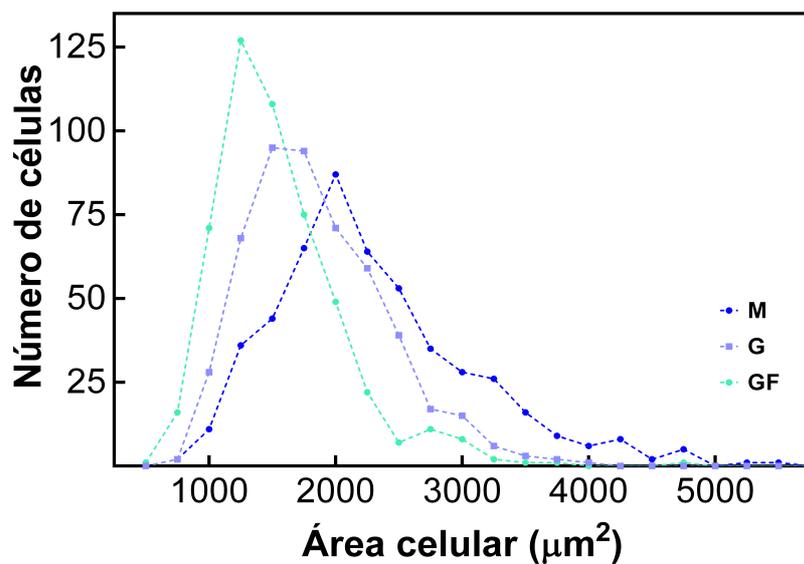


Gráfico 9: Representación del área celular tras 24 horas de cultivo en presencia de melatonina.

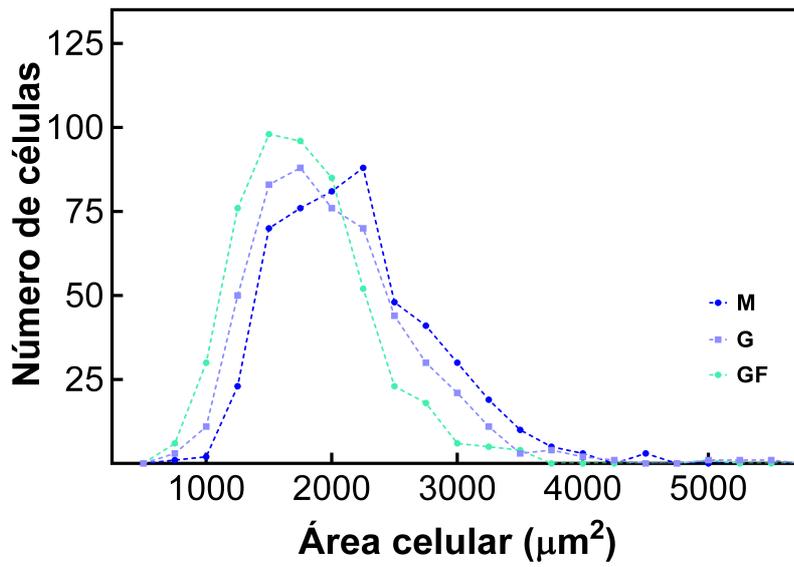


Gráfico 10: Representación del área celular tras 72 horas de cultivo en ausencia de melatonina.

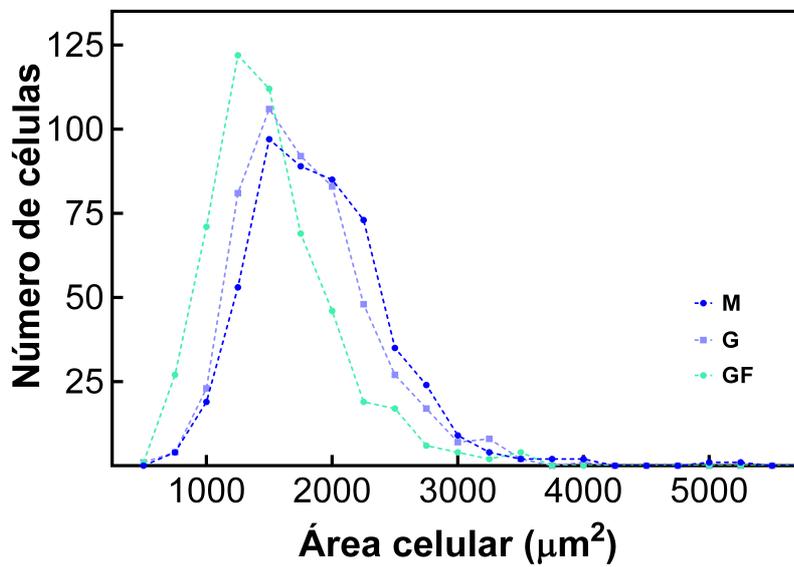


Gráfico 11: Representación del área celular tras 72 horas de cultivo en presencia de melatonina.

### 5.3.1.2. ÍNDICE DE REDONDEZ CELULAR

Se siguió el mismo tipo de análisis para el estudio del índice de redondez de las células.

En el siguiente gráfico de cajas y bigotes (Gráfico 12), podemos apreciar cómo en todos los grupos, y fundamentalmente en el grupo GF, hay un número de células con índice de redondez elevado por encima de la media.

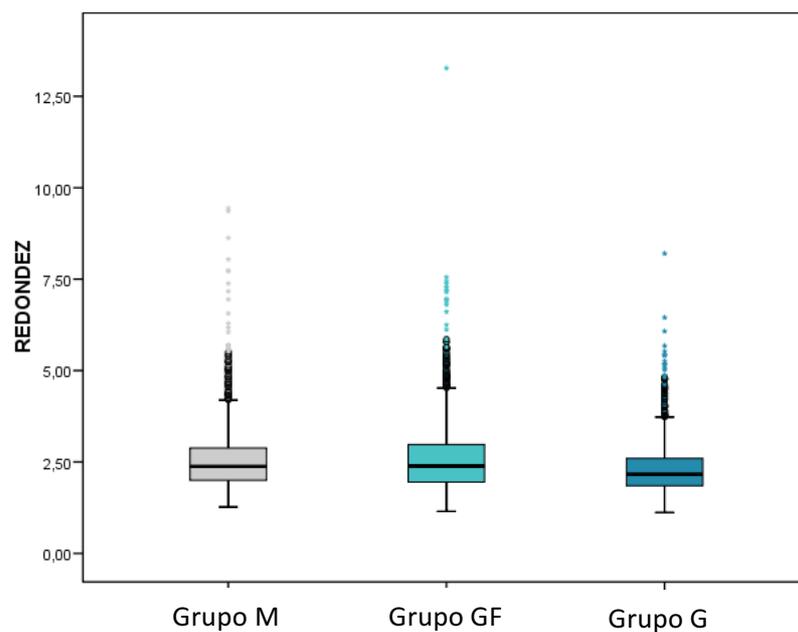
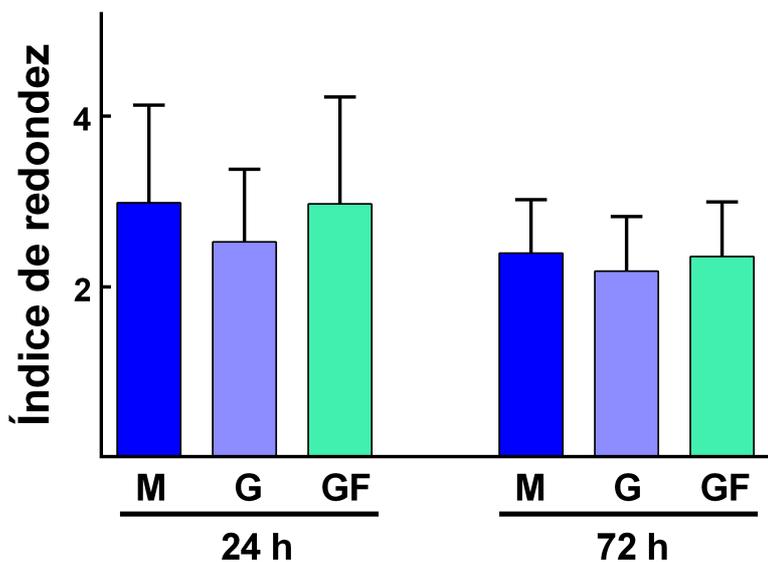
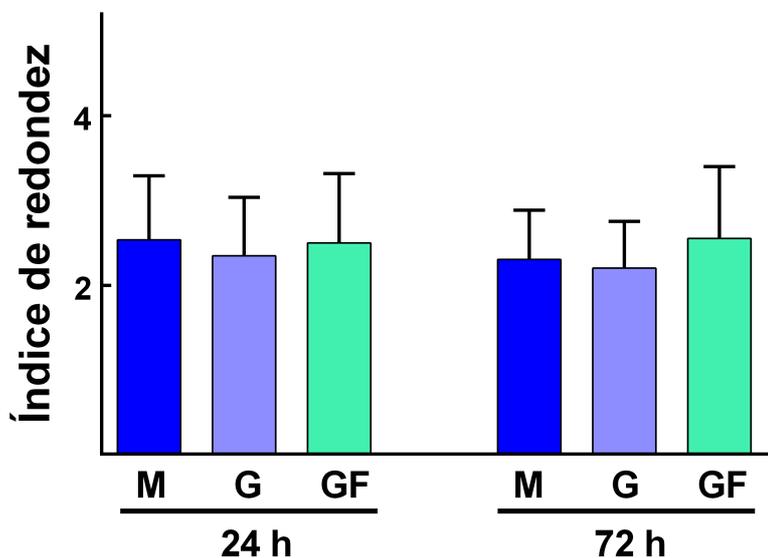


Gráfico 12: Gráfica de cajas y bigotes que representa los valores obtenidos del índice de redondez celular en los diferentes grupos.

Los siguientes gráficos representan los promedios y desviación estándar de índice de redondez obtenidos (Gráficos 13 y 14).



Gráfica 13: Representación gráfica de los promedios y desviación estándar del índice de redondez celular tras 24 y 72 horas de cultivo en ausencia de melatonina.



Gráfica 14: Representación gráfica de los promedios y desviación estándar del índice de redondez celular tras 24 y 72 horas de cultivo en presencia de melatonina.

De nuevo, tras analizar los datos mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney pudimos observar varias apreciaciones. Por un lado, tras 24 horas de cultivo tanto en ausencia ( $p < 0,0001$ ) como en presencia de melatonina ( $p < 0,01$ ), las células del grupo G fueron significativamente más “redondas” que las del resto de grupos (presentaron un menor índice de redondez, más cercano a 1). A continuación encontramos las células del grupo GF y, por último, las del grupo M, sin diferencias significativas entre ellos ( $p > 0,05$ ) (Tablas 36 y 37 Anexos). Tras 72 horas de cultivo en ausencia de melatonina, se repitió exactamente el mismo patrón (Tabla 38 Anexos), mientras que tras 72 horas de cultivo en presencia de melatonina, se obtuvieron diferencias significativas entre la redondez de las células de todos los grupos, siendo las del grupo G significativamente más “redondeadas” que las del grupo GF ( $p < 0,0001$ ) y las del grupo M ( $p < 0,01$ ), mientras que las del grupo M fueron significativamente más redondas que las del grupo GF ( $p < 0,0001$ ; Tabla 39 de Anexos).

Por otro lado, si comparamos cada grupo en ausencia y presencia de melatonina, podemos apreciar cómo en los grupos en los que se adicionó melatonina las células fueron significativamente más “redondas” que sus homólogas cultivadas en ausencia de melatonina, tanto tras 24 horas ( $p < 0,01$ ) como tras 72 horas de cultivo ( $p < 0,05$ ; Tablas 40 y 41 Anexos).

Además, si comparamos cómo cambia el índice de redondez celular de cada grupo tras estar las células 24 o 72 horas en cultivo, vemos cómo éste disminuye. Las células se hacen más redondeadas, con diferencias estadísticamente significativas en todos los grupos en ausencia de melatonina ( $p < 0,0001$ ), y más redondeadas, con diferencias significativas en presencia de melatonina en los grupos M ( $p < 0,0001$ ) y G ( $p < 0,01$ ), pero sin diferencias en el grupo GF ( $p > 0,05$ ) (Tablas 42 y 43 Anexos).

### 5.3.2. MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Tras 24 horas de cultivo, las células osteoblásticas ya estaban activamente adheridas a las superficies tratadas y mecanizadas. Las microfotografías con microscopio electrónico de barrido permiten observar de nuevo las diferencias en las superficies y cómo éstas

## RESULTADOS

afectan a las células. En los discos del grupo M las células osteoblásticas adoptaron una disposición de forma concéntrica siguiendo las líneas de mecanizado (Fig.66 ), mientras que en los discos tratados se dispusieron aleatoriamente por la superficie (Fig. 67).

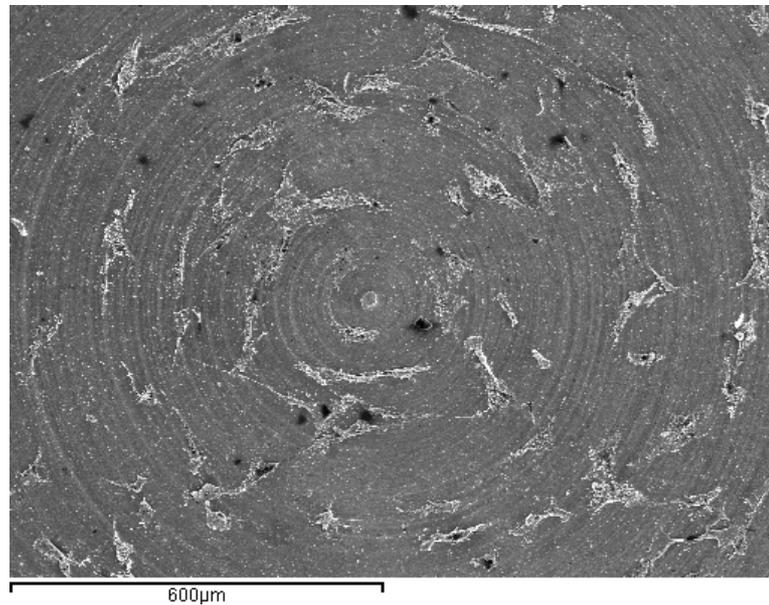


Figura 66: Microfotografía de un disco del grupo M tomada con microscopio electrónico de barrido a 100x.

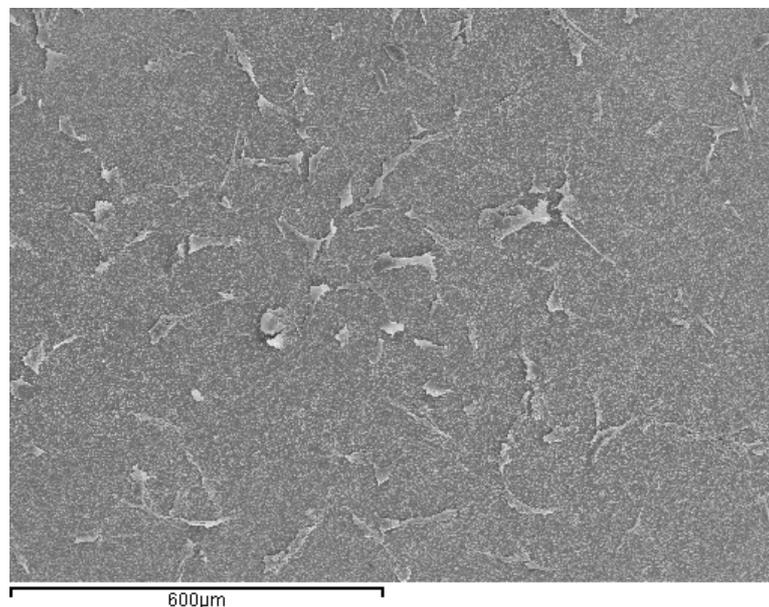


Figura 67: Microfotografía de un disco del grupo G tomada con microscopio electrónico de barrido a 100x.



A microscopía electrónica de barrido podemos apreciar cómo las células osteoblásticas se adaptan a la superficie del titanio aplanándose y emitiendo extensiones citoplasmáticas, que le sirven para adherirse mejor a la superficie y desplazarse por ella (Fig. 68 y 69). Las células crecidas sobre discos del grupo M mostraron generalmente una morfología más fusiforme, elongada, en comparación con el aspecto de las células crecidas sobre discos de los grupos G y GF, de morfología por lo general más redondeada. Estas diferencias fueron menos patentes cuando aumentó el tiempo de cultivo.

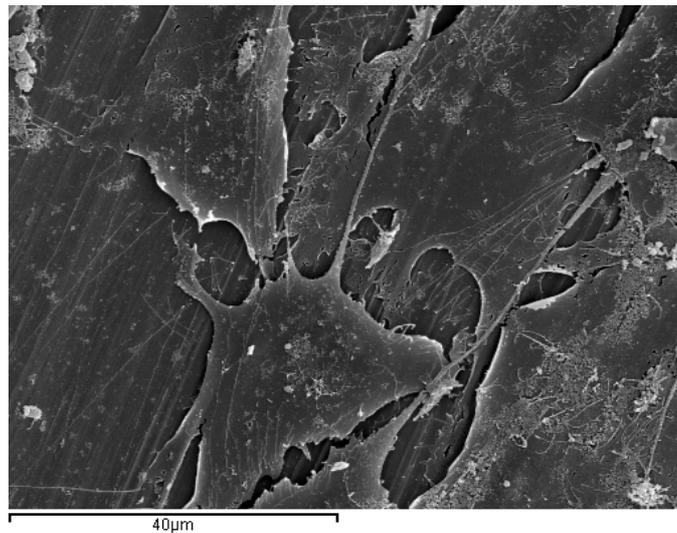


Figura 68: Microfotografía de un disco del grupo M tomada con microscopio electrónico de barrido a 1.500x.

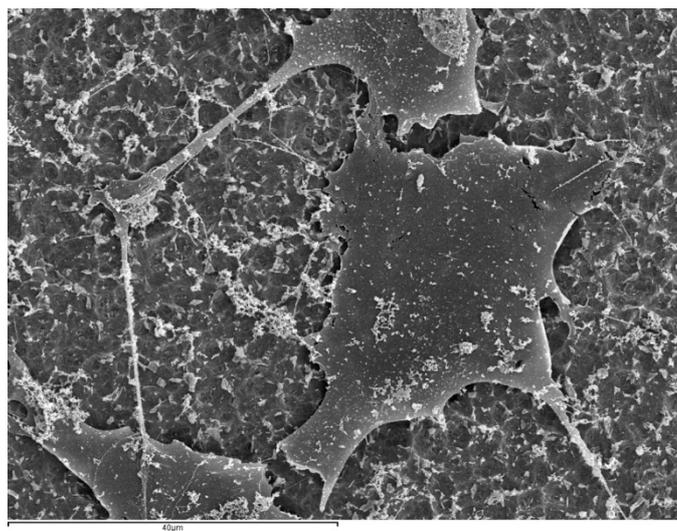


Figura 69: Microfotografía de un disco del grupo GF tomada con microscopio electrónico de barrido a 1.500x.

## RESULTADOS

Cabe señalar cómo las características de estas células pueden variar según la fase del ciclo celular en que se encuentran. El hecho de que las muestras fuesen analizadas cuando los cultivos celulares estaban en la fase de crecimiento activo, hizo que se observasen abundantes células que estaban en división. Al comenzar la división celular las células, que crecen adheridas al sustrato, pierden la mayor parte de los contactos que establecen con la superficie de cultivo, dejan de estar aplanadas, retraen las extensiones citoplasmáticas y adoptan una morfología esférica. Tras la división, las dos células hijas originadas van separándose, emiten de nuevo una gran cantidad de proyecciones citoplasmáticas para adherirse al sustrato, volviendo poco a poco a aplanarse (Fig. 70-73).



Figura 70: Microfotografía de un disco del grupo M tomada con microscopio electrónico de barrido a 2.000x.

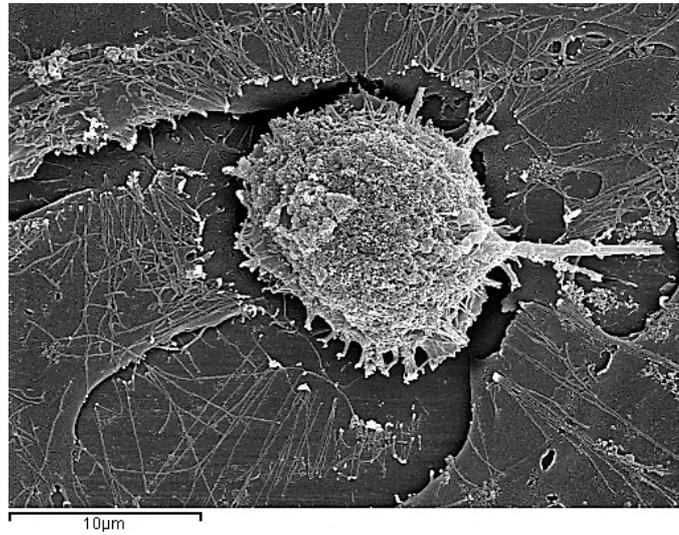


Figura 71: Microfotografía de un disco del grupo M tomada con microscopio electrónico de barrido a 2.000x.

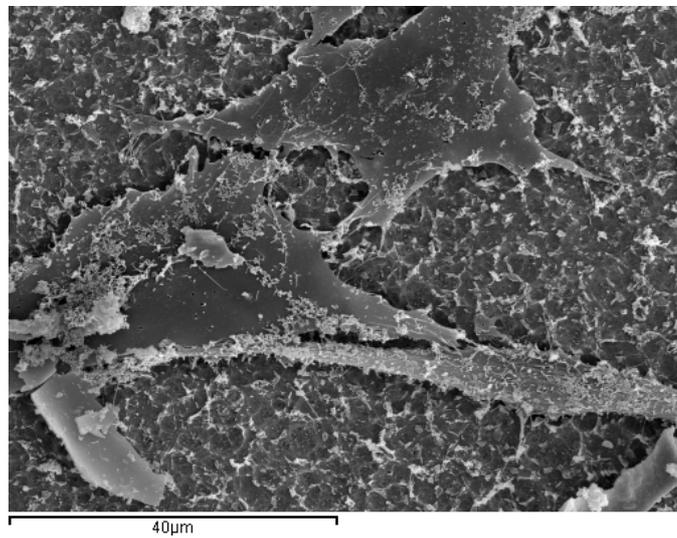


Figura 72: Microfotografía de un disco del grupo GF tomada con microscopio electrónico de barrido a 2.000x.

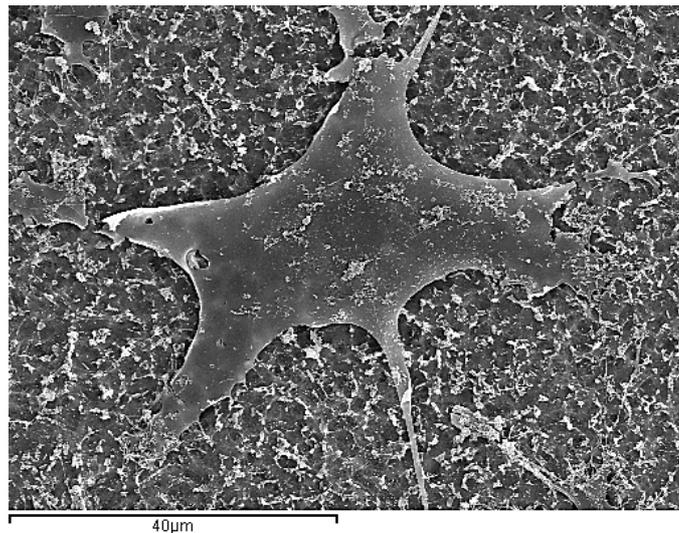


Figura 73: Microfotografía de un disco del grupo GF tomada con microscopio electrónico de barrido a 2.000x.

#### 5.4. CUANTIFICACIÓN DE ARNm ESPECÍFICOS

La cuantificación de la expresión relativa de diferentes genes relacionados con la diferenciación osteoblástica, proporcionó los distintos valores  $2^{-ddCt}$  que se muestran en las tablas 44-47 de Anexos, tomando como gen de control endógeno normalizador GAPDH. Los siguientes gráficos (Gráficos 15-18) representan el valor medio de Fc (*fold change*) o “veces de cambio” de los genes seleccionados, tras 1 y 5 semanas de cultivo de las células MG63 en ausencia y presencia de melatonina sobre los discos de los diferentes grupos de estudio comparándolos, según se describe en el apartado 4.2.5.2., con el nivel de expresión que mostraron las células crecidas en las mismas condiciones sobre discos del grupo M.

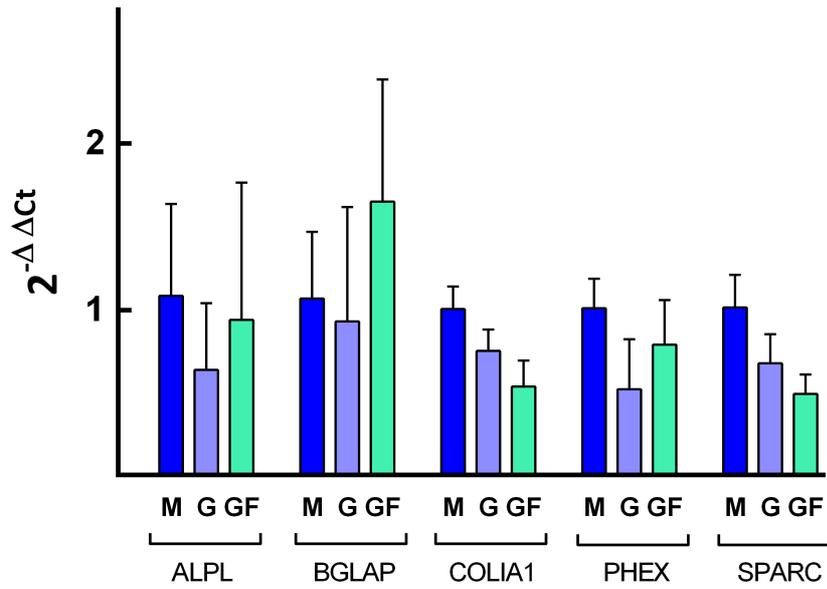


Gráfico 15: Cuantificación de la expresión relativa de los diversos genes tras 1 semana de cultivo en ausencia de melatonina. Se representa el valor medio y desviación estándar de Fc o “veces de cambio” de los diferentes genes tomando como control la expresión medida en discos M.

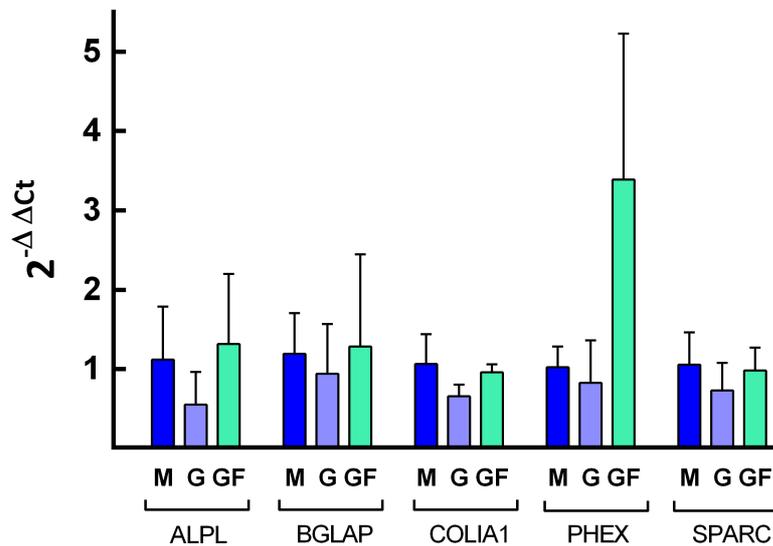


Gráfico 16: Cuantificación de la expresión relativa de los diversos genes tras 1 semana de cultivo en presencia de melatonina. Se representa el valor medio y desviación estándar de Fc o “veces de cambio” de los diferentes genes tomando como control la expresión medida en discos M.

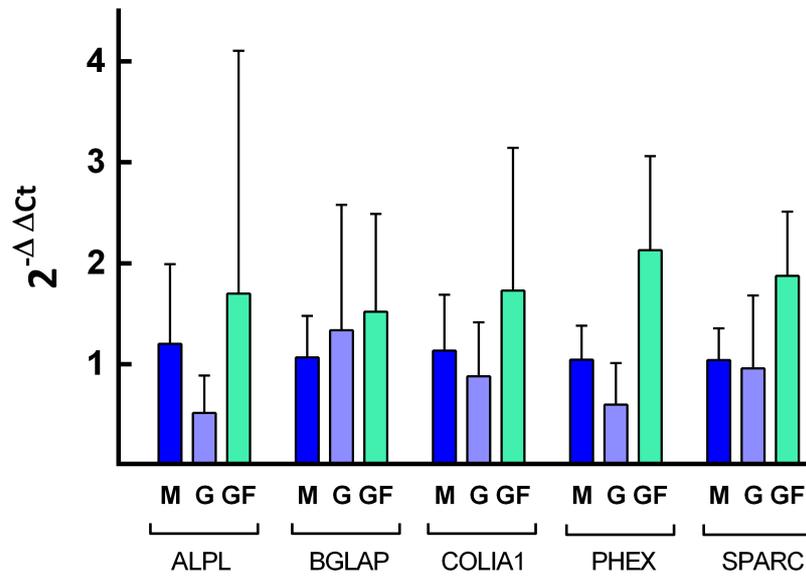


Gráfico 17: Cuantificación de la expresión relativa de los diversos genes tras 5 semanas de cultivo en ausencia de melatonina. Se representa el valor medio y desviación estándar de Fc o “veces de cambio” de los diferentes genes tomando como control la expresión medida en discos M.

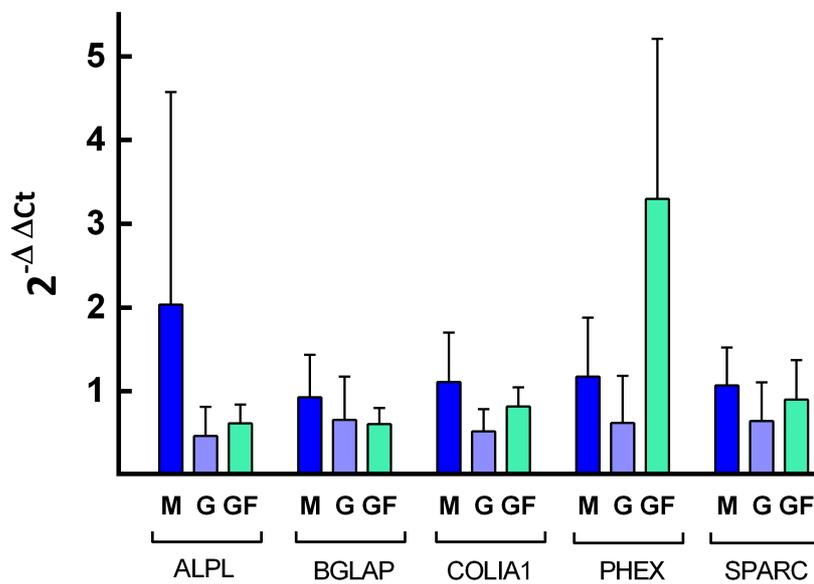


Gráfico 18: Cuantificación de la expresión relativa de los diversos genes tras 5 semanas de cultivo en presencia de melatonina. Se representa el valor medio y desviación estándar de Fc o “veces de cambio” de los diferentes genes tomando como control la expresión medida en discos M.

Del mismo modo que en análisis anteriores, tras analizar los datos obtenidos mediante test de Mann-Whitney (Tablas 48-67 Anexos), pudimos extraer diferentes apreciaciones. Si comparamos la expresión de cada gen entre los diferentes grupos de estudio tras 1 semana de cultivo en ausencia de melatonina, puede observarse cómo la mayor expresión relativa se obtuvo para el gen BGLAP en el grupo GF, aunque en general no se apreció un claro patrón de expresión (Gráfico 15) entre los grupos. En el caso de las células cultivadas durante 1 semana en presencia de melatonina, el gen PHEX en el grupo GF mostró el mayor incremento en expresión relativa, con diferencias estadísticamente significativas con el grupo M y con el grupo G ( $p < 0,05$ ) (Tabla 61 Anexos). Seguido de la expresión relativa del gen ALPL, que fue también superior en el grupo GF, aunque sin diferencias estadísticamente significativas con los otros grupos (Tabla 58 Anexos). Si comparamos la expresión relativa de los genes en las células crecidas durante 1 semana en ausencia o presencia de melatonina, puede observarse cómo (con la excepción de los genes ALPL y COLIA1 en el grupo G y BGLAP en el grupo GF) la melatonina aumentó la expresión de los genes en todos los grupos tras 1 semana de cultivo (Gráfico 16).

Por otro lado, tras 5 semanas de cultivo en ausencia de melatonina (Gráfico 17), en el grupo GF se observó una mayor expresión relativa de todos los genes, siendo de nuevo mayor la del gen PHEX, con diferencias estadísticamente significativas tanto con respecto al grupo M ( $p < 0,05$ ) como con respecto al grupo G ( $p < 0,01$ ; Tabla 56 Anexos). Seguida de la expresión del gen SPARC y del gen COLIA1, aunque sin diferencias estadísticamente significativas con los otros dos grupos (Tablas 55 y 57 Anexos). Tras 5 semanas de cultivo en presencia de melatonina (Gráfico 18), de nuevo fue mayor el incremento de la expresión relativa del gen PHEX en el grupo GF, con diferencias estadísticamente significativas con el grupo G ( $p < 0,05$ ). Aunque PHEX también se expresó más en el grupo GF que en el grupo M, esta gran diferencia con el grupo M no fue estadísticamente significativa ( $p = 0,0556$ ; Tabla 66 Anexos). Además, la melatonina provocó un aumento de la expresión del gen PHEX en todos los grupos tras 5 semanas de cultivo en presencia de melatonina, respecto a sus homólogos sin melatonina.





## **6. DISCUSIÓN**

---



## 6.1. DISCUSIÓN DEL MATERIAL Y LA METODOLOGÍA

La implantología es un área de la odontología gracias a la cual pueden resolverse problemas de estética, retención, soporte y estabilidad de las prótesis, sobre todo, en casos de desdentados con maxilares atróficos, imposibles de solucionar con alto grado de satisfacción por técnicas convencionales. Esto es el resultado de la oseointegración de los implantes y el buen manejo de los tejidos blandos que se han ido desarrollando a lo largo de la historia ante la necesidad de restituir los dientes perdidos. La investigación en este campo ha mejorado increíblemente en múltiples aspectos relacionados con el éxito final del tratamiento, hasta el punto de que la sustitución de las piezas dentales en pacientes con edentulismo total o parcial hace que mejore significativamente su capacidad para la masticación, la fonación y la estética y, por tanto, la aceptación desde un punto de vista psicológico del tratamiento, haciendo que el paciente se sienta más seguro en su actividad cotidiana y vea menos deteriorada su imagen estética y la consecuente aceptación social.

El material utilizado para la fabricación de un implante dental debe ser un biomaterial, ya que no ha de ser mutagénico, carcinógeno, antigénico ni tóxico, y sí esterilizable y de fácil procesado. Además de tener un buen comportamiento en el organismo vivo a corto y largo plazo, hay que tener en cuenta que el material va a estar expuesto a fluidos orales con gran capacidad corrosiva y que actúan como electrolitos, y debe tener capacidad de soportar las cargas masticatorias y, con frecuencia, parafunciones nocturnas y/o diurnas en pacientes bruxistas, por lo que se compromete exponencialmente la supervivencia del sistema implantoprotésico. Por todo ello, como se ha mencionado anteriormente, el material debe cumplir diferentes propiedades, además de la biocompatibilidad, como resistencia a la tracción, la compresión y el cizallamiento, presentar buena ductibilidad, módulo de elasticidad adecuado, resistencia a la corrosión, buena disponibilidad del biomaterial, etc.

El titanio es el material por excelencia utilizado actualmente para la fabricación de implantes dentales por su magnífica biocompatibilidad, sus propiedades mecánicas y su resistencia a la corrosión, presentando mejor respuesta tanto *in vitro* como *in vivo* que

otros biomateriales. El titanio favorece la oseointegración gracias a que el hueso es capaz de crecer de forma ordenada en contacto directo (no adherido) con el implante, como señalan Thomsen y Ratner (105,106).

La adición de elementos intersticiales posibilita la modificación y mejora de las propiedades estructurales y superficiales del titanio y, en concreto la aleación de Ti6Al4V o titanio grado 5 utilizada en nuestro estudio, es una de las más ampliamente estudiadas y empleadas, tanto para estudios *in vitro* (107–110) como *in vivo* (82,111,112). Sin embargo, algunos autores han utilizado otros tipos de titanio, como Chen (113) el de grado 1; Pereira da Silva (114), Lohmann (74), Brentel (115), Kim (116), Gittens (117) o Schwartz (75) el de grado 2; Gil (118) o Aparicio (119) el de grado 3; o Lotz (120) y Sohn (121) el de grado 4.

Los discos de titanio grado 5 empleados en nuestro estudio *in vitro* presentaban un diámetro y un grosor de 6 y 2 mm, respectivamente, para adecuarse al tamaño de los pocillos de cultivo donde posteriormente iban a ser colocados para realizar el cultivo *in vitro*. El tamaño de los discos de titanio descrito en diferentes artículos es dispar. Esfahanizadeh (122) utilizó discos de 9 x 1 mm, mientras que Meng (123) de 4 x 2 mm, Lotz (120) de 5 x 1 mm, Schneider (124) de 12,5 x 4 mm y Marinucci (110) de 25 x 5 mm, todos ellos fresados a partir de barras de titanio de diferentes grados. Por otra parte, Chen (113) utilizó rectángulos de titanio de 10 x 20 x 1 mm, en lugar de discos. Al igual que Du (125), de 10 x 10 x 1,3 mm.

Además del material en sí, las características de su superficie tanto topográficas (rugosidad superficial) como físico-químicas, son fundamentales de cara a las interacciones moleculares que se producen en primera instancia entre las proteínas y la superficie del implante.

Por ello, las investigaciones actuales se centran en controlar las distintas propiedades asociadas a la calidad superficial del material para mejorar la relación implante-tejido vivo. Esto se fundamenta en que la rugosidad y composición química de la superficie del implante van a determinar la tendencia a adsorber diferentes átomos o moléculas de forma que, si modificamos la superficie del implante, se puede promover la unión de

diferentes tipos de células con el objetivo de mejorar tanto la biocompatibilidad como la estabilización del implante y, en definitiva, la oseointegración a corto y largo plazo.

Dentro de los diferentes tratamientos de superficie disponibles en la actualidad, el grabado ácido es uno de los más utilizados, obteniéndose una microtexturización en la superficie del titanio sin dejar residuos. Puede llevarse a cabo con un solo ácido o con una combinación de ellos, como el grabado ácido dual llevado a cabo en nuestro estudio mediante ácido fluorhídrico y ácido clorhídrico. Gil (118) optó por un tratamiento de grabado ácido únicamente con ácido fluorhídrico para uno de los grupos de su estudio. Mientras que otros autores también realizaron un grabado ácido dual mediante diferentes ácidos. Como es el caso de Schwartz (75), con un grabado de ácido fluorhídrico y ácido nítrico. O Balloni (126), con un grabado de ácido fluorhídrico y ácido clorhídrico, como el llevado a cabo en nuestro estudio. Por otro lado, diversos autores como Cho (127), Lohmann (74), Gittens (117) o Cochran (77) eligieron una combinación de ácido clorhídrico y ácido sulfúrico.

También se han empleado diferentes sustancias de recubrimiento de los implantes dentales, siendo los fosfatos de calcio de especial importancia, ya que son los principales componentes de los tejidos duros del cuerpo humano, tanto del hueso como el esmalte y la dentina de los dientes. Desde el año 1970, cuando se comenzaron a sintetizar, caracterizar y aplicar, se han estudiado ampliamente como materiales para la reparación ósea (128). Por ello, en uno de los grupos de nuestro estudio realizamos un recubrimiento de hidroxiapatita, una forma de fosfato cálcico, mediante un proceso de DCD® con el que se consiguió una deposición de cristales a escala nanométrica sobre la superficie de titanio grado 5, al igual que en el estudio de Mendes (82).

Otros autores como Du (125) o Habibovic (85), utilizaron un proceso de precipitación biomimética utilizando una solución de fosfato cálcico a pH y temperatura similares a los del cuerpo humano. Mientras que Chen (113) empleó un método de deposición electroforética para llevar a cabo un recubrimiento con fosfato cálcico sobre discos de titanio grado 1. La adición de fosfato cálcico se realizó sobre discos grabados previamente, al igual que en nuestro estudio, pero en este caso con ácido sulfúrico, de forma que se aumentó la superficie para la deposición de fosfato cálcico sobre los poros de la superficie creados por el grabado ácido.

## DISCUSIÓN

La forma clásica de deposición ha sido mediante proyección de partículas, pero esta técnica se ha asociado con problemas clínicos asociados a la delaminación del revestimiento (115,129,130).

La rugosidad superficial del implante es un factor de significativa influencia en diversos procesos, desde la adsorción de proteínas, pasando por la adhesión y proliferación tanto de osteoblastos como de osteoclastos, hasta la mineralización de la matriz extracelular del tejido óseo.

La rugosidad superficial se puede valorar de forma cualitativa y cuantitativa mediante diferentes técnicas. De forma cuantitativa podemos diferenciar métodos de contacto o métodos ópticos (sin contacto). En el caso de las técnicas de contacto, como la perfilometría de contacto, las medidas pueden verse modificadas si se produce cierta distorsión de la superficie ensayada al paso del puntero palpador (131). Esto no ocurre con técnicas ópticas sin contacto como la interferometría. O también la microscopía confocal láser, que además proporciona una alta resolución comparada con la perfilometría por contacto, que posee una resolución limitada, o con la perfilometría óptica, que aunque posee mayor resolución, es muy lenta para conseguir perfiles tridimensionales (132).

De forma cualitativa, disponemos de la microscopía electrónica de barrido, que nos proporciona información morfológica con alta resolución y alta profundidad de foco, además de la capacidad para realizar análisis químico local (basado en la energía de dispersión de rayos X). Pero esta información es únicamente cualitativa, que aunque útil, resulta insuficiente para comparar las diferentes superficies de forma objetiva si no se acompaña de un método cuantitativo. Y aún más en el caso de querer correlacionar la respuesta biológica con la rugosidad superficial.

Por todo ello, para evaluar la rugosidad superficial de los discos de titanio de nuestro estudio, previo al cultivo celular medimos la rugosidad de todos los discos con un microscopio confocal de escaneado láser como método cuantitativo, al igual que otros autores (108,133). Posteriormente, también se llevó a cabo una observación y toma de imágenes de las superficies a diferentes aumentos mediante SEM, como método cualitativo. Esta parte se realizó tras el cultivo para, como se ha comentado, poder optimizar la información obtenida de los discos empleados en el estudio, puesto que

para la observación a SEM tienen que procesarse recubriéndolos con oro, y tras ello no habrían podido utilizarse para el cultivo.

Algunos autores simplemente utilizan un método cuantitativo, como en el caso de Li (107) o Aparicio (119) que utilizaron un perfilómetro de contacto. O Kim (134), que empleó un perfilómetro óptico. Otros autores optan, como en nuestro caso, por combinar un método cuantitativo con otro cualitativo, como Marinucci (110), Kim (116), Mustafa (133) o Park (135), que combinaron un perfilómetro óptico como método cuantitativo y SEM como método cualitativo. O Lotz (120), que combinó al igual que en nuestro estudio, el microscopio confocal láser como método cuantitativo y el microscopio electrónico de barrido como método cualitativo.

El método de esterilización de nuestros discos previo al cultivo *in vitro* fue mediante rayos gamma. Este proceso, con alta capacidad penetrante, se realiza en frío, lo que permite que el material pueda ser esterilizado en su empaquetamiento final manteniéndolo estéril hasta que se proceda a la apertura del mismo para su utilización. Además, no deja residuos ni transmite radiación al producto esterilizado, ventajas que hacen de esta técnica una de las más utilizadas actualmente en la industria de implantes dentales. Diferentes autores han utilizado este método con una dosis de radiación de aproximadamente 25 kGy, al igual que en nuestro estudio, como Gittens (117), Lotz (120), Kim (136), Sohn (121), Gardin (137), Fleisschman (109) o Marinucci (110). También puede llevarse a cabo la esterilización por calor húmedo en autoclave, como en el caso de Kim (116), entre otros autores (33,74,108,115,127). A 121 °C durante 15 minutos, como especifican Olivares-Navarrete (108) y Brentel (115) en la metodología de sus estudios.

Para el cultivo *in vitro* sobre discos de titanio en nuestro estudio seleccionamos, al igual que otros muchos autores (82,109,116,121,123,124,134,138,139), la línea celular comercial MG63, con características osteoblásticas. Aunque las células de la línea celular comercial MG63 son células con origen en osteosarcoma humano, se ha demostrado que tienen un comportamiento comparable a los osteoblastos humanos convencionales u otras líneas celulares con características osteoblásticas como la MC3T3 utilizada por Li (107) o da Silva (114) en sus respectivos estudios. Estas células muestran numerosos

rasgos osteoblásticos, como mostrar altos niveles de actividad de ALP o síntesis de osteocalcina durante su diferenciación (75,134,140–142).

Se han utilizado también células mesenquimales pluripotenciales, como en el estudio de Balloni (126), Lotz (120) o Zhang (143), pasando por células óseas mandibulares humanas obtenidas durante cirugías de molares (98,133,144), hasta adipocitos como en el estudio de Gardin (137) o fibroblastos gingivales humanos (HGFs) en el de Yamano (145).

En nuestro estudio nos inclinamos por la adición de melatonina a la mitad de las muestras del cultivo celular *in vitro*, como mecanismo para mejorar la respuesta osteoblástica y, en última instancia, la oseointegración. Basándonos en la capacidad de esta sustancia para estimular la formación ósea y reducir la reabsorción, al estar implicada en el desarrollo del hueso a través de la inhibición de la diferenciación osteoclástica, tal y como afirmaron Cardinali y Juknat (146,147), y la estimulación de la diferenciación osteoblástica, como afirmaron Radio y Suzuki (148,149), siendo incluso utilizada como agente terapéutico en el tratamiento de la osteoporosis (99,100).

En nuestro caso, la adición de melatonina se llevó a cabo a una concentración final de 50  $\mu$ M, para lo que se utilizó melatonina 100 mM en polvo disuelta en etanol al 96%. La concentración final de etanol en el medio de cultivo fue 0.048%. Para evitar que cualquier posible efecto que el etanol pudiese tener en las células, fuese atribuido a la melatonina, se añadió esta misma concentración de etanol al medio de las células cultivadas en ausencia de melatonina. Autores como Radio (148), Satué (150) o Panzer (151), también realizaron una dilución de melatonina en etanol. Sin embargo, otros como Liu (152) lo hicieron diluyendo la melatonina en dimetilsulfóxido (DMSO), que también añadieron al medio de cultivo de las células en ausencia de melatonina. Varios autores han empleado en sus estudios diferentes concentraciones de melatonina para intentar encontrar la concentración más idónea. Nakade (98), ya en el año 1999, llevó a cabo un cultivo de células óseas humanas aisladas de hueso mandibular por digestión con colagenasa (células HOB-M) y células de la línea celular osteoblástica humana SV-HFO. Las células se sembraron en pocillos de cultivo añadiendo al medio melatonina entre 5 y 100  $\mu$ M, concluyendo que la concentración idónea era 50  $\mu$ M. Del mismo modo, Pérez (153) realizó un cultivo de células madre mesenquimales adultas (CMM-



ah) procedentes de aspiración de médula ósea de la cresta ilíaca, añadiendo melatonina al medio de cultivo. Las concentraciones fueron 0,01  $\mu\text{M}$  (concentración fisiológica), 50, 100 y 150  $\mu\text{M}$  (concentraciones farmacológicas). Finalmente se concluyó que la concentración más adecuada era 50  $\mu\text{M}$ , la empleada en nuestro estudio. Hay que considerar, sin embargo, que diversos autores utilizaron melatonina a una concentración muy inferior. Como Radio (148), a 50nM (0,05  $\mu\text{M}$ ) para el cultivo de células mesenquimales humanas, al igual que Sethi (154), también para células mesenquimales. O Roth (99), para el cultivo de células osteoblásticas MC3T3, procedentes de calota de rata recién nacida. Park (155), entre 12,5 y 100 nM también para células MC3T3. Zaminy entre 0,01 y 10 nM para células ADSCs. O Matsumura (156) a 100 nM para células de osteosarcoma humano Saos2.

Tras la esterilización de los discos con rayos gamma, éstos se extrajeron de su empaquetamiento colocándose en placas de cultivo de 24 pocillos y se procedió a la siembra de las células MG63 en suspensión a 6400 células/mL, para una densidad final aproximada de 5000 células/cm<sup>2</sup>. Otros autores que también seleccionaron la línea celular MG63 para el cultivo *in vitro* sobre discos de titanio, realizaron siembras a diferentes densidades. Lincks y Schwartz (33,75) sembraron 9300 células/cm<sup>2</sup>, Kim (116), Gittens (117) y Olivares-Navarrete (108) 10000 células/cm<sup>2</sup>, Kim (134) 18000 células/cm<sup>2</sup>, Fleischmann (109) 20000 células/pocillo, Meng (123) 10<sup>5</sup> células/pocillo y Orsini (36) 3 x 10<sup>5</sup> células/pocillo. Por otro lado, Balloni (126) realizó una siembra de células mesenquimales sobre discos de titanio a una densidad de 1 x 10<sup>6</sup> células/mL, 3 x 10<sup>4</sup> células/pocillo.

Tras la siembra, se cultivaron las muestras para el estudio de adhesión y proliferación celular durante 24 y 72 horas, respectivamente. A las 24 horas se puede evaluar una primera adhesión a las diferentes superficies y, tras 72 horas, comparar la tendencia proliferativa de las células MG63 con características osteoblásticas en respuesta a las diferentes superficies y la adición de melatonina. En nuestro estudio, se realizó un recuento celular mediante la observación y toma de fotografías con microscopio de fluorescencia de un total de 60 discos, abarcando la totalidad del disco. Siendo uno de

los estudios más exhaustivos y completos realizados hasta el momento. Este método, en el que no se produce el lisado de las células, además de ser fiable, nos permitió utilizar las mismas muestras para el estudio morfológico, para el que empleamos, como se ha descrito, tanto microscopía óptica de fluorescencia como SEM.

Numerosos autores han llevado a cabo el cultivo de células MG63 sobre diferentes superficies de titanio para posteriormente evaluar la proliferación. La metodología de estudio, así como los tiempos de cultivo tras los que se realizó la medición, son diversos. Orsini (36), realizó una estimación del número de células a las 24 horas de cultivo mediante un ensayo MTT, basado en relacionar la cantidad de células presentes con la actividad mitocondrial que exhiben. Sohn (121) también empleó un ensayo MTT similar para estimar el número de células, en este caso tras 72 horas de cultivo.

Por otra parte, Kim (136) estimó las células adheridas tratando las muestras tras 72 horas de cultivo con tripsina y EDTA, de manera que las células perdieron el contacto con la superficie y quedaron en suspensión, tras lo que se tomó una muestra de esta suspensión y se contó, con ayuda del microscopio, el número de células por unidad de volumen. Como este método supone el provocar que las células se separen del sustrato al que están adheridas para poder hacer la cuantificación, impide que las mismas muestras puedan utilizarse en la caracterización morfológica de las células adheridas al soporte. De forma similar, Kim (134) estimó el número de células tras 72 horas de cultivo tratando las muestras con tripsina y EDTA y contando las células en suspensión con ayuda de un contador *Coulter*.

Por otro lado, algunos autores han realizado el recuento de células MG63 una vez alcanzado el estado de confluencia, es decir, una vez que cubrían totalmente la superficie sobre la que crecían. Kim (116) y Olivares-Navarrete (108), al igual que Gittens (117), estimaron la cantidad de células MG63 a las 24 horas de que el cultivo hubiese alcanzado la confluencia. Pero hay que resaltar que el criterio para determinar si las células habían alcanzado la confluencia fue el que ésta se hubiese alcanzado en un grupo de muestras control en el que las células se hicieron crecer directamente sobre la superficie de plástico de los pocillos de una placa de cultivo (por lo que puede visualizarse este hecho observando la placa de cultivo con un microscopio invertido), y suponiendo que esto también había ocurrido en las muestras en que las células habían crecido sobre discos de titanio (en las que es imposible verificar el estado de crecimiento

de las células empleando simplemente la observación con un microscopio invertido, dada la obvia opacidad del titanio). En el caso de Kim y Olivares-Navarrete, la evaluación de la proliferación se llevó a cabo resuspendiendo las células mediante tratamiento con tripsina y EDTA y empleando un contador *Coulter*. En el caso del trabajo de Gittens, la estimación del número de células se realizó lisándolas y cuantificando la cantidad de ADN presente en el lisado.

El estudio de los diversos patrones morfológicos de las células MG63 sobre las diferentes superficies de los discos de titanio, se llevó a cabo mediante el análisis de 5 regiones tomadas al azar fotografiadas en cada uno de los 60 discos utilizados para el estudio de adhesión y proliferación celular tras 24 y 72 horas. Se analizó el área total e índice de redondez de 500 células de cada grupo de estudio, con y sin adición de melatonina. Complementariamente, se realizaron fotografías a diferentes aumentos mediante microscopía electrónica de barrido en un total de 12 de los 60 discos observados con el microscopio de fluorescencia. El análisis del área total e índice de redondez de 500 células por grupo, da como resultado un estudio morfológico objetivable con alta potencia estadística al disponer de un gran número de valores. Por su parte, el análisis de los diferentes patrones morfológicos observados en las imágenes a SEM, supone un buen complemento gráfico para evidenciar los datos numéricos anteriormente recogidos.

La mayor parte de los autores (36,107,121,126,134) han llevado a cabo únicamente un estudio de los patrones morfológicos a través de imágenes obtenidas con SEM, pero cabe plantearse la duda de si las imágenes tomadas son totalmente representativas y si, por tanto, las conclusiones obtenidas son realmente válidas.

Para llevar a cabo la cuantificación de ARNm específicos y poder correlacionar la expresión génica de genes diana con su consecuente síntesis de proteínas relacionadas con la diferenciación celular de los osteoblastos, se empleó la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real. Para ello se emplearon un total de 60 discos de los diferentes grupos, 30 tras 1 semana de cultivo y 30 tras 5 semanas. Se cuantificó la expresión de

## DISCUSIÓN

los genes que codifican la fosfatasa alcalina (ALP) (gen ALPL), cadena alfa del colágeno tipo I (COLT-1) (gen COLIA1), osteocalcina (OCN) (gen BGLAP), endopeptidasa transmembrana ligada al cromosoma X (gen PHEX) y osteonectina (gen SPARC).

Las fosfatasas alcalinas son un buen indicador de la diferenciación osteoblástica que conduce a la formación, maduración y mineralización de la matriz extracelular (33,109). La enzima ALP está producida por los osteoblastos para permitir la mineralización de la matriz extracelular al aumentar la concentración de iones fosfato e inhibir la acción de los ésteres fosfóricos (107).

El gen COLIA1 codifica el componente principal de la proteína COLT-1, que como se ha comentado con anterioridad, representa el 90% de la sustancia osteoide de la matriz extracelular mineralizada.

La osteocalcina, una proteína modificada que en su composición presenta ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico, es un marcador del fenotipo osteoblástico debido a su presencia en la matriz extracelular madura (157). Se une con alta afinidad a calcio e hidroxapatita, siendo un modulador de la formación de sus cristales (108,140).

La endopeptidasa transmembrana que codifica el gen PHEX pertenece a la familia de las endopeptidasas de la membrana integral del tipo II dependientes del zinc. Esta proteína está implicada en la mineralización del hueso y de la dentina a través de la regulación de la reabsorción del fosfato (158–160).

La osteonectina es una glucoproteína con secuencia repetida RGD secretada por osteoblastos durante la formación ósea. Permite el anclaje de las células óseas a la matriz ósea para llevar a cabo la mineralización de la misma, como se ha visto anteriormente.

Como gen de control endógeno utilizamos GAPDH, al igual que otros muchos autores (100,110,116,123,126,145,150,153,154,156,161,162).

Distintos autores han evaluado la cantidad de ARNm de diferentes genes diana en células MG63. Meng (123) eligió, al igual que nosotros, el nivel de ARNm de COLT-1 y OCN, e incluyó también RUNX2, otro marcador de diferenciación. Por otra parte, Gittens (117) empleó como marcador de diferenciación el nivel de producción de osteocalcina.

Cuantificar el nivel de producción de OCN es una manera de valorar la diferenciación distinta a los niveles de ARNm OCN. La producción de osteocalcina, así como el nivel de COLT-1 o la actividad de ALP, son marcadores bioquímicos de la actividad y la diferenciación osteoblástica (163). De este modo, Lincks (33) empleó la actividad de ALP y la producción de OCN y COLT-1. Fleischmann (109), además de la actividad de ALP, observó los niveles de expresión génica de ALP, OCN, COLT-1, RANKL y OPG (osteoprotegerina), otros marcadores de diferenciación de osteoblastos. Mientras que Olivares-Navarrete (140), seleccionó como marcadores de diferenciación de células MG63 el nivel de ARNm de BMP 2 y 4 (proteínas morfogenéticas óseas 2 y 4).

Por otro lado, Li (107) utilizó como marcador de diferenciación de células osteoblásticas MC3T3, la actividad de ALP, en lugar de la cuantificación de ARNm ALP. Bang (161), empleó la cantidad ARNm de ALP y OCN, coincidiendo con nuestro estudio, además de RUNX2 y OPN (osteopontina). Mientras que Balloni (126), además de la actividad de ALP observó, al igual que nosotros, la expresión de genes ALP, COLT-1 y OCN. Además incluyó RUNX2, OPN, BSP (sialoproteína ósea), BMP2 y OSX (osterix), otros marcadores de diferenciación osteoblástica. Por último, Satomura (144), evaluó la cantidad de ARNm de COLT-1, OCN, OPN y BSP, coincidiendo con algunos de los marcadores seleccionados para nuestro estudio.

## 6.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Como se ha comentado anteriormente, se llevó a cabo un análisis cuantitativo de la rugosidad mediante microscopía confocal láser realizando mediciones de cada disco en 3 puntos distintos elegidos al azar. Debido a la posible heterogeneidad de la superficie del disco, se comprobó el nivel de reproducibilidad mediante un estudio de homogeneidad de las mediciones. Tras ratificar la alta reproducibilidad, se realizó el estudio estadístico correspondiente obteniendo diferencias estadísticamente significativas entre la rugosidad media (Ra) de los 3 grupos de estudio. Siendo mayor la Ra del grupo GF con un valor de  $0,354 \pm 0,088 \mu\text{m}$ , seguido del grupo G con  $0,266 \pm 0,037$  y, por último, el grupo control M con una Ra de  $0,131 \pm 0,052 \mu\text{m}$ .

## DISCUSIÓN

Por otro lado, se utilizó la microscopía electrónica de barrido como método de análisis cualitativo de las diferentes superficies. En los discos del grupo M, se apreciaron claramente las líneas típicas que produce el proceso de mecanizado. Mientras que en los discos del grupo G y GF, se observó una microtexturización con pocillos irregulares, sin apreciar diferencias entre ambos.

La rugosidad depende directamente del tratamiento de superficie aplicado. Parece claro que los discos mecanizados, sin ningún tipo de tratamiento adicional, tendrán una  $R_a$  inferior a los discos tratados, ya sea por arenado, grabado ácido, proyección o recubrimiento con diferentes materiales, etc. La rugosidad del titanio mecanizado será menor en caso de que haya sido pulido tras su fresado, como corroboró Park (135) realizando un análisis de adhesión plaquetaria sobre discos de titanio pulidos con una máquina pulidora Ecomet-5 (Buehler®). Además de los discos pulidos, utilizó discos mecanizados y discos tratados con grabado ácido dual mediante ácido fluorhídrico y clorhídrico, al igual que en nuestro estudio. La rugosidad de los discos fue evaluada cuantitativamente en 3 discos de cada grupo mediante perfilómetro óptico, y cualitativamente mediante SEM. Obtuvo valores de  $R_a$  de 0,489  $\mu\text{m}$  para el grupo de grabado ácido dual, 0,308  $\mu\text{m}$  para los discos mecanizados, y 0,026  $\mu\text{m}$  para los discos pulidos.

Yamano (145), obtuvo resultados de rugosidad dentro del mismo rango que los nuestros y los de Park. En su estudio, utilizó un microscopio de fuerza atómica (AFM) para cuantificar la rugosidad de discos de titanio grado 4 mecanizados y tratados mediante arenado con partículas de óxido de aluminio de 250  $\mu\text{m}$  y posterior grabado ácido dual con ácido clorhídrico y ácido sulfúrico. Se midieron 3 discos de cada grupo, obteniendo un valor  $R_a$  de 0,293  $\mu\text{m}$  para los discos mecanizados y 0,768  $\mu\text{m}$  para los discos tratados.

Por otro lado, Kim (134) empleó en su estudio discos de titanio grado 5 pulidos y discos arenados. Tras el mecanizado, la mitad de los discos se pulieron mediante lijas de papel con óxido de aluminio. Mientras que el resto de discos se arenaron con partículas de óxido de aluminio. La rugosidad fue evaluada cuantitativamente con un perfilómetro de contacto en 5 discos de cada grupo elegidos al azar. Se obtuvieron valores de  $R_a$  de 0,18  $\mu\text{m}$  para los discos pulidos, y de 2,95  $\mu\text{m}$  para los discos arenados.

Schwartz (75), realizó a todos los discos de su estudio un pretratamiento que consistía en desengrasado con baño en acetona y predecapado con una solución de fluoruro de amonio al 2%, ácido fluorhídrico al 2% y ácido nítrico al 10% a 55 °C durante 30 segundos. Posteriormente, se realizó decapado con ácido fluorhídrico al 2% y ácido nítrico al 10% a temperatura ambiente durante 30 segundos. Como grupo control, utilizó parte de estos discos e incluyó dos grupos más. Un grupo en el que los discos pretratados por decapado eran arenados con partículas de 250-500  $\mu\text{m}$  de óxido de aluminio a 5 bar de presión, y posteriormente grabados con ácido clorhídrico y ácido sulfúrico. Y otro grupo en el que tras el decapado, los discos eran arenados del mismo modo que los anteriores y posteriormente pulverizados con plasma de hidruro de titanio. La rugosidad de los discos fue evaluada mediante un perfilómetro óptico, obteniendo unos valores de  $R_a$  de 0,60  $\mu\text{m}$  para los discos decapados, 3,97  $\mu\text{m}$  para los discos arenados y grabados y 5,21  $\mu\text{m}$  para los discos arenados y pulverizados con hidruro de titanio. Para obtener estos datos, se realizaron 6 mediciones en 3 discos diferentes de cada grupo.

Diversos autores, al igual que nosotros, emplearon discos mecanizados en su estudio además de discos tratados. Por ejemplo Kim (116), utilizó discos de titanio grado 2 mecanizados y arenados con diferentes tamaños de partículas de óxido de aluminio. Cada grupo estaba formado por 36 discos, siendo los grupos: discos mecanizados, discos arenados con partículas de óxido de aluminio de 50  $\mu\text{m}$ , de 75  $\mu\text{m}$ , de 125  $\mu\text{m}$  y de 250  $\mu\text{m}$ . La rugosidad se evaluó cuantitativamente con un interferómetro óptico en 10 discos de cada grupo y cualitativamente con SEM, al igual que en nuestro estudio. Los valores de  $R_a$  obtenidos fueron de 0,6  $\mu\text{m}$  para los discos mecanizados, 1  $\mu\text{m}$  para los discos arenados con partículas de óxido de aluminio de 50  $\mu\text{m}$ , 1,4  $\mu\text{m}$  para los discos arenados con partículas de 75  $\mu\text{m}$ , 2,1  $\mu\text{m}$  para los arenados con 125  $\mu\text{m}$ , y 3,2  $\mu\text{m}$  para los arenados con partículas de 250  $\mu\text{m}$  de óxido de aluminio. Tras el análisis cualitativo a SEM observaron, al igual que nosotros, que los discos mecanizados presentaban ranuras y surcos típicos del proceso de mecanizado. Por otro lado, los discos arenados presentaron un patrón áspero e irregular, con aspecto reticulado y socavado por el chorro a presión de óxido de aluminio.

Como hemos comentado anteriormente, Lotz (120) combinó el microscopio confocal láser como método cuantitativo y el microscopio electrónico de barrido como método

cualitativo, al igual que en nuestro estudio. Se evaluaron con microscopio confocal 3 discos de cada grupo, siendo los grupos: discos arenados con partículas de 250 a 500  $\mu\text{m}$  de óxido de aluminio y posterior grabado con ácido clorhídrico y sulfúrico; discos arenados y grabados del mismo modo, pero mantenidos posteriormente en atmósfera de nitrógeno para evitar el contacto con el aire y en solución de NaCl al 0,9% hasta su esterilización por rayos gamma; y por último, discos con el mismo tratamiento de arenado y grabado que los anteriores, pero mantenidos en solución de NaCl al 0,9% durante 5 semanas, tras lo que se lavaron en agua y se envasaron en papel de aluminio para su esterilización. Según los autores, que midieron el ángulo de contacto con un goniómetro CAM 250 (Ramé Hart®), sólo los discos del segundo grupo eran hidrofílicos, mientras que los otros dos eran hidrofóbicos. Los resultados de rugosidad fueron similares sin diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos, siendo los más rugosos el tercer grupo con un valor Ra de 1,79  $\mu\text{m}$ , seguido del segundo grupo con 1,74  $\mu\text{m}$  y, por último el grupo de discos únicamente arenados y grabados con un Ra de 1,65  $\mu\text{m}$ . La observación de las diferentes superficies con SEM, confirmó la observación cuantitativa con microscopía confocal, encontrándose superficies de topografía muy similar entre los 3 grupos de ensayo.

Podemos observar la variabilidad de resultados de rugosidad (Ra) según los autores consultados. Las diferencias obtenidas según los diferentes autores en los resultados cuantitativos de Ra, pueden atribuirse a diversas variables. Por un lado, al proceso de tratamiento de superficie aplicado.

En el arenado es de gran importancia el tamaño y naturaleza de las partículas, así como la presión, tiempo de proyección, ángulo de incidencia del haz de partículas o distancia entre la boquilla y la superficie. Por otro lado, durante el proceso de grabado ácido se debe considerar la rugosidad superficial previa al grabado, tipo de ácido y concentración del mismo, además de las diferentes combinaciones de ácidos. El tiempo y temperatura del baño ácido también van a influir en el resultado final en cuanto a rugosidad.

Se deben tener en cuenta también las posibles diferencias debidas a los diversos métodos de limpieza de la superficie tras el tratamiento aplicado, ya que pueden quedar impurezas, especialmente tras el arenado. Estos procesos pueden incluir baños,



empleando o no ultrasonidos, en agua desionizada, tricloroetileno o etanol al 70%, neutralización con soluciones de bicarbonato de sodio, etc. (33,107,116,121,134,136,145).

Y, por último, al margen del tratamiento de superficie en sí, puede existir variabilidad en los resultados obtenidos debido a la diferente metodología empleada para evaluar cuantitativamente la rugosidad. Bien sea con perfilómetros de contacto, perfilómetros ópticos, interferómetro óptico, AFM o microscopio confocal de escaneado láser. Además, el número de discos analizados, así como el número de mediciones en cada disco, son como hemos visto muy dispares según autores, aunque la tendencia parece ser analizar sólo un pequeño número de muestras, con lo que la potencia estadística de algunos de los estudios es cuestionable. Sin embargo, en nuestro estudio, al realizar un análisis de todos los discos con 3 mediciones en cada uno de ellos, además de un estudio de homogeneidad de los valores obtenidos, la potencia estadística se considera alta y, por tanto, los datos obtenidos fiables.

Tras el análisis de los resultados obtenidos en nuestro estudio, se observó una tendencia de mayor densidad celular en el grupo M (los discos menos rugosos), seguida del G y posteriormente del GF (los más rugosos). Se encontraron diferencias significativas tras 72 horas de cultivo sin melatonina entre el grupo M y el GF. Y entre todos los grupos tras 72 horas de cultivo en presencia de melatonina. Además, se observó un patrón de aumento de la densidad celular, tanto a 24 como a 72 horas de cultivo, en los grupos con adición de melatonina comparados con sus homólogos en que no se adicionó melatonina al medio de cultivo, aunque sólo con diferencias significativas en el grupo M tras 72 horas de cultivo.

Balloni (126), realizó el cultivo *in vitro* de células mesenquimales hMSCs sobre discos mecanizados y discos grabados con ácido fluorhídrico y ácido clorhídrico, como los utilizados en nuestro estudio. Tras 24 y 48 horas de cultivo, concluyó que no se observaban diferencias significativas de adhesión y proliferación celular entre los grupos

## DISCUSIÓN

de estudio, aunque los resultados de densidad celular obtenidos sí fueron ligeramente mayores en el titanio mecanizado, del mismo modo que en nuestro estudio.

Kim (116) cultivó células MG63 sobre discos mecanizados y arenados con diferentes tamaños de partículas. Evaluó la densidad celular 24 horas después de alcanzar el estado de confluencia en el grupo control (plástico de los pocillos de cultivo, tras 6-7 días de la siembra), obteniendo menor densidad celular conforme aumentaba la rugosidad, con diferencias estadísticamente significativas.

Del mismo modo, Olivares-Navarrete (140) realizó un cultivo también de células MG63 sobre discos de titanio grado 5 mecanizados y grabados. Como grupo control se empleó el correspondiente a células crecidas directamente sobre el plástico de los pocillos de las placas de cultivo. Tras 24 horas de que este grupo control alcanzase el estado de confluencia, se midió la densidad celular obteniendo, al igual que en nuestro estudio y en el de los autores anteriores, menor densidad celular en los discos más rugosos, en este caso los grabados. Al igual que Gittens (117), que también cuantificó la densidad celular de células MG63 24 horas después de que se alcanzase la confluencia en las células crecidas sobre el plástico de los pocillos de las placas de cultivo, observando, al igual que otros autores, menor densidad celular en los discos rugosos.

Diferentes autores estudiaron la proliferación en discos de titanio tratados con recubrimiento de hidroxiapatita. Kim (136), llevó a cabo el cultivo de células MG63 sobre discos de titanio grado 4 pulidos, tratados con arenado y grabado ácido, con recubrimiento de nitrato de titanio y con recubrimiento de hidroxiapatita, al igual que en nuestro estudio. Los discos más rugosos fueron los tratados con hidroxiapatita, seguidos de los arenados y grabados. La proliferación se evaluó a las 72 horas de cultivo, obteniendo el resultado más bajo con diferencias estadísticamente significativas en los discos tratados con hidroxiapatita, seguidos de los discos arenados y grabados. Coincidiendo con los datos de mayor rugosidad, al igual que en nuestro estudio.

Del mismo modo, Du (125) realizó el cultivo con células mesenquimales humanas sobre discos mecanizados y discos con recubrimiento de hidroxiapatita mediante deposición biomimética, pero sin llegar a cuantificar la rugosidad de los discos. Se realizó un

recuento celular tras 24 horas de cultivo y no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos.

Sin embargo en el estudio de Chen (113), se cultivaron células mesenquimales de conejo sobre rectángulos de titanio grado 1 pulidos y tratados con recubrimiento de hidroxiapatita mediante electroforesis. No se analizó cuantitativamente la rugosidad de las superficies, pero sí se cuantificó la proliferación tras 96 horas de cultivo, observándose un mayor número de células en los discos con hidroxiapatita que en los discos pulidos. Aunque cabe señalar que tan sólo se evaluaron 3 muestras de cada grupo.

La disminución de la producción de melatonina con la edad se ha sugerido como uno de los motivos del envejecimiento del sistema inmunológico y el desarrollo de neoplasias, por lo que algunos autores defienden su posible uso como agente terapéutico antitumoral, aunque no se ha podido demostrar de forma exacta el mecanismo de acción.

Se ha estudiado el efecto de la melatonina en la inhibición de la proliferación de células cancerosas, como células de cáncer de próstata y ovario, células de melanoma o carcinoma hepatocelular, de cáncer de mama, colon y recto (164). Estos estudios se basan en que la melatonina puede influir en la proliferación celular inhibiéndola o favoreciéndola según el tipo de células estudiadas, la concentración de melatonina empleada y el tiempo de cultivo. Panzer (151), ya en el año 1997, realizó el cultivo *in vitro* de diferentes células de origen tumoral para observar el posible efecto antiproliferativo de la melatonina como tratamiento antineoplásico. Utilizó células de carcinoma cervical, de cáncer de mama, células linfoblastoides y células MG63, como las utilizadas en nuestro estudio, procedentes de un osteosarcoma humano. No se observó influencia en la proliferación, ciclo celular o morfología de ninguno de los tipos celulares del estudio, pero es necesario destacar que la concentración de melatonina aplicada fue entre  $10^{-7}$  y  $0,1 \mu\text{M}$ , lo que supone dosis que apenas alcanzan las concentraciones fisiológicas o incluso inferiores.

Liu (165), en el año 2013, señaló la influencia que tendría para tal fin la concentración a la que se emplease la melatonina. En su estudio, cultivó células MG63 con diferentes

## DISCUSIÓN

concentraciones de melatonina, desde 1 nM (0,001  $\mu$ M) a 10 mM (10000  $\mu$ M). Sus resultados demostraron que sólo a partir de 1-2 mM, se obtenía una tendencia de disminución de la proliferación, pero sin diferencias estadísticamente significativas. Y no era hasta 4 mM, que esta disminución de la proliferación se volvía significativa en comparación con el grupo control en ausencia de melatonina. Además apuntaron, como se ha comentado, que este efecto depende no sólo de la concentración de melatonina, sino también del tipo celular. También Liu (166), dos años antes, había llevado a cabo un estudio *in vitro* con osteoblastos fetales humanos de la línea celular hFOB-1. Utilizó concentraciones de melatonina entre 1 nM y 1 mM, observando que la concentración de 1 mM disminuía la proliferación, a diferencia de lo observado con las células MG63. También se observó que las concentraciones por debajo de 1 mM, no sólo no disminuían la proliferación, sino que la aumentaban, aunque sin diferencias estadísticamente significativas.

Estas investigaciones demuestran que la melatonina a la concentración utilizada en nuestro estudio no tiene un papel de inhibición de la proliferación, ni siquiera teniendo en cuenta el posible origen tumoral de la línea celular, como las células MG63 empleadas en nuestro estudio, por lo que esta posible influencia en los resultados obtenidos queda descartada.

A la hora de comparar nuestros resultados con otras investigaciones, se debe tener en cuenta la concentración de melatonina empleada. Como hemos comentado, algunos autores (99,148,154–156,167) utilizan concentraciones muy bajas de melatonina en sus estudios, todos ellos menores de concentraciones farmacológicas y algunos incluso por debajo de concentraciones fisiológicas. Por lo que sus resultados en cuanto a la influencia de la melatonina en el comportamiento celular, no son comparables a los nuestros a pesar de ser estudios metodológicamente similares. Nos centraremos pues en los estudios que emplean melatonina a concentraciones farmacológicas.

Como se ha mencionado, Nakade (98) realizó el cultivo de células humanas mandibulares (HOB-M) y de células de la línea celular osteoblástica humana (SV-HFO). Las células se cultivaron en ausencia de melatonina (grupo control) y en presencia de 5, 10, 50 y 100  $\mu$ M de concentración de melatonina. La dosis con que se observó un mayor

nivel de proliferación en ambos tipos celulares a las 72 horas de cultivo fue 50  $\mu\text{M}$ . Pero de nuevo se observaron variaciones según el tipo celular, ya que las células SV-HFO exhibieron un aumento progresivo de la proliferación de 0 a 50  $\mu\text{M}$  para luego descender ligeramente a 100  $\mu\text{M}$  de concentración. Mientras que las células HOB-M no experimentaron cambio en capacidad proliferativa de 0 a 5  $\mu\text{M}$ , pero luego ésta aumentó rápidamente alcanzando un máximo a 50  $\mu\text{M}$ , para luego descender, a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , aproximadamente a los mismos niveles de proliferación que las HBO-M a 100  $\mu\text{M}$ .

En el estudio llevado a cabo por Pérez (153) con células madre mesenquimales adultas y empleando concentraciones de melatonina entre 0,01 y 150  $\mu\text{M}$ , todas las dosis de melatonina provocaron un ligero aumento de la proliferación respecto al grupo control a las 72 horas de cultivo, pero sin diferencias significativas, de forma similar a nuestro estudio, en el que como se ha comentado sólo se observó un aumento estadísticamente significativo en el grupo M.

Del mismo modo, Zhang (143) realizó el cultivo de células mesenquimales humanas (hMSCs) en ausencia de melatonina (grupo control) y empleando concentraciones de 0,01, 1 y 100  $\mu\text{M}$ . La densidad celular se vio aumentada en todas las dosis en comparación con el grupo control tras 24 horas, pero tras 48 y 96 h apenas se apreció diferencia, por lo que concluyeron que la melatonina, aunque sí incrementaba los valores, parecía no afectar significativamente a la proliferación de células hMSCs. Algo similar muestra el estudio de Son (162) con células MC3T3 y melatonina a 10, 50, 100 y 250  $\mu\text{M}$ . Tras 24, 48 y 72 horas. Se observó que la proliferación aumentó ligeramente en los grupos tratados con melatonina, pero también sin diferencias estadísticamente significativas, lo que de nuevo se corresponde con los resultados obtenidos en nuestro estudio.

De similar manera, Satomura (144) cultivó osteoblastos humanos obtenidos de hueso mandibular o hueso iliaco adicionando al medio de cultivo melatonina a concentraciones finales entre 1 y 200  $\mu\text{M}$ . Se evaluó la proliferación tras 5 días de cultivo, obteniendo mayores niveles de densidad celular en las dosis a partir de 50  $\mu\text{M}$ , con diferencias estadísticamente significativas.

Las imágenes tomadas con SEM de los diferentes discos de nuestro estudio, muestran cómo las células MG63 adoptaron una disposición completamente distinta en las superficies mecanizadas y las superficies tratadas. En los discos mecanizados, las células se dispusieron de forma concéntrica siguiendo las líneas y microsurcos que produce el mecanizado. Mientras que en las superficies rugosas, tanto del grupo G como del GF, lo hicieron disponiéndose aleatoriamente por la superficie.

Tras el análisis de los resultados de área celular obtenidos en nuestro estudio, las células de mayor área fueron las del grupo M, seguidas de las del grupo G y por último las del grupo GF, con diferencias estadísticamente significativas tanto tras 24 como 72 horas de cultivo, en ausencia y presencia de melatonina. Además, la melatonina tuvo un efecto reductor del tamaño celular en todos los grupos respecto a sus homólogos en ausencia de melatonina, con diferencias estadísticamente significativas. De forma similar, al aumentar el tiempo de cultivo de 24 a 72 horas se redujo el tamaño celular en todos los grupos, aunque sólo con diferencias estadísticamente significativas en los grupos M y G en ausencia de melatonina y M en presencia de melatonina. Como se indicó en el correspondiente apartado, se observó también que, comparando las células cultivadas durante 24 o 72 horas, el área celular se volvía más homogénea a más tiempo de cultivo, observándose un estrechamiento de las respectivas gráficas de frecuencia, una menor dispersión de las medidas.

En cuanto al índice de redondez, fue significativamente menor, más próximo a 1 (células más redondeadas) en el grupo G, tanto a 24 como a 72 horas de cultivo en ausencia y presencia de melatonina. Tras 24 horas de cultivo en ausencia y presencia de melatonina, al igual que tras 72 horas de cultivo en ausencia de melatonina, las células más redondeadas, tras las del grupo G, fueron las del grupo GF y, por último, las del grupo M, sin diferencias significativas entre ambos grupos. Mientras que tras 72 horas de cultivo en presencia de melatonina, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos. Además, las células de las muestras cultivadas en presencia de melatonina, fueron significativamente más redondeadas que sus homólogas sin melatonina. Y el aumento del tiempo de cultivo de 24 a 72 horas también

disminuyó el índice de redondez haciéndolas más redondeadas, con diferencias estadísticamente significativas en todos los grupos en ausencia de melatonina y en los grupos G y M cuando la melatonina estuvo presente en el medio de cultivo.

Balloni (126) observó los diferentes patrones morfológicos de las células mesenquimales de su estudio con SEM. Concluyó que los discos mecanizados presentaban células aplanadas con largas prolongaciones en todas direcciones, mientras que en los grabados las células eran más cuboidales, con prolongaciones más cortas.

Por otro lado, Orsini (36) llevó a cabo un estudio en el que analizaba la respuesta de las células osteoblásticas MG63, cultivadas sobre discos de titanio mecanizado y tratados mediante arenado con partículas de alúmina y posterior grabado ácido dual con ácido fluorhídrico al 1% y ácido nítrico al 30%. Los autores sólo especifican la rugosidad media (Ra) del grupo de discos tratados, siendo de 2,15  $\mu\text{m}$ , pero en la publicación no se especifica cuántos discos se midieron, cuántas mediciones se realizaron de cada disco medido, ni qué método se utilizó para ello. El análisis morfológico se llevó a cabo a través de la observación de imágenes con el microscopio electrónico de barrido, de nuevo sin especificar cuántas imágenes fueron tomadas y de cuántos discos. Tras él, concluyeron que las superficies mecanizadas presentaban células con una morfología más aplanada, mientras que en las superficies rugosas las células tenían una morfología irregular y gran cantidad de pseudópodos. Según su interpretación esto podría mejorar la adhesión inicial y, por tanto, favorecer una mejor oseointegración in vivo.

Del mismo modo Kim (134), como hemos visto anteriormente, empleó en su estudio discos de titanio grado 5 mecanizados y arenados sobre los que cultivó células MG63. Se evaluó la morfología mediante imágenes tomadas con microscopía electrónica de barrido a las 24 horas de cultivo, al igual que en nuestro estudio, concluyendo que las células crecidas en los discos pulidos eran aplanadas y alargadas, mientras que en los discos arenados podían apreciarse células con márgenes irregulares y gran cantidad de filopodios.

En el ya mencionado estudio de Kim (136), tras el análisis morfológico realizado mediante la observación de diferentes imágenes tomadas con SEM, percibieron una mayor “interacción célula-célula” en las superficies de menor rugosidad (titanio pulido),

mientras que en las de mayor rugosidad, las tratadas mediante arenado y grabado ácido y las tratadas con recubrimiento de hidroxiapatita, apreciaron una mayor “interacción célula-matriz”. Pero hay que tener en cuenta que en este estudio no se especifica cuántas imágenes se analizaron para llegar a estas conclusiones, ni de cuántas muestras se tomaron imágenes. Tampoco se da información de los valores de rugosidad, ya que tan sólo indica qué grupo de discos es más rugoso que otros, pero no especifica en qué se basa para llegar a esa conclusión, si se ha medido la rugosidad de una o varias muestras de cada grupo ni mediante qué metodología. Además, tampoco se aporta información acerca del método de deposición del recubrimiento de hidroxiapatita.

Sohn (121) realizó el cultivo *in vitro* de células osteoblásticas MG63 para observar el comportamiento sobre discos de titanio grado 4. Un grupo de discos fue tratado por anodizado y otros por anodizado y recubrimiento con hidroxiapatita de diferentes tamaños de partícula: 1  $\mu\text{m}$ , 100 nm y 500-700 nm. Los autores tampoco aportan en este caso ningún dato de rugosidad ni el tipo de proceso con el que se depositó la hidroxiapatita. La morfología fue observada mediante microscopía electrónica de barrido, de nuevo sin indicar el número de discos observados ni cuántas imágenes se tomaron de cada uno de ellos. Tras ello, concluyeron que las superficies anodizadas y anodizadas y recubiertas con partículas de hidroxipatita de 1  $\mu\text{m}$  y 100 nm, mostraban patrones morfológicos con “interacción célula-matriz”. En el caso de las superficies anodizadas, se observaron células pequeñas, redondas y con pseudópodos cortos, mientras que en el caso de los discos tratados con partículas de hidroxiapatita de 1  $\mu\text{m}$ , las células mostraron gran cantidad de largos pseudópodos. Por otro lado, detallan que los discos tratados con partículas de hidroxiapatita de 500-700 nm presentaron un patrón morfológico con “interacción célula-célula” y prácticamente sin pseudópodos.

Du (125) realizó un estudio morfológico a partir de imágenes tomadas con SEM. Sus observaciones fueron que las muestras mecanizadas presentaban células que se extendían ampliamente sobre la superficie, con gran cantidad de filopodios, mientras que las muestras con hidroxiapatita presentaban células con un esparcimiento mínimo y menor cantidad de filopodios. En el estudio llevado a cabo por Chen (113) se evaluó la morfología también con SEM. Dedujeron únicamente que tras 48 horas de cultivo, las muestras de titanio pulido presentaban células alargadas con forma ahusada, mientras



que las muestran con hidroxiapatita presentaban células distribuidas aleatoriamente por la superficie y en las que podían observarse pseudópodos.

En la mayoría de los estudios en que los autores emplean melatonina como suplemento o aditivo en los cultivos celulares no se realiza un análisis morfológico de ningún tipo. En el ya citado estudio de Pérez (153), se observó la morfología celular mediante SEM con imágenes de las células tomadas tras 3 y 7 días de cultivo. A los 3 días, las células del grupo control (sin adición de melatonina) estaban separadas ocupando el espacio de pocillo disponible y presentando un aspecto alargado. Las células de los grupos con melatonina presentaron este mismo aspecto, observándose células de forma aislada o formando grupos pequeños y dispersos. Mientras que a los 7 días, las células cultivadas en ausencia de melatonina mostraron un aspecto aplanado y alargado con algunas prolongaciones citoplasmáticas, de forma similar a las células cultivadas en presencia de melatonina, que exhibieron una forma aplanada y prolongaciones citoplasmáticas delgadas sobre la superficie del plástico. Los autores concluyeron que no se observaban diferencias morfológicas ni estructurales en las células de los grupos tratados con diferentes dosis de melatonina, ni entre ellos ni respecto al grupo control.

Tras analizar los resultados de la cuantificación de la expresión de los diferentes genes relacionados con la diferenciación osteoblástica, se apreció una tendencia de mayores niveles de expresión en el grupo GF, el de mayor rugosidad y en el que se observaron menores niveles de adhesión y proliferación celular. Tras 1 semana de cultivo en ausencia de melatonina, el gen que mostró un mayor incremento en la expresión relativa fue BGLAP en el grupo GF, aunque sin diferencias significativas con el resto de grupos. Tras 5 semanas de cultivo en ausencia de melatonina todos los genes mostraron una mayor expresión relativa en el grupo GF, aunque sólo con diferencias estadísticamente significativas con el resto de grupos en el caso del gen PHEX. Además, cabe destacar que en general la melatonina aumentó la expresión relativa de los genes tras 1 semana de cultivo. Y del gen PHEX en todos los grupos tras 5 semanas de cultivo.

Diversos autores han cuantificado en sus estudios con células MG63 la expresión génica de diferentes ARNm para evaluar la diferenciación osteoblástica. Meng (123) realizó el

cultivo de estas células sobre discos de titanio mecanizados, discos arenados y grabados y un tercer grupo de discos tratados por grabado electroquímico. Cuantificó tras 1, 3, 5 y 7 días de cultivo los ARNm de OCN, COLT-1 y RUNX2. Se observó una tendencia que apuntaba a mayores niveles de expresión relativa de todos los genes estudiados en los discos tratados y con mayor rugosidad que los mecanizados.

De forma análoga, Fleischmann (109) empleó en su estudio discos de titanio grado 5 mecanizados, tratados con recubrimiento de nitruro de titanio y otros con recubrimiento de politetrafluoroetileno. Cuantificó tras 1 semana de cultivo, al igual que en nuestro estudio, diferentes ARNm observando mayores niveles de expresión relativa de ALP, OCN y OPG en los discos tratados, con diferencias estadísticamente significativas. Por otra parte, también observaron mayores niveles de expresión de COLT-1 y RANKL en discos tratados respecto a los mecanizados, aunque sin diferencias significativas. Los autores no aportaron datos de rugosidad, pero sí se evaluó la proliferación tras 48 horas de cultivo, que fue menor en los discos tratados en comparación con la observada en los mecanizados, al igual que en nuestro estudio.

Lincks (33) llevó a cabo el cultivo sobre discos de titanio grado 5 pulidos y rugosos por lijado con óxido de aluminio. 24 horas después de que las células crecidas sobre la superficie de plástico de los pocillos de las placas de cultivo alcanzasen la confluencia, se evaluó la densidad celular, la actividad de ALP y la producción de OCN y COLT-I. Los resultados mostraron una menor densidad celular en los discos rugosos, pero mayor actividad de ALP y producción de OCN y COLT-1 y, por tanto, mayor diferenciación, de forma similar a nuestro estudio.

En el ya citado estudio de Olivares-Navarrete (140), se realizó una cuantificación de los ARNm de BMP 2 y 4 tras el mismo periodo de cultivo en el que se estimó la densidad celular, es decir, 24 horas tras que las células alcanzasen el estado de confluencia en el grupo control. Los resultados obtenidos fueron mayores niveles de expresión relativa de BMP 2 y 4 en los discos grabados, coincidiendo de nuevo con la mayor rugosidad y la menor densidad celular. Un resultado equiparable es el descrito en el estudio de Kim (116), en el que se obtuvieron mayores niveles de expresión de RUNX2 y menor

proliferación celular en los discos arenados con mayor tamaño de partícula y, por tanto, más rugosos.

De forma similar Gittens (117), como se ha mencionado, utilizó como marcador de diferenciación la producción de OCN, obteniendo como resultado mayores niveles en las células crecidas sobre superficies rugosas, que mostraron a su vez menor proliferación.

Sin embargo Kim (134), cuantificó el ARNm de COLT-1. La densidad celular observada fue menor en los discos arenados, los más rugosos, pero no se apreciaron cambios en la cantidad de ARNm COLT-1 expresado comparando los discos mecanizados y los arenados. Hay que señalar que los mismos autores indican que seguramente este resultado se debiese al tiempo de cultivo en el que se realizó la observación, tan sólo 24 horas, y que probablemente se observasen cambios a tiempos de cultivo más largos.

Por otro lado, Balloni (126) en su comentado estudio de células mesenquimales hMSCs, midió la expresión de diferentes genes tras 15 días de cultivo. Los resultados obtenidos fueron mayores niveles de expresión de RUNX2, BMP2, OSX, BSP, ALP y COLT-1 en los discos grabados con respecto a los no tratados, con diferencias estadísticamente significativas. Además, comprobaron una mayor actividad enzimática de ALP en discos grabados respecto a los mecanizados. Estos cambios observados coinciden con la mayor rugosidad de estos discos y la menor densidad celular obtenida. Sin embargo, el nivel de expresión relativa del ARNm de OPN, fue mayor en los discos mecanizados.

Bang (161), cuantificó la expresión de diferentes genes ARNm tras 2 y 3 semanas de cultivo de células MC3T3 sobre discos de titanio mecanizado y discos tratados por arenado y posterior grabado ácido. Además, también cuantificó la actividad de ALP, obteniendo mayores niveles de actividad de ALP y de expresión génica relativa de RUNX2, OPN, OCN y ALP y, por tanto, mayor diferenciación, en los discos rugosos.

En el comentado estudio de Du (125), se cuantificó el ARNm de COLT-1, ALP y OCN tras 72 horas de cultivo. Las muestras de titanio con hidroxiapatita mostraron una mayor expresión relativa de COLT-1 y ALP que las muestras mecanizadas, pero menor de OCN, aunque en todos los casos las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

## DISCUSIÓN

Por otro lado, Satomura (144) evaluó la cantidad relativa de ARNm de COLT-1, OCN, OPN y BSP. La adición de melatonina aumentó la expresión génica relativa de todos ellos, de forma similar a los resultados obtenidos en nuestro estudio tras 1 semana de cultivo.

Pérez (153) evaluó la cantidad relativa de ARNm de COLT-1 y OCN. Como se ha mencionado anteriormente, según los autores la concentración ideal fue la de 50  $\mu\text{M}$  (la empleada en nuestro estudio), ya que en esas condiciones a los 14 días de cultivo se observaron altos niveles de expresión relativa de los genes cuantificados. Cuando se empleó una concentración de 100  $\mu\text{M}$  se obtuvieron resultados similares, aunque menos patentes, mientras que la dosis de 150  $\mu\text{M}$  no tuvo efecto sobre la expresión génica de forma significativa.

De forma análoga, Zhang (143) describió en los resultados de su estudio de expresión génica mayores niveles relativos de los ARNm de ALP, OPN y OCN a los 12 días de cultivo con melatonina, de forma dosis dependiente. En un estudio similar, Son (162) cuantificó la cantidad relativa de los ARNm de ALP, COLT-1, OCN y OSX tras 1, 3, 7 y 14 días de cultivo, observando un mayor nivel de expresión relativa de forma dosis-tiempo dependiente.

Sin embargo, en el ya citado estudio llevado a cabo por Nakade (98), tras 4 días de cultivo midieron diferentes marcadores de diferenciación osteoblástica. Se observó un aumento significativo de la producción de COLT-1 en las muestras en que se adicionó 50 y 100  $\mu\text{M}$  de melatonina al medio de cultivo, pero no de la actividad de ALP ni la producción de OCN.

En general, en los estudios consultados los mayores niveles de expresión relativa de genes o la mayor cantidad de proteínas relacionadas con la diferenciación osteoblástica y la mineralización, suelen mostrarlos las células cultivadas sobre los discos de titanio de mayor rugosidad empleados en el correspondiente trabajo. A la hora de comparar los resultados es necesario tener presente la variabilidad en cuanto a los tiempos de cultivo, los ARNm o proteínas cuantificadas, la diferente metodología de cuantificación, la superficie en la que cultivan las células, la línea celular empleada, etc. Por otro lado, la adición de melatonina parece incrementar la expresión de los diferentes genes, aunque de nuevo se deben considerar las variables antes mencionadas, además de que

los cultivos celulares *in vitro* con adición de melatonina publicados han sido llevados a cabo sobre placas de cultivo y no sobre titanio, por lo que los resultados, tanto para la expresión génica como la densidad celular y la morfología deben ser comparados con cautela.

## CONCLUSIONES

## **7. CONCLUSIONES**

---

## CONCLUSIONES



De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio *in vitro*, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. Al estudiar la topografía superficial de los discos de titanio observamos que:

1.1. Cuantitativamente, la menor rugosidad se obtuvo en los discos mecanizados (grupo M), seguido de los discos tratados con grabado ácido dual (grupo G) y, por último, los más rugosos los tratados con grabado ácido dual y recubrimiento con fosfato cálcico (grupo GF).

1.2. Cualitativamente, el proceso de mecanizado generó surcos concéntricos en la superficie de los discos. Mientras que el tratamiento de grabado ácido dual, seguido o no de recubrimiento con fosfato cálcico, generó una superficie microtexturizada, con múltiples oquedades o pocillos irregulares.

2. Al analizar la influencia de la rugosidad del titanio sobre el comportamiento de las células osteoblásticas humanas cultivadas *in vitro* sobre discos de titanio apreciamos que:

2.1. Las características superficiales de los discos no influyeron significativamente en la adhesión inicial de las células. Sin embargo, una vez adheridas, las células proliferaron más rápidamente sobre las superficies menos rugosas (grupo M), siendo menor la proliferación conforme aumentó la rugosidad de los discos (grupos G y GF).

2.2.A. El área celular fue significativamente mayor cuando las células se adhirieron y proliferaron sobre una superficie menos rugosa (grupo M) y disminuyó conforme aumentaba la rugosidad superficial (grupos G y GF).

2.2.B. El índice de redondez fue significativamente mayor en las células cultivadas sobre discos tratados con grabado ácido dual (grupo G), en comparación con las cultivadas sobre discos mecanizados o con recubrimiento de fosfato cálcico.

## CONCLUSIONES

2.3. El crecimiento de las células sobre discos tratados mediante grabado ácido dual y recubrimiento con fosfato cálcico (grupo GF) provocó una mayor expresión del gen PHEX, pudiéndose relacionar con un fenotipo de células osteoblásticas más diferenciadas.

3. Al analizar la influencia de la adición de melatonina sobre el comportamiento de las células osteoblásticas humanas cultivadas *in vitro* sobre discos de titanio observamos que:

3.1. La adición de melatonina aumentó, aunque no significativamente, la adhesión inicial de las células. Una vez adheridas, la adición de melatonina hizo que las células proliferaran más, aunque sólo de forma significativa en el grupo de discos mecanizados (grupo M).

3.2.A. El área celular fue significativamente menor cuando las células se adhirieron y proliferaron en presencia de melatonina.

3.2.B. El índice de redondez fue significativamente menor cuando las células se adhirieron y proliferaron en presencia de melatonina.

3.3. Tras 1 semana de cultivo en presencia de melatonina, aumentó la expresión de los genes PHEX y SPARC en todos los grupos, siendo mayor la expresión del gen PHEX en el grupo GF. Tras 5 semanas de cultivo en presencia de melatonina, aumentó la expresión del gen PHEX en todos los grupos.



## **8. BIBLIOGRAFÍA**

---



## BIBLIOGRAFÍA

1. Bränemark PI, Zarb G AT. Tissue-Integrated Prostheses. Osseointegration in Clinical Dentistry. 2<sup>o</sup> edición. Chicago: Quintessence; 1988.
2. Misch CE. Implantología contemporánea. 3<sup>a</sup> ed. Barcelona: Elsevier España; 2009.
3. Aparicio CJ. Tratamientos de superficie sobre titanio comercialmente puro para la mejora de la oseointegración de los implantes dentales [Tesis doctoral]. Barcelona: Universitat Politècnica de Catalunya; 2004.
4. Gheron P. Bone matrix proteoglycans and glycoproteins. En: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan G, editores. Principles of bone biology. San Diego: Academic Press; 2002. p. 225–38.
5. Prieto S. Fisiología del hueso. En: Tresguerres J, editor. Fisiología humana. 3<sup>a</sup> ed. Madrid: McGraw-Hill; 2005. p. 981–94.
6. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. Science. 2000;289(5484):1504–8.
7. Väänänen K, Zhao H. Osteoclast function: biology and mechanisms. En: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan G, editores. Principles of bone biology. San Diego: Academic Press; 2002. p. 127–40.
8. McCauley LK, Nohutcu RM. Mediators of Periodontal Osseous Destruction and Remodeling: Principles and Implications for Diagnosis and Therapy. J Periodontol. 2002;73(11):1377–91.
9. Schroeder A, van der Zypen E, Stich H, Sutter F. The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. J Maxillofac Surg. 1981;9(1):15–25.
10. Steflik DE, Parr GR, Sisk AL, Lake FT, Hanes PJ, Berkery DJ, et al. Osteoblast activity at the dental implant-bone interface: transmission electron microscopic and high voltage electron microscopic observations. J Periodontol. 1994;65(5):404–13.
11. Kawahara H, Kawahara D, Hayakawa M, Tamai Y, Kuremoto T, Matsuda S. Osseointegration under immediate loading: biomechanical stress-strain and bone formation-resorption. Implant Dent. 2003;12(1):61–8.
12. Bidez MW, Misch CE. Force transfer in implant dentistry: basic concepts and principles. J Oral Implantol. 1992;18(3):264–74.
13. Alley BS, Kitchens GG, Alley LW, Eleazer PD. A comparison of survival of teeth following endodontic treatment performed by general dentists or by specialists. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;98(1):115–8.
14. Malchiodi L, Quaranta A, D'Addona A, Scarano A, Quaranta M. Jaw reconstruction with grafted autologous bone: early insertion of osseointegrated implants and early prosthetic loading. J Oral Maxillofac Surg. 2006;64(8):1190–8.
15. Linkow LI, Cherchève R. Theories and Techniques of Oral Implantology. 1<sup>a</sup> ed. Michigan: C. V. Mosby Company; 1970.

16. Bartee B. The use of high-density polytetrafluoroethylene membrane to treat osseous defects: clinical reports. *Implant Dent.* 1995;4(1):21–6.
17. White SN, Miklus VG, Potter KS, Cho J, Ngan YA . Endodontics and implants: a catalog of therapeutic contrasts. *J Evid Based Dent Pr.* 2006;6(1):101–9.
18. Shabahang S, Bohsali K, Boyne PJ, Caplanis N, Lozada J, Torabinejad M. Effect of teeth with periradicular lesions on adjacent dental implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;96(3):321–6.
19. Moiseiwitsch J. Do dental implants toll the end of endodontics? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;93(6):633–4.
20. Melo MD, Shafie H, Obeid G. Implant survival rates for oral and maxillofacial surgery residents: a retrospective clinical review with analysis of resident level of training on implant survival. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006;64(8):1185–9.
21. Albrektsson T, Bränemark P, Hansson H, Lindström J. Osseointegrated Titanium Implants : Requirements for Ensuring a Long-Lasting , Direct Bone-to- Implant Anchorage in Man. 1981;52(2):155–70.
22. Misch CE. *Dental Implant Prosthetics.* 2<sup>a</sup> ed. St. Louis: Elsevier Health Sciences; 2014.
23. Walter M, Boning K . Is titanium an alternative for base metal alloys? *Journal Chem Inf Model.* 1991;41(9):315–9.
24. Pero-Sanz J. *Ciencia e ingeniería de materiales: estructura, transformaciones, propiedades y selección.* 5<sup>a</sup> ed. Madrid: Cie Inversiones Editoriales Dossat; 2006.
25. Könönen M, Hormia M, Kivilahti J, Hautaniemi J, Thesleff I. Effect of surface processing on the attachment, orientation, and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. *J Biomed Mater Res.* 1992;26(10):1325–41.
26. Baleani M, Viceconti M, Toni A. The effect of sandblasting treatment on endurance properties of titanium alloy hip prostheses. *Artif Organs.* 2000;24(4):296–9.
27. Hacking SA, Bobynd JD, Tanzer M, Krygier JJ. The osseous response to corundum blasted implant surfaces in a canine hip model. *Clin Orthop Relat Res.* 1999;(364):240–53.
28. Davies J. *Bone engineering.* 1<sup>a</sup> ed. Toronto: Em squared Inc; 2000.
29. Sinha RK, Morris F, Shah SA, Tuan RS. Surface composition of orthopaedic implant metals regulates cell attachment, spreading, and cytoskeletal organization of primary human osteoblasts in vitro. *Clin Orthop Relat Res.* 1994;(305):258–72.
30. Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Dufresne E, Judas D, Lost A, et al. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *J Biomed Mater Res.* 2000;49(2):155–66.

31. Boyan BD, Lincks J, Lohmann CH, Sylvia VL, Cochran DL, Blanchard CR, et al. Effect of surface roughness and composition on costochondral chondrocytes is dependent on cell maturation state. *J Orthop Res.* 1999;17(3):446–57.
32. Mellado A. Estudio del comportamiento electroquímico y corrosión galvánica de aleaciones biomédicas para implantes dentales y supraestructuras. [Tesis doctoral]. Valencia: Universitat de València; 2016.
33. Lincks J, Boyan BD, Blanchard CR, Lohmann CH, Liu Y, Cochran DL, et al. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomater Silver Jubil Compend.* 1998;19(23):2219–32.
34. Darvell BW, Samman N, Luk WK, Clark RK, Tideman H. Contamination of titanium castings by aluminium oxide blasting. *J Dent.* 1995;23(5):319–22.
35. Placko HE, Mishra S, Weimer JJ, Lucas LC. Surface characterization of titanium-based implant materials. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000;15(3):355–63.
36. Orsini G, Assenza B, Scarano A, Piattelli M, Piattelli A. Surface analysis of machined versus sandblasted and acid-etched titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000;15(6):779–84.
37. Kasemo B, Lausmaa J. Biomaterial and implant surfaces: on the role of cleanliness, contamination, and preparation procedures. *J Biomed Mater Res.* 1988;22:145–58.
38. Marti A. Cobalt-base alloys used in bone surgery. *Injury.* 2000;31 Suppl 4:18–21.
39. Lin H-Y, Bowers B, Wolan JT, Cai Z, Bumgardner JD. Metallurgical, surface, and corrosion analysis of Ni-Cr dental casting alloys before and after porcelain firing. *Dent Mater.* 2008;24(3):378–85.
40. Brown S a, Lemons JE. *Medical Applications of Titanium and Its Alloys: The Material and Biological Issues.* Michigan: ASTM; 1996.
41. Frost H. The mechanostat: a proposed pathogenic mechanism of osteoporoses and the bone mass effects of mechanical and nonmechanical agents. *Bone Min.* 1987;2(2):73–85.
42. Schultze-Mosgau S, Schliephake H, Radespiel-Troger M, Neukam FW. Osseointegration of endodontic endosseous cones: zirconium oxide vs titanium. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000;89(1):91–8.
43. Scarano A, Di Carlo F, Quaranta M, Piattelli A. Bone response to zirconia ceramic implants: an experimental study in rabbits. *J Oral Implantol.* 2003;29(1):8–12.
44. Steinemann SG. Titanium - the material of choice? *Periodontol 2000.* 1998;17:7–21.
45. Bobyn JD, Mortimer ES, Glassman AH, Engh CA, Miller JE . Producing and avoiding stress shielding. Laboratory and clinical observations of noncemented total hip



- arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res.* 1992;(274):79–96.
46. Milosev I, Metikos-Hukovic M, Strehblow HH. Passive film on orthopaedic TiAlV alloy formed in physiological solution investigated by X-ray photoelectron spectroscopy. *Biomaterials.* 2000;21(20):2103–13.
  47. Luckey HA KFJ. *Titanium Alloys in Surgical Implants.* 1<sup>a</sup> ed. Philadelphia: ASTM; 1983.
  48. Harvey AG, Hill EW, Bayat A. Designing implant surface topography for improved biocompatibility. *Expert Rev Med Devices.* 2013;10(2):257–67.
  49. Crespo L. Interacciones de células del linaje osteoblástico con biomateriales. Influencia en las comunicaciones celulares mediadas por factores solubles [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 2015.
  50. Ventre M, Causa F, Netti P. Determinants of cell-material crosstalk at the interface: towards engineering of cell instructive materials. *J R Soc Interface.* 2012;9(74):2017–32.
  51. Golec TS, Krauser JT. Long-term retrospective studies on hydroxyapatite coated endosteal and subperiosteal implants. *Dent Clin North Am.* 1992;36(1):39–65.
  52. McGlumphy EA, Peterson LJ, Larsen PE, Jeffcoat MK. Prospective study of 429 hydroxyapatite-coated cylindrical omniloc implants placed in 121 patients. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18(1):82–92.
  53. Scortecchi GM, Misch CE, Brenner K. *Implants and restorative dentistry.* 1<sup>a</sup> ed. Nueva York: Martin Dunitz; 2001.
  54. Misch CE, Misch CM. Generic terminology for endosseous implant prosthodontics. *J Prosthet Dent.* 1992;68(5):809–12.
  55. Finger, I. Castellon, P. Block, M. Elian N. The evolution of external and internal implant/abutment connections. *Pr Proced Aesthet Dent.* 2003;15(8):625–32.
  56. Binon PP. Implants and components: entering the new millennium. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000;15(1):76–94.
  57. Fonte A. *Manual de prótesis sobre implantes.* 1<sup>a</sup> ed. Brasil: Artes médicas; 2007.
  58. Yukna RA. Optimizing clinical success with implants: maintenance and care. *Compend Suppl.* 1993;(15):S554-61-6.
  59. Hämmerle CH, Brägger U, Bürgin W, Lang NP. The effect of subcrestal placement of the polished surface of ITI implants on marginal soft and hard tissues. *Clin Oral Implants Res.* 1996;7(2):111–9.
  60. Roberts WE, Smith RK, Zilberman Y, Mozsary PG, Smith RS. Osseous adaptation to continuous loading of rigid endosseous implants. *Am J Orthod.* 1984;86(2):95–111.

61. Tengvall P, Lundstrom I. Physico-chemical considerations of titanium as a biomaterial. *Clin Mater*. 1992;9(2):115–34.
62. Abarrategui A. Estudio del quitosano como biomaterial portador de rhBMP2: desarrollo, caracterización y aplicabilidad en regeneración de tejido óseo [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2008.
63. Nishio K, Neo M, Akiyama H, Nishiguchi S, Kim HM, Kokubo T, et al. The effect of alkali- and heat-treated titanium and apatite-formed titanium on osteoblastic differentiation of bone marrow cells. *J Biomed Mater Res*. 2000;52(4):652–61.
64. Pypen CM, Plenck H, Ebel MF, Svagera R, Wernisch J. Characterization of microblasted and reactive ion etched surfaces on the commercially pure metals niobium, tantalum and titanium. *J Mater Sci Mater Med*. 1997;8(12):781–4.
65. Wennerberg A, Albrektsson T, Lausmaa J. Torque and histomorphometric evaluation of c.p. titanium screws blasted with 25- and 75-microns-sized particles of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *J Biomed Mater Res*. 1996;30(2):251–60.
66. Wennerberg A, Albrektsson T, Johansson C, Andersson B. Experimental study of turned and grit-blasted screw-shaped implants with special emphasis on effects of blasting material and surface topography. *Biomaterials*. 1996;17(1):15–22.
67. Taborelli M, Jobin M, François P, Vaudaux P, Tonetti M, Szmukler-Moncler S, et al. Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium. Surface characterization. *Clin Implant Dent Relat Res*. 1997;8(3):208–16.
68. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res*. 1991;25(7):889–902.
69. Buser D, Nydegger T, Oxland T, Cochran DL, Schenk RK, Hirt HP, et al. Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: A biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. *J Biomed Mater Res*. 1999;45(2):75–83.
70. Keller JC, Stanford CM, Wightman JP, Draughn RA, Zaharias R. Characterizations of titanium implant surfaces. *J Biomed Mater Res*. 1994;28(8):939–46.
71. Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B. An animal study of c.p. titanium screws with different surface topographies. *J Mater Sci*. 1995;6(5):302–9.
72. Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J, et al. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res*. 1995;29(3):389–401.
73. Wong M, Eulenberger J, Schenk R, Hunziker E. Effect of surface topology on the osseointegration of implant materials in trabecular bone. *J Biomed Mater Res*.

- 1995;29(12):1567–75.
74. Lohmann CH, Sagun R, Sylvia VL, Cochran DL, Dean DD, Boyan BD, et al. Surface roughness modulates the response of MG63 osteoblast-like cells to 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> through regulation of phospholipase A<sub>2</sub> activity and activation of protein kinase A. *J Biomed Mater Res*. 1999;47(2):139–51.
  75. Schwartz Z, Lohmann CH, Sisk M, Cochran DL, Sylvia VL, Simpson J, et al. Local factor production by MG63 osteoblast-like cells in response to surface roughness and 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> is mediated via protein kinase C- and protein kinase A-dependent pathways. *Biomaterials*. 2001;22(7):731–41.
  76. Buser D, Nydegger T, Hirt HP, Cochran DL, Nolte LP. Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1988;13(5):611–9.
  77. Cochran DL, Schenk RK, Lussi A, Higginbottom FL, Buser D. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: A histometric study in the canine mandible. *J Biomed Mater Res*. 1998;40(1):1–11.
  78. Abrahamsson I, Berglundh T, Linder E, Lang NP, Lindhe J. Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15(4):381–92.
  79. Galli C, Guizzardi S, Passeri G, Martini D, Tinti A, Mauro G, et al. Comparison of human mandibular osteoblasts grown on two commercially available titanium implant surfaces. *J Periodontol*. 2005;76(3):364–72.
  80. Hayakawa T, Kiba H, Yasuda S, Yamamoto H, Nemoto K. A histologic and histomorphometric evaluation of two types of retrieved human titanium implants. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2002;22(2):164–71.
  81. Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A*. 2005;74(1):49–58.
  82. Mendes VC, Moineddin R, Davies JE. The effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. *Biomaterials*. 2007;28(32):4748–55.
  83. Alghamdi HS, Bosco R, Both SK, Iafisco M, Leeuwenburgh SCG, Jansen JA, et al. Synergistic effects of bisphosphonate and calcium phosphate nanoparticles on peri-implant bone responses in osteoporotic rats. *Biomaterials*. 2014;35(21):5482–90.
  84. Schliephake H, Scharnweber D, Roessler S, Dard M, Sewing A, Aref A. Biomimetic calcium phosphate composite coating of dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2006;21(5):738–46.
  85. Habibovic P, Li J, van der Valk CM, Meijer G, Layrolle P, van Blitterswijk CA, et al.

- Biological performance of uncoated and octacalcium phosphate-coated Ti6Al4V. *Biomaterials*. 2005;26(1):23–36.
86. Subramani K, Ahmed W. *Emerging Nanotechnologies in Dentistry: Materials, Processes, and Applications*. 1<sup>o</sup> ed. Waltham: Elsevier/William Andrew; 2012.
87. Le Guehennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater*. 2007;23(7):844–54.
88. Guardia J. Estudio histomorfométrico sobre el comportamiento de la melatonina en los procesos de oseointegración implantológica. [Tesis doctoral]. Granada: Universidad de Granada; 2008.
89. Vaněček J. Melatonin binding sites. *J Neurochem*. 1988;51(5):1436–40.
90. Cajochen C, Kräuchi K, Wirz-Justice A. Role of melatonin in the regulation of human circadian rhythms and sleep. *J Neuroendocrinol*. 2003;15(4):432–7.
91. Hirose T, Smith RJ, Jetten AM. ROR gamma: the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;205(3):1976–83.
92. Arana C. Melatonina, estrés oxidativo y oseointegración en la cavidad oral. [Tesis doctoral]. Granada: Universidad de Granada; 2006.
93. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Carazo A, Leon J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr Top Med Chem*. 2002;2(2):133–51.
94. Acuña-Castroviejo D, Pablos MI, Menendez-Pelaez A, Reiter RJ. Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1993;82(2):253–6.
95. Reiter RJ, Tan D-X, Manchester LC, Lopez-Burillo S, Sainz RM, Mayo JC. Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. *Adv Exp Med Biol*. 2003;527:539–48.
96. Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: Biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol*. 2003;50(4):1129–46.
97. Antolin I, Rodriguez C, Sainz RM, Mayo JC, Uria H, Kotler ML, et al. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J*. 1996;10(8):882–90.
98. Nakade O, Koyama H, Ariji H, Yajima A, Kaku T. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro. *J Pineal Res*. 1999;27(2):106–10.
99. Roth J, Kim BG, Lin WL, Cho MI. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem*. 1999;274(31):22041–7.

100. Koyama H, Nakade O, Takada Y, Kaku T, Lau KHW. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res.* 2002;17(7):1219–29.
101. Tresguerres IF, Clemente C, Blanco L, Khraisat A, Tamimi F, Tresguerres J. Effects of Local Melatonin Application on Implant Osseointegration. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2012;14(3):395–9.
102. Fernández M. Regulación por glucocorticoides y vitamina D de la proliferación y la diferenciación de condrocitos de cartílago epifiseal fetal humano. [Tesis doctoral]. Barcelona: Universidad de Barcelona; 2006.
103. Kasemo B. Biocompatibility of titanium implants: surface science aspects. *J Prosthet Dent.* 1983;49(6):832–7.
104. Kohal RJ, Klaus G. A zirconia implant-crown system: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2004;24(2):147–53.
105. Thomsen P, Larsson C, Ericson LE, Sennerby L, Lausma J, Kasemo B. Structure of the interface between rabbit cortical bone and implants of gold, zirconium and titanium. *J Mater Sci.* 1997;8(11):653–65.
106. Ratner BD. A perspective on titanium biocompatibility. In: Brunette DM, Tengvall P, Textor M TP, editor. *Titanium in Medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications.* Berlin: Springer Verlag; 2001. p. 2–12.
107. Li L, Kim S, Cho S. Comparison of alkaline phosphatase activity of MC3T3-E1 cells cultured on different Ti surfaces: modified sandblasted with large grit and acid-etched (MSLA), laser-treated, and laser and acid-treated Ti surfaces. *J Adv Prosthodont.* 2016;8(3):235–40.
108. Olivares-Navarrete R, Hyzy SL, Gittens I, Schneider JM, Haithcock D, Ullrich P et al. Rough titanium alloys regulate osteoblast production of angiogenic factors. *Spine J.* 2013;13(11):1563–70.
109. Fleischmann L, Crismani A, Falkensammer F, Bantleon HP, Rausch-Fan X, Andrukhov O. Behavior of osteoblasts on Ti surface with two different coating designed for orthodontic devices. *J Mater Sci Mater Med.* 2015;26(1):5335–9.
110. Marinucci L, Balloni S, Becchetti E, Belcastro S, Guerra M, Calvitti M, et al. Effect of titanium surface roughness on human osteoblast proliferation and gene expression in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2006;21(5):719–25.
111. Ostman P, Wennerberg A, Ekestubbe A, Albrektsson T. Immediate occlusal loading of NanoTite tapered implants: a prospective 1-year clinical and radiographic study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2013;15(6):809–18.
112. Lin A, Wang CJ, Kelly J, Gubbi P, Nishimura I. The role of titanium implant surface modification with hydroxyapatite nanoparticles in progressive early bone-implant

- fixation in vivo. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009;24(5):808–16.
113. Chen F, Lam WM, Lin CJ, Qiu GX, Wu ZH, Luk KDK, et al. Biocompatibility of electrophoretical deposition of nanostructured hydroxyapatite coating on roughen titanium surface: in vitro evaluation using mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;82(1):183–91.
  114. da Silva JSP, Amico SC, Rodrigues AON, Barboza CAG, Alves CJ, Croci AT. Osteoblastlike cell adhesion on titanium surfaces modified by plasma nitriding. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2011;26(2):237–44.
  115. Brentel AS, de Vasconcellos LM, Oliveira MV, Graça ML, de Vasconcellos LG, Cairo CA, Carvalho YR . Histomorphometric analysis of pure titanium Implants with porous surface versus rough. *J Appl Oral Sci*. 2006;14(3):213–8.
  116. Kim M-J, Kim C-W, Lim Y-J, Heo S-J. Microrough titanium surface affects biologic response in MG63 osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res A*. 2006;79(4):1023–32.
  117. Gittens RA, McLachlan T, Olivares-Navarrete R, Cai Y, Berner S, Tannenbaum R, et al. The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. *Biomaterials*. 2011;32(13):3395–403.
  118. Gil FJ, Manzanares N, Badet A, Aparicio C, Ginebra MP. Biomimetic treatment on dental implants for short-term bone regeneration. *Clin Oral Investig*. 2014;18(1):59–66.
  119. Aparicio C, Manero JM, Conde F, Pegueroles M, Planell JA, Vallet-Regi M, et al. Acceleration of apatite nucleation on microrough bioactive titanium for bone-replacing implants. *J Biomed Mater Res*. 2007;82(3):521–9.
  120. Lotz EM, Olivares-Navarrete R, Berner S, Boyan BD, Schwartz Z. Osteogenic response of human MSCs and osteoblasts to hydrophilic and hydrophobic nanostructured titanium implant surfaces. *J Biomed Mater Res A*. 2016;104(12):3137–48.
  121. Sohn SH, Jun HK, Kim CS, Kim KN, Chung SM, Shin SW, et al. Biological responses in osteoblast-like cell line according to thin layer hydroxyapatite coatings on anodized titanium. *J Oral Rehabil*. 2006;33(12):898–911.
  122. Esfahanizadeh N, Motalebi S, Daneshparvar N, Akhoundi N, Bonakdar S. Morphology, proliferation, and gene expression of gingival fibroblasts on Laser-Lok, titanium, and zirconia surfaces. *Lasers Med Sci*. 2016;31(5):863–73.
  123. Meng W, Zhou Y, Zhang Y, Cai Q, Yang L, Wang B . Effects of hierarchical micro/nano-textured titanium surface features on osteoblast- specific gene expression. *Implant Dent*. 2013;22(6):656–61.
  124. Schneider GB, Perinpanayagam H, Clegg M, Zaharias R, Seabold D, Keller J, et al. Implant surface roughness affects osteoblast gene expression. *J Dent Res*.

- 2003;82(5):372–6.
125. Du C, Schneider GB, Zaharias R, Abbott C, Seabold D, Stanford C. Apatite / Amelogenin Coating. *J Dent Res*. 2005;84(11):1070–4.
  126. Balloni S, Calvi EM, Damiani F, Bistoni G, Calvitti M, Locci P, et al. Effects of titanium surface roughness on mesenchymal stem cell commitment and differentiation signaling. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009;24(4):627–35.
  127. Cho SA, Park KT. The removal torque of titanium screw inserted in rabbit tibia treated by dual acid etching. *Biomaterials*. 2003;24(20):3611–7.
  128. Sugawara A, Fujikawa K, Takagi S, Chow LC, Nishiyama M, Murai S. Histopathological and cell enzyme studies of calcium phosphate cements. *Dent Mater J*. 2004 Dec;23(4):613–20.
  129. Lee JJ, Rouhfar L, Beirne OR. Survival of hydroxyapatite-coated implants: A meta-analytic review. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000;58(12):1372–9.
  130. van Oirschot B, Bronkhorst EM, van den Beucken J, Meijer GJ, Jansen JA, Junker R. A systematic review on the long-term success of calcium phosphate plasma-spray-coated dental implants. *Odontology*. 2016;104(3):347–56.
  131. Whitehouse D. *Handbook of surface metrology*. 1<sup>o</sup> ed. Bristol-Pennsylvania: CRC Press; 1994.
  132. Vörös J, Wieland M, Ruiz-Taylor L, Textor M, Brunette DM . Characterization of Titanium Surfaces. In: Brunette DM, Tengvall P, Textor M TP, editor. *Titanium in Medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications*. Berlín: Springer Verlag; 2001. p. 87–144.
  133. Mustafa K, Wennerberg A, Wroblewski J, Hultenby K, Lopez BS, Arvidson K. Determining optimal surface roughness of TiO(2) blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clin Oral Implants Res*. 2001;12(5):515–25.
  134. Kim HJ, Kim SH, Kim MS, Lee EJ, Oh HG, Oh WM, et al. Varying Ti-6Al-4V surface roughness induces different early morphologic and molecular responses in MG63 osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res*. 2005;74(3):366–73.
  135. Park JY, Gemmell CH, Davies JE. Platelet interactions with titanium: Modulation of platelet activity by surface topography. *Biomaterials*. 2001;22(19):2671–82.
  136. Kim C-S, Sohn S-H, Jeon S-K, Kim K-N, Ryu J-J, Kim M-K. Effect of various implant coatings on biological responses in MG63 using cDNA microarray. *J Oral Rehabil*. 2006;33(5):368–79.
  137. Gardin C, Ferroni L, Bressan E, Calvo-Guirado JL, Degidi M, Piattelli A, et al. Adult stem cells properties in terms of commitment, aging and biological safety of grit-blasted and Acid-etched ti dental implants surfaces. *Int J Mol Cell Med*. 2014;3(4):225–36.

138. Yang X, Liu C, Lei X, Su Y, Li W, Wang H, et al. Influence of surface modification of titanium on OPG/RANKL mRNA expression in MG-63 human osteoblast-like cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2011;31(8):1353–6.
139. Pae A, Kim S-S, Kim H-S, Woo Y-H. Osteoblast-like cell attachment and proliferation on turned, blasted, and anodized titanium surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2011;26(3):475–81.
140. Olivares-Navarrete R, Gittens RA, Schneider JM, Hyzy SL, Haithcock DA, Ullrich PF, et al. Osteoblasts exhibit a more differentiated phenotype and increased bone morphogenetic protein production on titanium alloy substrates than on poly-ether-ether-ketone. *Spine J*. 2012;12(3):265–72.
141. Boyan BD, Schwartz Z, Bonewald LF, Swain LD. Localization of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-responsive alkaline phosphatase in osteoblast-like cells (ROS 17/2.8, MG 63, and MC 3T3) and growth cartilage cells in culture. *J Biol Chem*. 1989;264(20):11879–86.
142. Franceschi RT, James WM, Zerlauth G. 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> specific regulation of growth, morphology, and fibronectin in a human osteosarcoma cell line. *J Cell Physiol*. 1985;123(3):401–9.
143. Zhang L, Su P, Xu C, Chen C, Liang A, Du K, et al. Melatonin inhibits adipogenesis and enhances osteogenesis of human mesenchymal stem cells by suppressing PPAR $\gamma$  expression and enhancing Runx2 expression. *J Pineal Res*. 2010;49(4):364–72.
144. Satomura K, Tobiume S, Tokuyama R, Yamasaki Y, Kudoh K, Maeda E, et al. Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo. *J Pineal Res*. 2007;42(3):231–9.
145. Yamano S, Ma AK-Y, Shanti RM, 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(6):1247–55.
146. Cardinali DP, Ladizesky MG, Boggio V, Cutrera R a, Mautalen C. Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. *J Pineal Res*. 2003;34(2):81–7.
147. Juknat AA, Del Valle Armanino Méndez M, Quaglino A, Fameli CI, Mena M, Kotler ML. Melatonin prevents hydrogen peroxide-induced Bax expression in cultured rat astrocytes. *J Pineal Res*. 2005;38(2):84–92.
148. Radio NM, Doctor JS, Witt-Enderby P. Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT<sub>2</sub> melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade. *J Pineal Res*. 2006;40(4):332–42.
149. Suzuki N, Somei M, Seki A, Reiter RJ, Hattori A. Novel bromomelatonin derivatives



- as potentially effective drugs to treat bone diseases. *J Pineal Res.* 2008;45(3):229–34.
150. Satué M, Ramis JM, del Mar Arriero M, Monjo M . A New Role for 5-methoxytryptophol on Bone Cells Function in Vitro. *J Cell Biochem.* 2015;116(4):551–8.
  151. Panzer A, Lottering ML, Bianchi P, Glencross DK, Stark JH, Seegers JC. Melatonin has no effect on the growth, morphology or cell cycle of human breast cancer (MCF-7), cervical cancer (HeLa), osteosarcoma (MG- 63) or lymphoblastoid (TK6) cells. *Cancer Lett.* 1998;122(1–2):17–23.
  152. Liu X, Chu P, Ding C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Mater Sci Eng R.* 2004;47:49–121.
  153. Pérez C. Acción de la melatonina sobre las células madre humanas en la diferenciación osteoblástica. Estudio experimental in vitro [Tesis doctoral]. Murcia: Universidad de Murcia; 2012.
  154. Sethi S, Radio NM, Kotlarczyk MP, Chen CT, Wei YH, Jockers R, et al. Determination of the minimal melatonin exposure required to induce osteoblast differentiation from human mesenchymal stem cells and these effects on downstream signaling pathways. *J Pineal Res.* 2010;49(3):222–38.
  155. Park KH, Kang JW, Lee EM, Kim JS, Rhee YH, Kim M, et al. Melatonin promotes osteoblastic differentiation through the BMP/ERK/Wnt signaling pathways. *J Pineal Res.* 2011;51(2):187–94.
  156. Matsumura H, Ogata Y. Melatonin regulates human bone sialoprotein gene transcription. *J Oral Sci.* 2014;56(1):67–76.
  157. Hauschka P V, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev.* 1989;69(3):990–1047.
  158. Barros NM, Hoac B, Neves RL, Addison WN, Assis DM, Murshed M, et al. Proteolytic processing of osteopontin by PHEX and accumulation of osteopontin fragments in Hyp mouse bone, the murine model of X-linked hypophosphatemia. *J Bone Miner Res.* 2013;28(3):688–99.
  159. Shih NR, Jo OD, Yanagawa N. Effects of PHEX antisense in human osteoblast cells. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(2):394–9.
  160. Orimo H, Shimada T. Effects of phosphates on the expression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene and phosphate-regulating genes in short-term cultures of human osteosarcoma cell lines. *Mol Cell Biochem.* 2006;282(1–2):101–8.
  161. Bang SM, Moon HJ, Kwon YD, Yoo JY, Pae A, Kwon IK. Osteoblastic and osteoclastic differentiation on SLA and hydrophilic modified SLA titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(7):831–7.

162. Son JH, Cho YC, Sung IY, Kim IR, Park BS, Kim YD. Melatonin promotes osteoblast differentiation and mineralization of MC3T3-E1 cells under hypoxic conditions through activation of PKD/p38 pathways. *J Pineal Res.* 2014;57(4):385–92.
163. Sabokbar A, Millett PJ, Myer B, Rushton N. A rapid, quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro. *Bone Miner.* 1994 Oct;27(1):57–67.
164. Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Brzezinski A, Bhatnagar KP, Cardinali DP. Melatonin, Immune Function and Cancer. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov.* 2011;5(2):109–23.
165. Liu L, Xu Y, Reiter RJ. Melatonin inhibits the proliferation of human osteosarcoma cell line MG-63. *Bone.* 2013;55(2):432–8.
166. Liu L, Zhu Y, Xu Y, Reiter RJ. Melatonin delays cell proliferation by inducing G1 and G 2/M phase arrest in a human osteoblastic cell line hFOB 1.19. *J Pineal Res.* 2011;50(2):222–31.
167. Zaminy A, Kashani I, Barbarestani M, Hedayatpour A, Mahmoudi R, Vardasbi S, et al. Effects of melatonin on the proliferation and differentiation of rat adipose-derived stem cells. *Indian J Plast Surg.* 2008;41(1):8–14.

## **9. ANEXOS**

---



Nº Disco	Medición	Ra ( $\mu\text{m}$ )
1	1	0,181
1	2	0,162
1	3	0,171
2	1	0,153
2	2	0,063
2	3	0,071
3	1	0,161
3	2	0,071
3	3	0,088
4	1	0,146
4	2	0,107
4	3	0,102
5	1	0,114
5	2	0,142
5	3	0,114
6	1	0,077
6	2	0,056
6	3	0,055
7	1	0,137
7	2	0,135
7	3	0,125
8	1	0,205
8	2	0,225
8	3	0,148
9	1	0,178
9	2	0,16
9	3	0,223
10	1	0,155
10	2	0,12
10	3	0,09
11	1	0,079
11	2	0,08
11	3	0,071
12	1	0,138
12	2	0,097
12	3	0,078
13	1	0,123
13	2	0,179
13	3	0,142
14	1	0,068
14	2	0,065
14	3	0,076
15	1	0,118
15	2	0,141
15	3	0,171
16	1	0,116
16	2	0,1
16	3	0,095
17	1	0,126
17	2	0,085
17	3	0,093
18	1	0,088
18	2	0,103
18	3	0,091
19	1	0,093
19	2	0,084
19	3	0,215
20	1	0,115
20	2	0,115
20	3	0,148
21	1	0,11
21	2	0,105
21	3	0,101
22	1	0,113
22	2	0,121
22	3	0,118
23	1	0,105
23	2	0,106
23	3	0,076
24	1	0,093
24	2	0,098
24	3	0,095
25	1	0,149
25	2	0,06
25	3	0,06
26	1	0,091
26	2	0,138
26	3	0,094
27	1	0,146
27	2	0,088
27	3	0,079
28	1	0,159
28	2	0,123
28	3	0,122
29	1	0,133
29	2	0,191
29	3	0,178
30	1	0,122
30	2	0,121
30	3	0,073
31	1	0,248
31	2	0,219
31	3	0,207
32	1	0,454
32	2	0,314
32	3	0,31
33	1	0,163
33	2	0,105
33	3	0,095
34	1	0,122
34	2	0,106
34	3	0,159
35	1	0,14
35	2	0,217
35	3	0,251
36	1	0,07
36	2	0,147
36	3	0,086
37	1	0,125
37	2	0,1
37	3	0,091
38	1	0,189
38	2	0,189
38	3	0,182
39	1	0,148
39	2	0,14
39	3	0,193
40	1	0,132
40	2	0,1
40	3	0,151

Tabla 1: Medidas de rugosidad media (Ra) de los discos del grupo M.

Nº Disco	Medición	Ra ( $\mu\text{m}$ )			
			21	1	0,205
			21	2	0,229
			21	3	0,232
			22	1	0,274
			22	2	0,248
			22	3	0,323
			23	1	0,23
			23	2	0,228
			23	3	0,231
			24	1	0,254
			24	2	0,258
			24	3	0,263
			25	1	0,233
			25	2	0,243
			25	3	0,235
			26	1	0,32
			26	2	0,32
			26	3	0,294
			27	1	0,244
			27	2	0,239
			27	3	0,268
			28	1	0,241
			28	2	0,243
			28	3	0,249
			29	1	0,212
			29	2	0,234
			29	3	0,224
			30	1	0,315
			30	2	0,315
			30	3	0,318
			31	1	0,294
			31	2	0,359
			31	3	0,394
			32	1	0,297
			32	2	0,291
			32	3	0,308
			33	1	0,219
			33	2	0,221
			33	3	0,232
			34	1	0,214
			34	2	0,222
			34	3	0,239
			35	1	0,254
			35	2	0,243
			35	3	0,234
			36	1	0,226
			36	2	0,228
			36	3	0,264
			37	1	0,247
			37	2	0,262
			37	3	0,237
			38	1	0,403
			38	2	0,286
			38	3	0,255
			39	1	0,241
			39	2	0,26
			39	3	0,267
			40	1	0,274
			40	2	0,333
			40	3	0,266

Tabla 2: Medidas de rugosidad media (Ra) de los discos del grupo G.

Nº Disco	Medición	Ra (μm)			
1	2	0,662	21	1	0,345
1	1	0,41	21	2	0,323
1	3	0,481	21	3	0,318
2	1	0,654	22	1	0,534
2	2	0,531	22	2	0,33
2	3	0,446	22	3	0,451
3	1	0,315	23	1	0,292
3	2	0,296	23	2	0,293
3	3	0,27	23	3	0,338
4	1	0,316	24	1	0,25
4	2	0,275	24	2	0,255
4	3	0,337	24	3	0,281
5	1	0,368	25	1	0,226
5	2	0,318	25	2	0,23
5	3	0,332	25	3	0,219
6	1	0,357	26	1	0,351
6	2	0,339	26	2	0,332
6	3	0,297	26	3	0,332
7	1	0,56	27	1	0,306
7	2	0,481	27	2	0,323
7	3	0,495	27	3	0,299
8	1	0,28	28	1	0,318
8	2	0,29	28	2	0,299
8	3	0,26	28	3	0,368
9	1	0,435	29	1	0,281
9	2	0,549	29	2	0,281
9	3	0,396	29	3	0,289
10	1	0,527	30	1	0,297
10	2	0,477	30	2	0,305
10	3	0,474	30	3	0,519
11	1	0,298	31	1	0,263
11	2	0,246	31	2	0,264
11	3	0,315	31	3	0,238
12	1	0,767	32	1	0,294
12	2	0,623	32	2	0,323
12	3	0,364	32	3	0,434
13	1	0,3	33	1	0,31
13	2	0,383	33	2	0,325
13	3	0,295	33	3	0,346
14	1	0,347	34	1	0,319
14	2	0,257	34	2	0,281
14	3	0,364	34	3	0,258
15	1	0,34	35	1	0,309
15	2	0,263	35	2	0,315
15	3	0,272	35	3	0,301
16	1	1,461	36	1	0,321
16	2	0,254	36	2	0,294
16	3	0,258	36	3	0,297
17	1	0,317	37	1	0,402
17	2	0,325	37	2	0,391
17	3	0,293	37	3	0,387
18	1	0,474	38	1	0,381
18	2	0,467	38	2	0,373
18	3	0,466	38	3	0,321
19	1	0,439	39	1	0,369
19	2	0,524	39	2	0,296
19	3	0,383	39	3	0,273
20	1	0,412	40	1	0,307
20	2	0,411	40	2	0,264
20	3	0,473	40	3	0,281

Tabla 3: Medidas de rugosidad media (Ra) de los discos del grupo GF.

	Total células en disco	SD	Superficie neta útil (mm2)	Densidad neta células (células/mm2)	SD
<b>24 h</b>					
M1	3356,00		30,45	110,21	
M2	1126,00		27,92	40,33	
M3	1490,00		28,82	51,70	
M4	2255,00		26,63	84,68	
M5	3727,00		27,59	135,09	
<b>Media M, 24 h (+- SD)</b>	<b>2390,80</b>	<b>1134,31</b>	<b>28,28</b>	<b>84,40</b>	<b>39,52</b>
GF1	1652,00		28,48	58,01	
GF2	1226,00		27,40	44,74	
GF3	853,00		28,45	29,99	
GF4	2167,00		30,07	72,07	
GF5	1771,00		28,23	62,74	
<b>Media GF, 24 h (+- SD)</b>	<b>1533,80</b>	<b>507,30</b>	<b>28,52</b>	<b>53,51</b>	<b>16,43</b>
G1	2454,00		29,20	84,05	
G2	3385,00		30,72	110,19	
G3	3749,00		28,42	131,92	
G4	2422,00		28,69	84,42	
G5	1035,00		28,90	35,81	
<b>Media G, 24 h (+- SD)</b>	<b>2609,00</b>	<b>1053,36</b>	<b>29,19</b>	<b>89,23</b>	<b>35,93</b>
<b>72 h</b>					
M11	9918,00		31,04	319,48	
M12	8028,00		28,02	286,48	
M13	11165,00		28,09	397,42	
M14	9872,00		27,65	357,02	
M15	12907,00		29,23	441,57	
<b>Media M, 72 h (+- SD)</b>	<b>10378,00</b>	<b>1803,15</b>	<b>28,81</b>	<b>360,39</b>	<b>61,46</b>
GF11	7630,00		29,47	258,90	
GF12	6211,00		28,23	219,99	
GF13	4869,00		29,96	162,53	
GF14	2336,00		27,59	84,67	
GF15	2250,00		28,05	80,23	
<b>Media GF, 72 h (+- SD)</b>	<b>4659,20</b>	<b>2370,61</b>	<b>28,66</b>	<b>161,25</b>	<b>79,71</b>
G11	10667,00		30,03	355,24	
G12	17802,00		28,46	625,44	
G13	4552,00		29,71	153,20	
G14	8162,00		29,39	277,72	
G15	3571,00		30,31	117,80	
<b>Media G, 72 h (+- SD)</b>	<b>8950,80</b>	<b>5705,33</b>	<b>29,58</b>	<b>305,83</b>	<b>202,51</b>
<b>24 h + melatonina</b>					
M6	2510,00		27,96	89,78	
M7	3717,00		27,60	134,69	
M8	4054,00		30,12	134,60	
M9	4398,00		25,94	169,55	
M10	3164,00		26,60	118,93	
<b>Media M, 24 h +melatonin</b>	<b>3568,60</b>	<b>746,64</b>	<b>27,64</b>	<b>129,51</b>	<b>28,92</b>
GF6	1287,00		30,08	42,78	
GF7	3135,00		29,41	106,61	
GF8	2014,00		31,26	64,43	
GF9	1609,00		26,85	59,93	
GF10	5474,00		28,55	191,73	
<b>Media GF, 24 h +melatonin</b>	<b>2703,80</b>	<b>1698,65</b>	<b>29,23</b>	<b>93,10</b>	<b>59,92</b>
G6	3504,00		27,55	127,18	
G7	3980,00		28,43	139,99	
G8	2130,00		28,27	75,35	
G9	4980,00		29,02	171,62	
G10	3213,00		28,34	113,38	
<b>Media G, 24 h +melatonina(+ SD)</b>	<b>3561,40</b>	<b>1044,18</b>	<b>28,32</b>	<b>125,50</b>	<b>35,36</b>
<b>72 h + melatonina</b>					
M16	19226,00		27,79	691,76	
M17	16964,00		27,50	616,90	
M18	13599,00		27,72	490,67	
M19	16571,00		26,80	618,32	
M20	17413,00		27,19	640,35	
<b>Media M, 72 h +melatonin</b>	<b>16754,60</b>	<b>2035,72</b>	<b>27,40</b>	<b>611,60</b>	<b>74,07</b>
GF16	1599,00		30,52	52,40	
GF17	2107,00		29,63	71,11	
GF18	6173,00		28,74	214,80	
GF19	2739,00		30,77	89,03	
GF20	3334,00		28,07	118,78	
<b>Media GF, 72 h +melatonin</b>	<b>3190,40</b>	<b>1790,71</b>	<b>29,54</b>	<b>109,22</b>	<b>63,89</b>
G16	13476,00		27,88	483,37	
G17	15786,00		28,97	544,98	
G18	6513,00		28,88	225,49	
G19	13475,00		28,68	469,89	
G20	14353,00		28,81	498,13	
<b>Media G, 72 h +melatonina(+ SD)</b>	<b>12720,60</b>	<b>3596,37</b>	<b>28,64</b>	<b>444,37</b>	<b>125,59</b>

Tabla 4-7: Datos recogidos para el estudio de adhesión y proliferación celular.



Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1
Column B	24 h GF	Column C	24h G	Column C	24h G
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column A	24 h M	Column A	24 h M	Column B	24 h GF
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	0,3095	P value	0,8016	P value	0,0952
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns	P value summary	ns	P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	33,00 , 22,00	Sum of ranks in column A,C	29,00 , 26,00	Sum of ranks in column B,C	19,00 , 36,00
Mann-Whitney U	7	Mann-Whitney U	11	Mann-Whitney U	4
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column A	84,68	Median of column A	84,68	Median of column B	58,01
Median of column B	58,01	Median of column C	84,42	Median of column C	84,42
Difference: Actual	-26,67	Difference: Actual	-0,26	Difference: Actual	26,41
Difference: Hodges-Lehmann	-26,67	Difference: Hodges-Lehmann	-0,26	Difference: Hodges-Lehmann	39,31

Tabla 8: Test de Mann-Whitney para densidad celular: comparación entre pares de grupos tras 24 horas de cultivo sin melatonina.

Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1
Column E	72 h GF	Column F	72 h G	Column F	72 h G
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column D	72 h M	Column D	72 h M	Column E	72 h GF
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	0,0079	P value	0,3095	P value	0,2222
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**	P value summary	ns	P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column D,E	40,00 , 15,00	Sum of ranks in column D,F	33,00 , 22,00	Sum of ranks in column E,F	21,00 , 34,00
Mann-Whitney U	0	Mann-Whitney U	7	Mann-Whitney U	6
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column D	378,6	Median of column D	378,6	Median of column E	162,5
Median of column E	162,5	Median of column F	277,7	Median of column F	277,7
Difference: Actual	-216	Difference: Actual	-100,8	Difference: Actual	115,2
Difference: Hodges-Lehmann	-206,3	Difference: Hodges-Lehmann	-100,8	Difference: Hodges-Lehmann	96,34

Tabla 9: Test de Mann-Whitney para densidad celular: comparación entre pares de grupos tras 72 horas de cultivo sin melatonina.

Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1
Column H	24 h melatonina GF	Column I	24 h melatonina G	Column I	24 h melatonina G
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column G	24 h melatonina M	Column G	24 h melatonina M	Column H	24 h melatonina GF
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	0,2222	P value	0,9444	P value	0,2222
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns	P value summary	ns	P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column G,H	34,00 , 21,00	Sum of ranks in column G,I	28,00 , 27,00	Sum of ranks in column H,I	21,00 , 34,00
Mann-Whitney U	6	Mann-Whitney U	12	Mann-Whitney U	6
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column G	134,6	Median of column G	134,6	Median of column H	64,43
Median of column H	64,43	Median of column I	127,2	Median of column I	127,2
Difference: Actual	-70,17	Difference: Actual	-7,42	Difference: Actual	62,75
Difference: Hodges-Lehmann	-54,5	Difference: Hodges-Lehmann	-5,55	Difference: Hodges-Lehmann	48,95

Tabla 10: Test de Mann-Whitney para densidad celular: comparación entre pares de grupos tras 24 horas de cultivo con melatonina.

Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1
Column K	72 h melatonina GF	Column L	72 h melatonina G	Column L	72 h melatonina G
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column J	72 h melatonina M	Column J	72 h melatonina M	Column K	72 h melatonina GF
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	0,0079	P value	0,0317	P value	0,0079
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**	P value summary	*	P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column J,K	40,00 , 15,00	Sum of ranks in column J,L	38,00 , 17,00	Sum of ranks in column K,L	15,00 , 40,00
Mann-Whitney U	0	Mann-Whitney U	2	Mann-Whitney U	0
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column J	618,3	Median of column J	618,3	Median of column K	89,03
Median of column K	89,03	Median of column L	483,4	Median of column L	483,4
Difference: Actual	-529,3	Difference: Actual	-135	Difference: Actual	394,3
Difference: Hodges-Lehmann	-527,9	Difference: Hodges-Lehmann	-146,8	Difference: Hodges-Lehmann	380,9

Tabla 11: Test de Mann-Whitney para densidad celular: comparación entre pares de grupos tras 72 horas de cultivo con melatonina.

Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1
Column G	24 h melatonina M	Column H	24 h melatonina GF	Column I	24 h melatonina G
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column A	24 h M	Column B	24 h GF	Column C	24h G
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	0,1508	P value	0,3095	P value	0,2222
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns	P value summary	ns	P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,G	20,00 , 35,00	Sum of ranks in column B,H	22,00 , 33,00	Sum of ranks in column C,I	21,00 , 34,00
Mann-Whitney U	5	Mann-Whitney U	7	Mann-Whitney U	6
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column A	84,68	Median of column B	58,01	Median of column C	84,42
Median of column G	134,6	Median of column H	64,43	Median of column I	127,2
Difference: Actual	49,92	Difference: Actual	6,42	Difference: Actual	42,76
Difference: Hodges-Lehmann	49,45	Difference: Hodges-Lehmann	19,69	Difference: Hodges-Lehmann	39,54

Tabla 12: Test de Mann-Whitney para densidad celular: comparación de grupos sin melatonina con sus homólogos con melatonina, tras 24 horas de cultivo.

Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1
Column J	72 h melatonina M	Column K	72 h melatonina GF	Column L	72 h melatonina G
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column D	72 h M	Column E	72 h GF	Column F	72 h G
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	0,0079	P value	0,3095	P value	0,3095
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**	P value summary	ns	P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column D,J	15,00 , 40,00	Sum of ranks in column E,K	33,00 , 22,00	Sum of ranks in column F,L	22,00 , 33,00
Mann-Whitney U	0	Mann-Whitney U	7	Mann-Whitney U	7
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column D	378,6	Median of column E	162,5	Median of column F	277,7
Median of column J	618,3	Median of column K	89,03	Median of column L	483,4
Difference: Actual	239,8	Difference: Actual	-73,5	Difference: Actual	205,7
Difference: Hodges-Lehmann	242,9	Difference: Hodges-Lehmann	-43,75	Difference: Hodges-Lehmann	189,7

Tabla 13: Test de Mann-Whitney para densidad celular: comparación de grupos sin melatonina con sus homólogos con melatonina, tras 72 horas de cultivo.

Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1
Column D	72 h M	Column E	72 h GF	Column F	72 h G
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column A	24 h M	Column B	24 h GF	Column C	24 h G
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	0,0079	P value	0,0079	P value	0,0159
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**	P value summary	**	P value summary	*
Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,D	15,00 , 40,00	Sum of ranks in column B,E	15,00 , 40,00	Sum of ranks in column C,F	16,00 , 39,00
Mann-Whitney U	0	Mann-Whitney U	0	Mann-Whitney U	1
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column A	84,68	Median of column B	58,01	Median of column C	84,42
Median of column D	378,6	Median of column E	162,5	Median of column F	277,7
Difference: Actual	293,9	Difference: Actual	104,5	Difference: Actual	193,3
Difference: Hodges-Lehmann	279,2	Difference: Hodges-Lehmann	104,5	Difference: Hodges-Lehmann	193,3

Tabla 14: Test de Mann-Whitney para densidad celular: comparación de grupos en ausencia de melatonina tras 24 horas de cultivo con sus homólogos tras 72 horas de cultivo.

Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1
Column J	72 h melatonina M	Column K	72 h melatonina GF	Column L	72 h melatonina G
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column G	24 h melatonina M	Column H	24 h melatonina GF	Column I	24 h melatonina G
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	0,0079	P value	0,5317	P value	0,0079
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**	P value summary	ns	P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column G,J	15,00 , 40,00	Sum of ranks in column H,K	24,00 , 31,00	Sum of ranks in column I,L	15,00 , 40,00
Mann-Whitney U	0	Mann-Whitney U	9	Mann-Whitney U	0
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column G	134,6	Median of column H	64,43	Median of column I	127,2
Median of column J	618,3	Median of column K	89,03	Median of column L	483,4
Difference: Actual	483,7	Difference: Actual	24,6	Difference: Actual	356,2
Difference: Hodges-Lehmann	498	Difference: Hodges-Lehmann	12,17	Difference: Hodges-Lehmann	356,5

Tabla 15: Test de Mann-Whitney para densidad celular: comparación de grupos en presencia de melatonina tras 24 horas de cultivo con sus homólogos tras 72 horas de cultivo.

M 24h	ÁREA	REDONDEZ	101	4037,98	2,34	201	2765,29	2,79	301	1556,27	1,62	401	2662,56	2,98
1	2026,63	1,93	102	2771,23	2,16	202	1833,90	2,75	302	3403,76	2,26	402	2123,42	5,69
2	1210,72	1,67	103	2806,04	3,47	203	1376,28	2,17	303	1987,58	1,91	403	1137,70	4,35
3	1832,21	1,44	104	2658,31	1,91	204	2718,59	3,94	304	2678,69	3,35	404	2103,05	2,45
4	1107,14	2,38	105	1597,03	3,56	205	4374,20	2,13	305	1149,59	2,32	405	1335,52	3,55
5	5032,20	2,99	106	3751,01	3,41	206	4754,57	2,19	306	2015,60	3,86	406	3077,73	1,87
6	1783,81	2,07	107	2506,34	3,03	207	2795,85	4,37	307	3995,53	2,71	407	2140,40	3,72
7	2586,14	1,56	108	2727,08	2,74	208	2108,99	3,26	308	2243,14	2,21	408	1344,01	4,97
8	1664,10	2,38	109	3270,46	2,29	209	2532,66	2,97	309	1975,69	2,62	409	1630,14	3,12
9	2350,96	3,53	110	2755,10	2,27	210	3525,17	4,34	310	2299,17	2,22	410	2501,24	2,04
10	3148,20	2,78	111	2188,80	2,48	211	2294,08	7,17	311	2898,59	5,40	411	1956,16	3,11
11	2697,37	2,93	112	2513,13	2,67	212	3172,82	2,79	312	2454,54	2,77	412	3011,51	2,76
12	1620,80	2,12	113	2077,58	1,67	213	3008,11	3,07	313	3559,98	2,25	413	1475,61	3,14
13	3154,15	4,11	114	2737,27	2,93	214	2429,92	3,76	314	1737,96	5,47	414	1984,18	2,37
14	2556,43	2,52	115	2491,90	2,27	215	2088,61	3,92	315	1582,59	2,13	415	2324,64	2,29
15	2529,26	1,81	116	2834,06	1,98	216	2936,79	2,36	316	2094,56	4,12	416	2495,30	3,07
16	2043,61	2,34	117	2700,76	3,31	217	3093,02	3,57	317	1617,40	3,31	417	1288,83	3,63
17	1343,17	3,02	118	3911,48	2,74	218	4180,62	3,67	318	214,80	2,38	418	1685,32	2,35
18	1636,08	3,46	119	2739,82	2,70	219	2851,89	2,10	319	2491,90	2,80	419	2290,68	1,59
19	2316,15	2,09	120	2029,18	2,66	220	2002,86	2,61	320	1483,26	4,39	420	1623,34	2,52
20	1799,09	2,39	121	3234,80	4,01	221	5550,11	5,03	321	2782,27	2,33	421	1764,28	2,59
21	2198,99	2,19	122	2556,43	1,77	222	2238,89	3,63	322	3548,09	3,76	422	2903,68	3,42
22	2730,48	1,88	123	2226,16	5,55	223	2434,17	4,42	323	1945,98	4,61	423	2454,54	1,90
23	1847,49	3,08	124	2716,90	2,09	224	3017,45	2,47	324	3257,73	4,03	424	3055,66	2,66
24	3065,00	1,52	125	2267,76	3,41	225	1404,30	2,80	325	4346,18	4,82	425	1975,69	3,41
25	1849,19	3,28	126	2412,94	1,69	226	1887,39	2,54	326	2548,79	2,16	426	1906,92	4,59
26	3937,80	3,28	127	2250,78	5,65	227	2676,14	2,86	327	1757,49	2,27	427	1398,35	2,31
27	1650,51	3,61	128	2424,83	1,76	228	3971,76	2,27	328	2595,48	2,57	428	1535,05	3,23
28	1305,81	4,27	129	2280,49	2,02	229	2004,56	7,38	329	2746,61	1,89	429	2631,99	1,85
29	2842,55	2,83	130	1804,19	2,30	230	2140,40	3,81	330	2273,70	5,05	430	2260,12	3,47
30	3781,58	5,05	131	3566,77	4,08	231	2410,40	3,62	331	2144,65	2,50	431	1902,68	5,39
31	2575,11	2,30	132	2389,17	1,83	232	1423,82	2,98	332	1566,46	1,56	432	2041,07	3,28
32	2741,52	2,13	133	2144,65	1,64	233	2018,99	3,18	333	1719,29	3,57	433	2513,98	2,75
33	1317,69	4,59	134	1341,47	2,57	234	2092,86	1,91	334	1376,28	6,17	434	1557,12	5,09
34	3541,30	2,96	135	3328,20	2,40	235	2170,12	2,48	335	1805,04	5,24	435	1395,81	2,64
35	2500,39	2,84	136	954,31	3,40	236	5059,37	2,04	336	2207,48	3,36	436	2308,51	2,05
36	2940,19	2,75	137	2265,21	2,34	237	2233,80	3,56	337	3246,69	3,43	437	1370,33	2,23
37	1684,48	3,28	138	2658,31	2,98	238	1893,34	3,04	338	1888,24	3,27	438	2747,46	2,80
38	1785,51	2,00	139	2254,17	2,55	239	1596,18	3,89	339	1104,59	3,18	439	3011,51	2,63
39	2645,58	4,13	140	3927,61	1,59	240	2800,10	2,58	340	3010,66	1,74	440	1100,34	9,36
40	2569,16	3,71	141	1960,41	2,33	241	2980,94	2,37	341	1803,34	3,66	441	1468,82	2,98
41	1810,98	2,46	142	3400,36	2,68	242	4256,19	4,35	342	2843,40	2,49	442	1630,14	2,26
42	3066,70	2,81	143	2603,97	4,20	243	3127,83	3,22	343	1841,55	3,93	443	2172,67	2,17
43	2978,40	1,94	144	2474,07	2,04	244	1734,57	2,42	344	1453,54	4,70	444	1277,79	4,21
44	2431,62	2,71	145	2193,04	4,04	245	1367,79	2,64	345	3002,17	2,21	445	2113,24	2,21
45	2100,50	3,48	146	138,39	3,95	246	3233,10	3,26	346	2749,16	1,86	446	1709,10	2,23
46	2620,11	1,63	147	1591,08	2,51	247	1264,21	8,63	347	1507,88	3,96	447	1730,32	5,32
47	2775,48	4,05	148	1537,59	2,31	248	1844,09	3,52	348	2931,70	2,40	448	2246,53	2,65
48	2274,55	3,15	149	2217,67	3,29	249	4144,96	3,42	349	4151,75	1,61	449	3643,19	2,12
49	2685,48	2,56	150	2124,27	3,08	250	2806,04	2,43	350	2771,23	4,01	450	1810,98	3,17
50	2963,11	1,86	151	1562,21	2,38	251	846,48	2,82	351	2823,87	3,42	451	1225,15	2,56
51	3132,07	3,00	152	1316,85	2,47	252	2772,08	4,06	352	3067,54	2,94	452	1839,00	4,83
52	2333,13	2,51	153	1589,38	2,66	253	2690,58	4,39	353	2381,53	2,46	453	1348,26	3,03
53	3372,35	1,93	154	4142,42	2,78	254	2739,82	5,10	354	1865,32	2,50	454	1585,99	2,63
54	2665,95	3,34	155	3115,09	1,84	255	2118,33	3,42	355	4650,14	4,09	455	1313,45	2,35
55	2441,81	1,92	156	2049,56	2,99	256	2973,30	2,29	356	2543,69	4,32	456	1979,94	3,28
56	3028,49	2,63	157	2619,26	2,44	257	2204,08	2,58	357	1968,05	2,96	457	1827,11	3,39
57	1714,19	2,63	158	3032,73	5,44	258	2943,59	3,31	358	3465,74	2,54	458	1597,03	2,67
58	2348,42	1,51	159	1786,36	3,11	259	2146,35	5,52	359	1121,57	2,54	459	1928,15	1,65
59	1828,81	3,01	160	3475,08	2,98	260	3919,97	2,57	360	883,84	5,69	460	2485,11	2,55
60	3932,71	1,88	161	3520,08	2,92	261	3472,53	3,34	361	1484,10	2,97	461	1606,36	2,93
61	4386,09	2,00	162	2445,21	2,25	262	2665,10	5,00	362	3048,02	4,85	462	2047,86	2,41
62	1622,50	1,83	163	2401,91	3,56	263	2100,50	2,36	363	1962,11	8,04	463	2222,76	2,30
63	1569,01	2,70	164	3561,68	3,80	264	3215,28	3,34	364	1352,50	3,07	464	2695,67	2,50
64	2297,47	2,17	165	1545,23	3,97	265	3537,06	2,85	365	2834,91	3,04	465	1811,83	2,74
65	1759,19	2,24	166	1868,71	3,59	266	1883,15	4,01	366	2144,65	1,70	466	3261,12	2,12
66	2176,91	2,81	167	1524,01	2,56	267	1841,55	1,97	367	1493,44	2,84	467	3434,32	2,28
67	2414,64	1,64	168	3144,81	2,14	268	1708,25	3,44	368	1513,82	2,07	468	2896,04	2,14
68	3588,00	1,77	169	3105,75	2,67	269	4702,77	2,04	369	2530,96	2,14	469	2227,85	1,83
69	2182,01	2,91	170	2823,87	1,64	270	2731,33	2,11	370	2244,83	3,91	470	3377,44	2,07
70	1994,37	3,19	171	1983,33	3,37	271	3925,06	2,74	371	3088,77	2,13	471	2407,85	3,94
71	3549,79	3,20	172	2720,29	2,58	272	2439,26	3,24	372	3382,53	3,74	472	1680,23	2,79
72	4117,79	1,76	173	2755,95	2,35	273	3325,65	6,56	373	1540,99	1,69	473	1897,58	1,92
73	3110,00	2,01	174	1573,25	2,81	274	3434,32	3,52	374	2567,47	4,75	474	3373,19	2,52
74	2776,33	2,73	175	5301,34	2,99	275	2620,95	3,05	375	3317,16	1,54	475	1453,54	3,93
75	1320,24	5,28	176	1884,85	3,31	276	2338,23	2,26	376	2396,81	1,75	476	2586,14	2,56
76	4476,08	2,95	177	1850,88	1,65	277	2516,52	3,19	377	2753,40	2,00	477	1870,41	2,13
77	2646,43	2,50	178	2491,90	2,18	278	2672,75	3,32	378	2032,58	2,09	478	1511,27	3,12
78	2685,48	1,77	179	2678,69	1,90	279	2602,28	1,38	379	4127,98	2,62	479	2260,12	2,39
79	2043,61	2,80	180	1553,72	2,32	280	1954,47	1,97	380	2710,10	2,34	480	1417,03	1,60
80	2637,09	3,18	181	1580,89	1,90	281	3302,73	2,79	381	2108,14	2,62	481	2885,00	2,40
81	2419,73	2,41	182	2536,90	2,96	282	2513,98	3,56	382	4369,96	2,26	482	2593,79	3,03
82	3136,32	3,79	183	1853,43	2,45	283	2516,52	3,84	383	2198,99	2,30	4		

M 24h M	ÁREA	REDONDEZ	101	2456,24	1,86	201	2430,77	2,47	301	2463,88	3,25	401	1526,56	2,73
1	1761,74	1,73	102	1966,35	3,80	202	1923,90	2,39	302	2211,72	3,41	402	1877,20	3,20
2	1542,69	1,77	103	2102,20	2,78	203	2003,71	2,52	303	2174,37	2,41	403	3652,53	1,95
3	1369,49	2,09	104	1744,76	3,05	204	3576,96	1,87	304	1318,54	4,02	404	1140,25	1,53
4	1229,40	2,51	105	1903,52	6,29	205	2477,47	1,76	305	4273,17	2,70	405	1242,98	3,09
5	833,75	2,62	106	2201,53	2,36	206	1529,95	1,65	306	2563,22	2,08	406	1266,75	2,82
6	1495,14	2,29	107	3825,73	2,57	207	2216,82	3,40	307	3131,22	3,13	407	1012,04	2,37
7	1221,75	2,67	108	971,29	1,45	208	2428,23	2,85	308	3886,86	1,80	408	2240,59	4,53
8	1774,47	2,05	109	3187,26	1,86	209	2712,65	2,42	309	2590,39	2,81	409	1371,18	3,03
9	875,35	2,57	110	986,57	2,67	210	2847,65	3,32	310	2516,52	2,11	410	1547,78	2,56
10	2296,63	3,00	111	1497,69	4,18	211	2062,29	2,14	311	2576,81	2,58	411	1598,72	2,96
11	1322,79	3,37	112	1732,87	1,95	212	1827,11	2,69	312	1774,47	2,42	412	2915,57	2,55
12	1279,49	2,39	113	1095,25	3,02	213	2902,83	1,72	313	1939,18	2,46	413	2621,80	2,35
13	1851,73	2,48	114	2374,74	1,46	214	3200,84	1,58	314	2187,95	2,81	414	1383,92	2,69
14	1019,68	2,37	115	1907,77	1,78	215	1788,91	2,10	315	2093,71	1,93	415	1883,15	3,37
15	1481,56	2,43	116	1754,94	1,83	216	1723,53	3,17	316	2396,81	3,01	416	1990,13	3,51
16	2161,63	2,50	117	1698,91	1,93	217	2064,84	2,56	317	3077,73	1,55	417	2491,05	2,88
17	2360,30	1,95	118	2259,27	3,63	218	2469,83	1,50	318	3278,10	2,55	418	2284,74	1,86
18	1657,31	1,78	119	1872,11	2,24	219	3319,71	1,73	319	3537,06	2,28	419	1952,77	3,19
19	2030,03	1,76	120	1779,57	3,00	220	2842,55	1,89	320	1057,89	4,34	420	1285,43	2,94
20	1504,48	1,56	121	2125,97	4,59	221	2311,91	3,32	321	2505,49	1,68	421	2678,69	2,91
21	1316,00	3,85	122	1984,18	1,74	222	3199,14	1,91	322	2015,60	1,68	422	3047,17	2,20
22	1754,10	1,83	123	2744,06	3,35	223	2015,60	2,82	323	1847,49	2,17	423	1917,96	1,92
23	1604,67	2,13	124	3101,51	2,07	224	1765,13	2,42	324	2402,75	2,38	424	1843,24	2,71
24	2108,99	2,58	125	2401,06	1,94	225	2235,50	2,77	325	2619,26	1,54	425	2605,67	2,91
25	1377,98	3,12	126	4649,29	3,31	226	2558,13	2,24	326	1574,10	2,09	426	1915,41	2,40
26	1636,08	2,17	127	1297,32	2,27	227	3246,69	2,80	327	2652,37	2,67	427	1619,95	3,61
27	1859,38	1,80	128	3894,50	1,78	228	1670,04	4,06	328	1143,64	2,38	428	2992,83	3,50
28	2137,01	6,05	129	1468,82	1,62	229	2948,68	2,20	329	1615,70	2,07	429	1523,16	3,11
29	3145,66	3,09	130	2425,68	2,72	230	2367,09	1,78	330	3036,98	2,56	430	2396,81	2,21
30	1168,27	2,63	131	3553,19	1,66	231	2941,89	2,80	331	4103,36	2,66	431	5429,54	2,25
31	1231,09	2,14	132	4132,23	2,48	232	2346,72	3,27	332	3186,41	2,89	432	2075,88	3,87
32	1897,58	2,05	133	1579,20	2,50	233	4172,98	2,22	333	3273,01	2,51	433	2362,00	2,63
33	1907,77	2,65	134	4122,04	2,32	234	2698,22	4,01	334	1690,42	3,13	434	1849,19	3,10
34	2918,12	1,53	135	3130,37	2,94	235	3469,14	2,60	335	2608,22	3,39	435	1380,52	2,61
35	2880,76	2,69	136	1431,46	2,62	236	1837,30	2,51	336	3464,04	2,67	436	1844,09	2,62
36	2160,78	2,83	137	2511,43	2,23	237	3266,22	2,81	337	3561,68	2,84	437	2182,01	2,04
37	1795,70	2,81	138	2600,58	1,99	238	2160,78	2,37	338	1508,73	2,45	438	1719,29	2,14
38	1767,68	2,99	139	3166,88	2,80	239	1124,96	3,62	339	3796,86	2,17	439	1581,74	3,16
39	818,46	4,66	140	1700,61	3,68	240	1645,42	1,84	340	4201,00	2,67	440	1854,28	2,27
40	1809,28	1,94	141	1576,65	1,30	241	2860,38	1,91	341	2302,57	2,33	441	2049,56	2,62
41	2075,03	2,24	142	3053,96	2,43	242	2050,41	1,67	342	1957,01	2,38	442	2682,08	2,08
42	1922,20	3,78	143	2658,31	3,56	243	1063,83	2,76	343	1683,63	2,80	443	1479,86	3,56
43	1495,99	2,13	144	2228,70	4,19	244	2357,76	1,67	344	1180,15	2,65	444	1794,85	2,93
44	2763,59	2,75	145	3127,83	2,11	245	1827,11	3,30	345	5763,21	3,10	445	1954,47	2,25
45	2281,34	1,87	146	1845,79	2,23	246	2506,34	1,88	346	2907,08	2,25	446	2878,21	2,20
46	1874,66	1,91	147	1935,79	1,90	247	2340,77	2,77	347	2063,14	2,30	447	1980,79	2,35
47	2210,87	3,38	148	3177,92	1,63	248	1625,04	3,31	348	2474,07	2,00	448	1879,75	1,97
48	2247,38	1,94	149	2838,31	1,27	249	3742,52	2,32	349	1638,63	5,23	449	1934,09	3,08
49	2035,12	3,14	150	1042,61	1,99	250	2180,31	1,68	350	2429,07	2,60	450	2440,11	2,06
50	1895,88	2,50	151	1518,07	1,42	251	3259,42	1,91	351	2110,69	2,79	451	892,33	2,55
51	1531,65	1,95	152	3514,13	2,02	252	3516,68	3,08	352	2842,55	1,72	452	2769,53	2,32
52	2047,86	2,10	153	2958,02	2,48	253	4023,55	1,44	353	1807,58	2,92	453	2331,44	2,02
53	1394,96	2,53	154	1916,26	1,81	254	3085,37	3,34	354	2517,37	1,69	454	1981,64	2,78
54	1209,87	1,73	155	2378,13	1,63	255	2524,17	2,12	355	1281,19	2,63	455	1981,64	3,24
55	2308,51	3,11	156	1827,11	1,72	256	1132,61	2,23	356	1845,79	6,95	456	1724,38	2,69
56	1544,39	1,70	157	1994,37	2,23	257	4565,23	2,37	357	3584,60	1,85	457	1886,54	2,52
57	1738,81	1,93	158	1989,28	2,60	258	2633,69	1,72	358	1442,50	2,77	458	2089,46	1,87
58	1699,76	2,61	159	3136,32	2,32	259	2813,68	3,20	359	1985,88	1,97	459	1193,74	2,34
59	2312,76	2,55	160	1763,43	2,04	260	1421,28	2,32	360	3020,85	2,58	460	3104,90	1,70
60	1549,48	2,57	161	1141,95	2,38	261	1666,65	2,23	361	2194,74	1,92	461	1799,94	3,47
61	1609,76	2,49	162	4528,72	2,13	262	1536,74	1,93	362	2041,92	3,08	462	1709,10	2,62
62	1377,98	3,44	163	2095,41	3,17	263	2187,95	1,94	363	2652,37	2,89	463	1248,92	1,42
63	1845,79	3,33	164	4341,09	1,76	264	1939,18	2,07	364	2599,73	2,72	464	1576,65	1,85
64	2004,56	3,45	165	1529,10	3,60	265	1376,28	3,56	365	917,80	3,13	465	1181,00	1,74
65	1779,57	2,29	166	3417,34	2,32	266	2389,17	2,46	366	1160,62	2,03	466	1700,61	2,07
66	2266,06	3,01	167	1971,45	1,90	267	3479,32	2,55	367	1557,97	1,54	467	902,52	3,59
67	1159,77	4,55	168	2595,48	1,66	268	1542,69	1,95	368	1527,40	3,15	468	2088,61	1,70
68	1681,08	2,63	169	4647,59	1,94	269	1298,17	3,05	369	2877,36	4,00	469	1011,19	3,44
69	1335,52	1,80	170	3329,05	1,43	270	2370,49	4,13	370	1495,14	2,25	470	1669,19	2,91
70	2955,47	2,17	171	2313,61	3,16	271	1373,73	4,83	371	4021,00	1,92	471	1959,56	2,83
71	1485,80	2,68	172	2483,41	1,82	272	2114,93	2,18	372	2412,09	1,82	472	1276,94	1,95
72	2502,09	2,09	173	1751,55	1,62	273	3348,57	1,57	373	1259,96	2,22	473	2050,41	2,41
73	2916,42	3,08	174	2887,55	1,91	274	1861,07	2,19	374	1628,44	1,99	474	2468,13	2,69
74	790,45	2,24	175	3059,90	3,42	275	2186,25	3,54	375	1731,17	3,54	475	3194,05	1,80
75	1724,38	2,15	176	4138,17	2,46	276	2392,57	1,52	376	2168,42	2,89	476	2508,03	1,82
76	1302,41	2,05	177	2165,87	2,31	277	2136,16	2,25	377	1590,23	1,77	477	1231,09	3,80
77	607,06	1,88	178	2643,03	2,07	278	1363,54	4,14	378	2824,72	2,50	478	2123,42	3,27
78	1423,82	2,80	179	1898,43	2,54	279	3942,04	2,19	379	1896,73	2,29	479	2443,51	1,77
79	1185,25	3,51	180	2273,70	1,78	280	2311,06	1,91	380	1299,02	3,31	480	1681,08	2,56
80	1421,28	3,05	181	2476,62	3,06	281	2586,14	2,81	381	2468,98	1,54	481	3846,10	2,47
81	1094,40	3,83	182	3128,67	1,93	282	2215,97	2,20	382	1540,14	2,56	482	2592,94	1,78
82	1001,86	1,58	183	2285,59	1,63	283	1602,12	2,33	383	2060,59	2,92	483	2142,95	1,63

G 24h	ÁREA	REDONDEZ	101	1948,52	3,25	201	1546,93	2,50	301	2543,69	2,70	401	1959,56	4,07
1	1690,42	2,09	102	2909,62	2,90	202	2037,67	3,31	302	1684,48	3,88	402	1674,29	2,29
2	1268,45	1,77	103	2420,58	3,13	203	2039,37	1,77	303	1401,75	1,75	403	1862,77	2,04
3	2067,39	1,99	104	2890,10	1,96	204	2843,40	5,02	304	2075,03	2,49	404	2746,61	2,95
4	1099,49	3,03	105	2221,91	2,24	205	1793,15	3,32	305	1214,11	1,90	405	2513,13	1,92
5	1137,70	2,50	106	3216,12	2,43	206	2700,76	2,21	306	2055,50	1,76	406	1557,12	2,43
6	1231,09	2,25	107	3071,79	2,63	207	2131,91	2,73	307	1441,65	1,84	407	3012,36	1,41
7	2064,84	2,42	108	2345,02	3,05	208	2114,08	1,91	308	2176,06	2,16	408	1490,90	2,01
8	1287,98	5,19	109	2769,53	1,89	209	2295,78	2,52	309	2354,36	4,30	409	3062,45	1,37
9	2067,39	2,96	110	2070,78	2,81	210	2452,00	1,97	310	3043,77	1,69	410	1739,66	1,70
10	1851,73	3,76	111	1553,72	3,78	211	2796,70	1,70	311	1900,98	2,55	411	2035,97	1,55
11	1172,51	1,47	112	3319,71	2,09	212	1893,34	3,14	312	1883,15	2,67	412	3006,41	1,68
12	2192,19	1,74	113	1879,75	1,71	213	1271,85	1,99	313	4240,05	1,65	413	1236,19	3,60
13	1320,24	1,30	114	1718,44	2,43	214	1756,64	1,89	314	1438,26	3,31	414	1914,56	1,94
14	2356,91	2,78	115	1384,77	1,62	215	2391,72	2,62	315	2547,09	2,50	415	1393,26	1,49
15	1560,52	3,44	116	2626,05	2,18	216	1503,63	3,62	316	2910,47	2,73	416	1980,79	2,45
16	1707,40	1,97	117	3768,84	2,10	217	2415,49	2,29	317	2063,99	1,35	417	2614,16	2,39
17	1449,29	2,36	118	3543,85	2,39	218	1768,53	2,39	318	2086,07	2,32	418	1978,24	2,05
18	1994,37	1,97	119	1382,22	2,79	219	610,45	2,05	319	1739,66	2,47	419	1316,00	1,86
19	2912,17	2,90	120	1656,46	1,51	220	1788,91	2,56	320	1778,72	1,91	420	2645,58	2,12
20	2228,70	1,57	121	1700,61	4,37	221	685,17	2,02	321	1547,78	2,66	421	1994,37	2,30
21	2928,30	3,38	122	1007,80	1,92	222	1291,37	1,68	322	2216,82	3,51	422	2986,89	1,69
22	1314,30	1,94	123	1475,61	3,12	223	2826,42	2,81	323	2559,82	1,61	423	1997,77	4,36
23	1470,52	1,51	124	1900,98	3,41	224	1871,26	2,94	324	1263,36	2,32	424	2348,42	2,04
24	2603,13	2,28	125	1661,55	2,65	225	2274,55	2,12	325	1180,15	2,58	425	3537,06	4,47
25	1915,41	1,97	126	1766,83	1,56	226	3561,68	2,70	326	1615,70	1,64	426	2137,01	1,75
26	2107,29	1,54	127	1557,12	2,08	227	1302,41	2,45	327	2224,46	1,49	427	2075,03	2,28
27	1037,51	2,94	128	2473,22	2,22	228	2032,58	2,34	328	1029,87	3,92	428	1368,64	2,39
28	1676,83	3,10	129	683,47	2,58	229	1642,02	2,52	329	1277,79	2,38	429	1644,57	2,93
29	2744,06	1,51	130	1037,51	2,08	230	2357,76	2,54	330	2642,18	2,76	430	2508,88	2,66
30	1889,09	1,89	131	1462,88	1,95	231	1327,88	2,70	331	2766,99	2,63	431	1306,66	2,26
31	2018,99	2,41	132	772,62	1,82	232	1444,20	3,35	332	1561,37	4,40	432	1493,44	2,11
32	1619,10	1,89	133	1243,83	2,31	233	2784,82	2,83	333	2721,14	2,20	433	2232,95	1,92
33	2549,64	3,10	134	4086,38	1,55	234	1895,88	2,17	334	1638,63	4,04	434	1410,24	1,80
34	3219,52	4,04	135	1664,10	3,01	235	1385,62	3,58	335	1880,60	2,41	435	1489,20	2,18
35	1257,41	3,26	136	713,18	2,04	236	1187,79	4,43	336	1296,47	3,13	436	3507,34	2,92
36	3076,03	3,67	137	2500,39	1,31	237	1504,48	1,86	337	1751,55	3,55	437	1267,60	1,94
37	1129,21	1,95	138	1715,89	1,54	238	1447,60	2,37	338	2274,55	2,64	438	2794,16	2,23
38	2486,81	4,15	139	2718,59	2,25	239	1545,23	1,95	339	1579,20	2,13	439	2310,21	1,56
39	2119,18	1,75	140	1117,32	1,77	240	1611,46	2,46	340	1935,79	2,04	440	1650,51	1,94
40	1376,28	1,75	141	4304,58	3,03	241	1510,42	2,05	341	1101,19	2,38	441	1739,66	1,88
41	2222,76	2,29	142	2564,07	2,71	242	1362,69	2,19	342	965,35	3,63	442	2322,95	2,53
42	2133,61	2,28	143	1181,85	2,22	243	1654,76	6,45	343	1643,72	2,53	443	1887,39	1,95
43	1099,49	2,79	144	1069,78	1,74	244	2158,23	2,37	344	987,42	2,06	444	1384,77	2,39
44	1589,38	2,10	145	1184,40	3,88	245	1469,67	3,70	345	1420,43	3,54	445	2551,33	2,49
45	2561,52	2,39	146	1620,80	3,37	246	1701,46	2,33	346	1231,09	2,39	446	1765,13	2,59
46	3029,34	2,13	147	2170,97	2,08	247	1350,81	2,90	347	1471,37	1,88	447	1613,16	2,09
47	2052,10	3,79	148	1350,81	2,02	248	1147,04	1,59	348	1394,11	2,53	448	1867,02	2,25
48	1633,53	1,58	149	1899,28	1,85	249	1538,44	2,69	349	2064,84	2,78	449	3032,73	3,28
49	1802,49	1,72	150	1799,09	1,96	250	1322,79	3,00	350	1773,62	2,89	450	2444,36	2,39
50	2051,26	3,21	151	1481,56	2,58	251	1797,40	3,10	351	1272,70	2,59	451	2203,23	3,71
51	1934,94	3,35	152	1523,16	1,91	252	1139,40	2,73	352	2227,85	2,50	452	2102,20	2,25
52	2594,63	2,61	153	2103,90	1,82	253	2081,82	3,18	353	1136,85	4,76	453	1847,49	2,13
53	2458,79	3,66	154	1309,20	3,79	254	1685,32	2,53	354	1591,08	1,88	454	2763,59	1,86
54	1845,79	2,52	155	2828,97	2,29	255	2626,05	2,61	355	1569,01	3,17	455	1837,30	3,90
55	1922,20	2,15	156	1608,06	3,24	256	1313,45	4,76	356	1523,16	4,77	456	2027,48	2,51
56	2364,55	1,61	157	1852,58	3,71	257	1763,43	2,79	357	2935,94	2,48	457	1119,87	2,19
57	2819,63	1,74	158	2618,41	2,32	258	1243,83	2,79	358	1739,66	2,24	458	1249,77	2,43
58	2546,24	1,66	159	1279,49	2,84	259	2513,13	2,45	359	1093,55	2,66	459	2388,32	2,67
59	2885,85	2,28	160	1675,14	2,01	260	3173,67	3,60	360	935,63	1,72	460	1720,13	2,62
60	2078,42	2,17	161	2109,84	4,05	261	1462,03	2,51	361	1722,68	1,93	461	1543,54	2,64
61	1765,98	2,07	162	2662,56	2,15	262	1941,73	3,36	362	1810,13	1,37	462	2025,78	3,18
62	2338,23	3,71	163	2165,87	1,45	263	617,24	2,80	363	2279,64	1,52	463	2896,89	2,24
63	1056,19	1,62	164	1749,85	2,38	264	2609,92	2,22	364	2050,41	1,92	464	2467,28	1,62
64	2243,99	1,70	165	2557,28	2,08	265	1373,73	1,37	365	2881,61	1,81	465	2003,71	1,98
65	2637,94	2,60	166	1985,88	3,52	266	2545,39	2,40	366	1448,44	1,75	466	1376,28	2,12
66	2246,53	2,07	167	1997,77	4,21	267	1871,26	2,35	367	1252,32	1,60	467	2067,39	2,80
67	1800,79	3,31	168	2626,90	2,79	268	1602,97	2,42	368	1844,09	3,58	468	2411,24	2,22
68	1417,03	3,71	169	2412,09	3,86	269	1254,87	2,23	369	1933,24	1,92	469	2397,66	1,87
69	2939,34	3,76	170	940,72	1,98	270	1063,83	2,20	370	3123,58	2,51	470	1761,74	3,80
70	1462,88	1,54	171	2752,55	2,38	271	1212,41	2,17	371	2144,65	2,30	471	1450,14	2,80
71	1639,48	4,24	172	2230,40	1,90	272	2015,60	2,88	372	2241,44	3,16	472	2399,36	4,22
72	1617,40	2,58	173	2308,51	2,34	273	2104,74	3,23	373	2278,80	2,07	473	2002,01	2,50
73	2088,61	3,23	174	1706,55	2,44	274	1885,70	3,06	374	1333,83	1,79	474	1750,70	2,58
74	2247,38	4,51	175	995,91	3,26	275	2179,46	2,38	375	1495,99	1,80	475	3023,39	2,84
75	1848,34	1,81	176	1725,23	1,52	276	1590,23	1,92	376	1107,98	2,85	476	2046,16	5,43
76	1422,13	1,52	177	1925,60	1,62	277	1807,58	2,65	377	1623,34	1,65	477	2287,29	2,05
77	1405,14	2,23	178	1591,08	1,80	278	1959,56	2,30	378	3073,49	3,01	478	2026,63	3,85
78	1451,84	4,75	179	2310,21	2,09	279	554,42	3,79	379	961,95	1,31	479	2482,56	2,63
79	1030,72	2,36	180	2013,05	3,04	280	1788,91	3,12	380	1820,32	1,92	480	2550,49	4,30
80	1846,64	5,06	181	1233,64	1,57	281	2246,53	2,33	381	2308,51	3,24	481	1967,20	2,71
81	2449,45	2,92	182	2705,01	2,18	282	1800,79	1,81	382	1682,78	2,05	482	1709,10	2,69
82	2609,92	3,40	183	995,06	2,25	283	2371,34	2,67	383	2142,10	2,31	483	19	

G 24h M	ÁREA	REDONDEZ	101	1813,53	3,23	201	1305,81	2,53	301	3289,14	3,36	401	2789,06	1,90
1	1759,19	2,72	102	780,26	2,74	202	1791,45	2,18	302	1544,39	3,15	402	3078,58	1,39
2	921,20	2,10	103	2716,90	2,31	203	1733,72	2,45	303	1454,39	2,74	403	2072,48	1,84
3	2726,23	1,82	104	1294,77	1,81	204	1161,47	2,00	304	2738,12	1,45	404	1916,26	2,25
4	1037,51	2,50	105	1114,78	2,31	205	1422,13	2,04	305	760,73	2,64	405	1524,01	2,71
5	1632,68	1,92	106	1583,44	1,41	206	1128,36	1,69	306	1257,41	3,17	406	1385,62	2,36
6	2272,00	2,66	107	1107,98	1,32	207	2235,50	1,99	307	2401,91	1,71	407	3211,88	1,68
7	2250,78	2,07	108	1834,75	1,68	208	789,60	2,31	308	1602,97	2,71	408	2818,78	1,46
8	1327,03	2,44	109	1637,78	5,26	209	1094,40	2,42	309	1035,82	3,04	409	1485,80	1,88
9	1313,45	2,05	110	2002,01	1,92	210	854,12	2,28	310	2390,02	2,13	410	1479,86	1,75
10	2058,05	2,17	111	1484,95	3,49	211	1158,08	1,96	311	2616,71	1,89	411	2243,14	2,30
11	2522,47	3,36	112	1430,62	2,21	212	1979,94	3,11	312	1120,72	1,83	412	1585,14	2,58
12	1773,62	1,96	113	892,33	2,09	213	1402,60	2,79	313	1248,92	1,75	413	1417,88	3,05
13	2080,97	2,98	114	1284,58	1,63	214	1200,53	3,12	314	2897,74	1,88	414	2029,18	3,18
14	2682,08	2,89	115	2039,37	1,64	215	1740,51	2,25	315	1899,28	1,37	415	1637,78	1,54
15	1529,10	2,27	116	1429,77	1,80	216	1849,19	1,73	316	1706,55	1,69	416	2029,18	2,79
16	1336,37	3,53	117	2093,71	3,02	217	1766,83	2,54	317	1456,94	3,92	417	1973,99	1,54
17	2173,52	6,07	118	1408,54	2,73	218	1438,26	2,78	318	720,83	1,39	418	1411,09	1,93
18	1139,40	2,18	119	1290,53	2,15	219	1410,24	2,38	319	1397,50	1,91	419	2069,09	2,15
19	2070,78	2,95	120	995,91	2,32	220	1692,97	2,39	320	1646,27	2,47	420	3183,86	1,58
20	1906,92	1,64	121	1223,45	3,23	221	1971,45	1,54	321	871,95	2,71	421	2903,68	2,42
21	1201,38	3,04	122	1542,69	3,18	222	2006,26	2,33	322	1713,34	1,74	422	2139,55	2,00
22	1412,79	2,48	123	2641,33	3,73	223	2115,78	2,07	323	861,77	1,93	423	2761,04	1,60
23	1419,58	2,55	124	1131,76	2,88	224	1337,22	3,20	324	1098,64	1,47	424	2960,57	2,22
24	2092,86	2,79	125	1428,92	2,04	225	1945,98	2,13	325	2124,27	1,36	425	1833,90	1,69
25	792,99	3,15	126	1525,71	2,41	226	2284,74	1,96	326	1902,68	1,34	426	2027,48	2,92
26	2463,04	2,10	127	1450,14	2,93	227	1273,54	1,81	327	1664,95	3,64	427	2042,77	2,47
27	1850,04	2,85	128	1405,99	2,16	228	1366,94	1,88	328	1011,19	1,79	428	2996,23	3,24
28	1749,00	2,11	129	2013,05	3,14	229	1490,05	2,44	329	922,05	4,01	429	1432,31	1,91
29	1302,41	2,45	130	2300,02	1,84	230	1899,28	4,49	330	1229,40	2,20	430	2210,02	2,30
30	1217,51	3,32	131	1580,89	2,26	231	992,52	2,26	331	2274,55	1,45	431	2524,17	1,40
31	1588,53	2,23	132	1986,73	2,08	232	1614,85	1,63	332	1586,84	2,60	432	2390,02	3,24
32	1185,25	3,27	133	2204,08	1,57	233	911,01	2,98	333	1881,45	2,71	433	1250,62	2,13
33	1728,62	1,90	134	1857,68	2,48	234	3182,16	1,78	334	1230,24	1,48	434	1433,16	1,94
34	1344,01	2,44	135	3942,89	5,53	235	2343,32	2,15	335	2374,74	1,82	435	2286,44	2,20
35	1867,02	2,92	136	1591,08	2,47	236	2795,85	1,70	336	2115,78	2,17	436	1597,87	2,26
36	1641,17	1,89	137	1529,10	2,21	237	1435,71	1,62	337	2336,53	1,65	437	1466,27	1,65
37	1157,23	3,50	138	1871,26	2,14	238	1017,14	1,87	338	1898,43	1,68	438	1483,26	2,09
38	1495,14	2,37	139	1817,77	1,37	239	1949,37	1,51	339	1492,59	2,00	439	2203,23	2,34
39	2616,71	2,67	140	2862,08	3,51	240	1508,73	2,64	340	1696,36	2,53	440	1479,86	1,88
40	1570,71	3,31	141	1872,96	3,42	241	1036,67	2,01	341	1483,26	1,83	441	817,62	2,36
41	2961,42	1,36	142	2182,01	2,04	242	1251,47	2,70	342	1349,96	2,39	442	1181,00	4,02
42	2117,48	3,33	143	1844,09	2,24	243	2317,85	2,27	343	2198,14	2,57	443	1159,77	1,96
43	2106,44	2,70	144	1543,54	1,79	244	1619,95	1,79	344	1840,70	2,63	444	1126,66	1,92
44	3362,16	2,12	145	1738,81	2,27	245	3230,56	1,35	345	1484,10	3,44	445	1300,71	2,59
45	1962,11	3,38	146	2104,74	2,74	246	1155,53	1,63	346	1550,33	1,83	446	1612,31	2,16
46	2658,31	3,16	147	1803,34	1,47	247	1404,30	2,02	347	1410,24	1,87	447	1530,80	2,17
47	2097,95	1,99	148	2190,50	2,51	248	1503,63	2,22	348	1422,13	2,21	448	1668,34	2,21
48	1082,51	2,17	149	2436,72	1,68	249	1741,36	1,92	349	761,58	2,16	449	1023,08	3,66
49	1784,66	4,56	150	1306,66	2,06	250	1577,50	1,73	350	1884,00	2,67	450	1774,47	2,95
50	1561,37	3,43	151	1222,60	3,31	251	2292,38	2,15	351	1732,02	2,49	451	2395,11	1,77
51	3331,59	1,87	152	1289,68	2,20	252	1425,52	1,93	352	1711,64	1,66	452	1816,92	2,10
52	1962,96	2,21	153	823,56	4,07	253	1749,00	2,36	353	2885,00	1,62	453	1169,11	2,64
53	2339,93	1,67	154	1379,67	2,22	254	1013,74	2,35	354	1329,58	2,30	454	1320,24	1,60
54	2789,91	1,79	155	2023,24	2,56	255	2288,98	1,87	355	1073,17	1,51	455	2508,88	1,54
55	2506,34	1,95	156	1369,49	4,82	256	1237,04	1,74	356	2107,29	1,72	456	1715,04	3,04
56	3746,77	1,80	157	656,30	2,60	257	1632,68	1,71	357	2276,25	2,05	457	1987,58	2,42
57	2345,02	3,08	158	1619,10	2,13	258	1636,08	2,90	358	1873,81	1,88	458	2158,23	2,13
58	2637,09	2,82	159	1392,41	2,72	259	1747,30	2,56	359	1484,10	1,67	459	1221,75	1,62
59	916,10	2,33	160	2323,79	2,12	260	1532,50	1,35	360	1366,09	1,62	460	2084,37	1,59
60	1398,35	2,85	161	2378,98	2,52	261	2539,45	1,91	361	1825,41	1,70	461	2189,65	1,84
61	1217,51	2,13	162	1173,36	2,46	262	1265,90	2,73	362	2401,06	1,57	462	1106,29	2,62
62	1422,13	2,02	163	1584,29	1,62	263	1720,13	2,63	363	1945,13	1,85	463	2145,50	2,02
63	1563,06	1,91	164	2051,26	1,91	264	1506,18	3,20	364	2363,70	2,85	464	2425,68	1,58
64	2254,17	2,20	165	1793,15	2,87	265	1780,42	2,14	365	1044,31	1,99	465	1688,72	2,71
65	1234,49	2,60	166	1027,33	2,03	266	1411,09	2,93	366	2250,78	2,56	466	1848,34	1,47
66	1177,60	1,84	167	1407,69	1,77	267	1427,22	2,24	367	2479,17	1,76	467	2211,72	1,94
67	1493,44	1,84	168	1847,49	2,74	268	1422,97	1,99	368	855,82	3,70	468	1863,62	1,80
68	1338,07	2,16	169	2021,54	2,78	269	1440,80	2,76	369	1458,63	2,40	469	1096,95	2,80
69	2013,05	2,54	170	1594,48	2,78	270	2224,46	2,27	370	1898,43	3,68	470	1025,63	4,78
70	2328,04	2,97	171	1467,97	3,05	271	1144,49	2,34	371	2187,10	2,41	471	2074,18	2,15
71	1010,35	1,39	172	1642,02	2,06	272	1304,11	3,12	372	1674,29	1,92	472	2787,36	2,82
72	1320,24	3,18	173	2294,08	1,43	273	1067,23	1,94	373	1699,76	1,52	473	1843,24	3,22
73	888,93	2,90	174	2102,20	2,30	274	1825,41	1,77	374	2102,20	1,76	474	1924,75	1,86
74	878,75	1,52	175	828,65	2,33	275	1632,68	2,70	375	1564,76	3,47	475	1540,14	1,66
75	1503,63	2,75	176	1552,03	2,34	276	2029,18	2,85	376	2482,56	2,32	476	2030,88	2,50
76	973,84	3,38	177	1931,54	2,20	277	1896,73	2,39	377	1546,08	1,84	477	1911,17	2,58
77	1515,52	2,48	178	1511,27	2,46	278	1692,12	1,75	378	1363,54	2,83	478	1467,97	2,13
78	1877,20	2,53	179	1422,13	2,37	279	904,22	1,53	379	2368,79	1,91	479	1647,97	1,65
79	1965,50	2,47	180	1437,41	1,89	280	2031,73	2,02	380	1260,81	1,88	480	2002,01	2,12
80	1313,45	1,88	181	1321,09	2,25	281	2544,54	2,20	381	1592,78	1,66	481	2238,04	3,22
81	1659,00	1,72	182	1738,81	1,42	282	1242,98	2,24	382	1620,80	2,17	482	1853,43	1,99
82	1883,15	2,29	183	1140,25	2,64	283	1241,28	1,75	383	1776,17	2,84	483	1995,22	1,51
83	142													

GF 24h	ÁREA	REDONDEZ	101	2405,30	1,40	201	1611,46	2,83	301	950,91	2,31	401	1563,06	2,35
1	971,29	3,10	102	3162,64	2,89	202	2350,96	2,70	302	867,71	2,07	402	792,99	1,62
2	3437,72	4,06	103	3601,58	2,92	203	1332,98	2,21	303	2735,57	3,92	403	844,78	2,63
3	2461,34	6,80	104	1924,75	1,96	204	2876,51	5,31	304	2529,26	7,44	404	1849,19	2,34
4	2025,78	1,49	105	1525,71	2,49	205	2256,72	1,74	305	1860,22	4,87	405	742,90	1,78
5	1393,26	1,96	106	1512,97	2,50	206	1377,98	3,12	306	1256,56	2,91	406	1200,53	2,26
6	1209,02	1,78	107	3857,99	2,24	207	1850,88	2,40	307	1486,65	3,56	407	807,43	4,07
7	1624,19	1,87	108	1693,81	2,71	208	1524,01	2,42	308	1604,67	4,07	408	1190,34	3,20
8	2377,28	1,88	109	2022,39	3,93	209	1777,87	3,69	309	767,52	2,10	409	1539,29	4,88
9	1119,02	2,42	110	2293,23	1,92	210	1583,44	2,30	310	1871,26	3,47	410	2946,13	3,03
10	1372,03	4,22	111	4346,18	2,65	211	2120,03	2,97	311	1466,27	2,25	411	703,00	3,18
11	777,71	2,92	112	2951,23	3,07	212	1124,12	3,33	312	1306,66	2,63	412	1528,25	3,93
12	2390,87	2,51	113	1463,73	2,31	213	1914,56	4,15	313	1113,93	1,93	413	1775,32	2,59
13	2074,18	2,04	114	3754,41	3,71	214	2266,91	2,14	314	1772,77	2,71	414	2036,82	3,62
14	1529,95	2,10	115	3782,43	6,25	215	1540,14	2,95	315	3413,95	5,17	415	1631,84	2,56
15	1859,38	2,79	116	3404,61	3,51	216	1529,95	2,76	316	1435,71	2,83	416	1540,99	1,87
16	598,57	2,78	117	882,99	1,98	217	1102,04	2,51	317	2414,64	4,19	417	1102,04	2,69
17	1303,26	2,94	118	1922,20	1,60	218	1258,26	5,05	318	1339,77	1,30	418	1246,38	1,67
18	1732,02	3,73	119	1250,62	2,43	219	734,41	4,61	319	1461,18	5,61	419	2343,32	2,47
19	849,03	3,63	120	2122,57	1,68	220	856,67	2,77	320	985,72	1,87	420	902,52	5,35
20	2114,08	3,40	121	991,67	4,10	221	1472,22	2,97	321	1765,13	4,82	421	1254,87	4,85
21	1251,47	2,65	122	1999,47	2,38	222	1113,93	1,76	322	2100,50	2,80	422	1726,93	1,74
22	1294,77	4,07	123	1284,58	1,94	223	968,74	2,24	323	2394,26	2,71	423	1107,98	3,21
23	1493,44	2,89	124	1596,18	3,92	224	1367,79	4,28	324	1492,59	2,64	424	2148,05	1,88
24	1583,44	2,82	125	1445,05	2,44	225	1378,82	1,90	325	675,83	3,25	425	997,61	3,87
25	1659,85	2,05	126	1855,13	4,79	226	3076,88	3,05	326	1229,40	2,58	426	3015,75	3,70
26	1695,51	3,77	127	2259,27	2,53	227	2020,69	1,95	327	1000,16	2,38	427	1575,80	3,09
27	2648,12	2,24	128	1900,13	2,85	228	874,50	1,85	328	1381,37	3,29	428	2354,36	4,24
28	1376,28	3,29	129	1259,11	3,01	229	2218,51	5,61	329	1416,18	2,29	429	1348,26	2,84
29	1321,94	2,07	130	1961,26	5,60	230	638,47	1,55	330	1534,20	1,62	430	1004,40	2,71
30	1615,70	2,34	131	2121,73	1,55	231	2099,65	2,49	331	1053,65	1,92	431	1116,47	2,53
31	1659,85	2,92	132	1573,25	2,81	232	1909,47	2,47	332	933,93	2,39	432	1875,51	2,56
32	1955,32	1,83	133	1503,63	1,45	233	1749,00	3,45	333	621,49	2,44	433	2628,60	2,52
33	2126,82	2,06	134	1147,04	5,65	234	1807,58	3,59	334	629,13	1,46	434	1329,58	3,92
34	1617,40	3,20	135	2922,36	4,53	235	1519,76	3,85	335	781,96	3,64	435	2727,08	4,18
35	1090,15	2,51	136	974,69	3,28	236	2075,03	1,57	336	1096,10	1,93	436	3093,02	2,38
36	2043,61	2,53	137	1307,51	2,09	237	9670,45	2,41	337	885,54	2,81	437	1749,00	2,54
37	1776,17	2,74	138	1051,10	2,01	238	1527,40	7,55	338	1118,17	2,71	438	1536,74	3,85
38	1425,52	3,14	139	1911,17	3,38	239	1214,96	1,46	339	1385,62	1,94	439	818,46	1,53
39	1564,76	5,20	140	1687,02	2,18	240	1249,77	1,70	340	1157,23	2,97	440	1973,99	5,31
40	1499,39	2,25	141	1230,24	3,04	241	1288,83	1,41	341	1248,07	2,89	441	1837,30	2,32
41	2118,33	2,71	142	2372,19	3,10	242	1220,90	3,21	342	1366,09	2,51	442	1293,07	1,69
42	1305,81	1,95	143	1893,34	2,07	243	1231,09	1,35	343	1755,79	1,91	443	674,98	2,78
43	1435,71	1,49	144	3157,54	1,62	244	1467,97	1,81	344	2932,55	2,71	444	1209,87	2,95
44	1253,17	2,99	145	1484,10	1,74	245	6622,43	1,64	345	1459,48	3,98	445	1638,63	2,52
45	1452,69	3,13	146	1291,37	2,30	246	2426,53	2,72	346	1379,67	4,33	446	2528,41	2,50
46	1126,66	2,35	147	2648,12	3,23	247	1574,10	2,37	347	1268,45	2,17	447	1812,68	3,73
47	2573,41	1,85	148	1834,75	2,27	248	1250,62	2,56	348	1212,41	1,82	448	2117,48	3,57
48	1565,61	3,37	149	1647,12	1,78	249	2143,80	1,99	349	1462,88	2,83	449	2558,13	3,21
49	2210,02	2,85	150	1768,53	3,73	250	1847,49	4,49	350	1132,61	2,49	450	1892,49	1,56
50	866,01	2,08	151	1583,44	1,74	251	2074,18	7,37	351	1359,30	5,42	451	1630,14	5,79
51	1730,32	3,11	152	907,61	2,23	252	2842,55	4,94	352	154,52	4,02	452	1748,15	3,75
52	1582,59	3,03	153	3548,09	1,93	253	1373,73	3,06	353	1029,87	2,07	453	1960,41	3,09
53	2777,18	3,42	154	2048,71	3,31	254	827,80	2,79	354	648,66	2,24	454	1017,14	1,86
54	1023,08	3,19	155	2185,40	2,23	255	1193,74	2,55	355	1614,01	2,17	455	1432,31	2,48
55	1356,75	2,11	156	1471,37	2,18	256	2683,78	5,78	356	1285,43	3,59	456	1325,34	4,20
56	1313,45	4,99	157	2013,90	2,89	257	777,71	2,45	357	1142,79	1,96	457	2852,74	1,68
57	2125,97	5,59	158	1287,98	4,00	258	1907,77	2,65	358	1085,91	1,95	458	1341,47	1,96
58	1384,77	2,43	159	1250,62	2,71	259	1691,27	4,52	359	1243,83	2,42	459	1810,98	4,07
59	1771,93	4,14	160	2088,61	2,16	260	1847,49	2,66	360	1078,27	5,24	460	2423,98	2,08
60	1539,29	2,78	161	1411,94	2,15	261	1803,34	2,98	361	1965,50	3,45	461	2205,78	4,86
61	2235,50	3,61	162	1270,15	4,61	262	1262,51	6,61	362	1183,55	3,36	462	986,57	7,15
62	2069,09	2,80	163	1525,71	2,78	263	2463,88	2,29	363	1029,87	2,25	463	1709,95	2,01
63	1599,57	3,93	164	2063,14	3,20	264	1687,87	5,64	364	1096,95	2,11	464	1741,36	1,57
64	2042,77	1,77	165	1211,57	2,63	265	1202,23	1,50	365	1125,81	2,26	465	184,24	3,61
65	1784,66	1,56	166	1778,72	2,86	266	1928,15	2,86	366	1081,66	4,39	466	1127,51	2,22
66	1520,61	4,19	167	1327,88	1,68	267	1848,34	3,65	367	1442,50	4,58	467	1466,27	2,04
67	1133,45	3,73	168	1466,27	2,80	268	2181,16	4,89	368	1136,85	3,84	468	1220,91	5,59
68	278,48	13,27	169	1246,38	3,14	269	2581,90	5,14	369	1552,03	2,98	469	1338,07	3,01
69	745,45	5,23	170	2110,69	2,82	270	2137,86	3,04	370	1023,93	2,32	470	1096,10	1,50
70	1611,46	4,75	171	2179,46	2,51	271	1124,12	1,89	371	1182,70	4,06	471	1921,35	2,60
71	2400,21	7,27	172	1251,47	2,98	272	1197,13	1,74	372	1014,59	2,96	472	1521,46	3,62
72	3435,17	3,46	173	2116,63	3,93	273	1663,25	2,13	373	1115,63	1,54	473	1733,72	3,73
73	2906,23	3,42	174	1716,74	2,30	274	873,65	2,24	374	1619,10	2,12	474	2463,88	3,03
74	1685,32	3,58	175	1821,17	1,87	275	797,24	3,04	375	934,78	2,02	475	2745,76	2,77
75	2991,98	4,43	176	1923,05	6,94	276	2000,31	1,51	376	878,75	2,37	476	1244,68	3,88
76	1594,48	3,90	177	1200,53	1,46	277	1044,31	3,08	377	1853,43	2,69	477	2429,07	3,08
77	1348,26	1,74	178	1601,27	1,95	278	1533,35	2,11	378	2347,57	2,77	478	1735,42	4,82
78	1393,26	4,11	179	1506,18	3,54	279	734,41	2,01	379	1511,27	2,38	479	978,08	6,12
79	1542,69	3,32	180	1941,73	1,73	280	1424,67	2,64	380	2002,86	2,50	480	2629,45	2,11
80	1152,98	1,49	181	2029,18	5,13	281	1327,03	2,74	381	1031,57	1,82	481	1206,47	2,98
81	1868,71	3,83	182	2307,66	3,54	282	732,71	3,25	382	1694,66	1,53	482	2503,79	2,39
82	1920,51	3,33	183	1685,32	1,80	283	1838,15	3,33	383	3290,84	2,09	483	1031,57	1,56
83	2													



GF 24h M	ÁREA	REDONDEZ	101	1287,13	1,82	201	1417,03	2,26	301	1560,52	2,01	401	1043,46	1,88
1	1985,03	2,03	102	1039,21	2,22	202	1383,92	5,10	302	1251,47	1,75	402	886,39	3,99
2	929,69	2,81	103	1080,82	3,24	203	1262,51	1,75	303	1700,61	3,98	403	1290,53	2,92
3	1226,85	1,70	104	1607,21	2,13	204	577,34	1,88	304	2444,36	3,79	404	927,99	1,61
4	833,75	2,08	105	1084,21	2,33	205	1024,78	3,42	305	1606,36	3,99	405	3557,43	1,78
5	1182,70	1,62	106	1400,90	1,56	206	1064,68	1,91	306	1586,84	4,70	406	1080,82	1,90
6	1427,22	1,46	107	673,28	2,71	207	757,33	2,27	307	2409,55	3,18	407	816,77	1,74
7	1355,90	2,13	108	1580,04	1,97	208	1293,92	1,93	308	1104,59	3,40	408	2705,01	2,00
8	1507,88	1,86	109	1098,64	2,13	209	1062,14	2,61	309	1797,40	2,83	409	960,25	3,25
9	1252,32	1,96	110	992,52	2,53	210	1286,28	2,53	310	1598,72	2,48	410	1256,56	5,16
10	1981,64	1,65	111	1422,97	2,21	211	918,65	2,43	311	1302,41	2,93	411	945,82	1,72
11	2541,15	2,48	112	1224,30	2,15	212	1355,90	1,58	312	3496,30	2,32	412	1973,15	2,83
12	1253,17	2,02	113	1951,92	2,09	213	1417,88	2,25	313	2429,07	2,98	413	1081,66	3,25
13	1800,79	3,26	114	1953,62	2,02	214	1061,29	1,69	314	2009,65	1,82	414	1301,56	3,07
14	947,52	3,60	115	1343,17	3,03	215	584,13	6,89	315	2995,38	4,59	415	1031,57	1,84
15	721,68	2,77	116	1306,66	1,64	216	1475,61	2,42	316	1371,18	1,82	416	1531,65	1,69
16	730,17	3,83	117	933,93	1,95	217	1807,58	2,23	317	1213,26	1,18	417	1071,48	2,26
17	1203,92	2,72	118	761,58	2,01	218	1230,24	2,63	318	1511,27	1,26	418	859,22	2,63
18	1030,72	3,20	119	1812,68	2,45	219	1759,19	3,46	319	906,76	1,92	419	1070,63	1,40
19	1533,35	1,28	120	1372,03	1,75	220	1296,47	1,85	320	1001,01	2,23	420	1435,71	1,62
20	652,90	1,98	121	787,90	2,29	221	1386,47	4,84	321	2008,80	1,85	421	1251,47	3,28
21	539,98	1,75	122	1943,43	2,36	222	2796,70	2,56	322	4530,42	1,69	422	1418,73	2,18
22	1204,77	2,32	123	1479,01	2,26	223	1457,78	3,54	323	1091,00	1,73	423	1627,59	2,70
23	1735,42	2,61	124	1410,24	1,95	224	1598,72	1,67	324	1278,64	3,06	424	2770,38	3,16
24	1147,04	1,88	125	1857,68	1,31	225	1304,96	2,56	325	1450,99	2,63	425	1283,73	2,32
25	2232,95	4,92	126	809,13	2,07	226	845,63	3,40	326	1006,95	3,65	426	1198,83	1,38
26	1613,16	1,94	127	1312,60	2,74	227	1742,21	2,79	327	954,31	3,38	427	2544,54	4,14
27	1791,45	2,09	128	1474,76	3,46	228	1083,36	2,84	328	1282,88	3,76	428	1804,19	4,63
28	985,72	1,50	129	923,74	3,13	229	2321,25	2,60	329	2131,91	1,93	429	1503,63	1,98
29	939,03	2,39	130	1685,32	3,55	230	1006,10	1,26	330	1667,49	3,22	430	1057,04	2,27
30	1522,31	2,90	131	2169,27	2,04	231	900,82	2,13	331	2516,52	3,56	431	1349,96	2,17
31	1169,96	1,87	132	1158,08	1,99	232	2837,46	4,60	332	1902,68	2,14	432	1248,92	1,91
32	837,14	1,52	133	1550,33	2,17	233	1054,50	2,07	333	1732,87	3,47	433	1165,72	3,13
33	545,93	3,84	134	2116,63	1,50	234	1567,31	3,26	334	1304,11	2,30	434	1052,80	1,87
34	1428,07	2,05	135	1165,72	2,52	235	1788,06	2,90	335	1244,68	2,36	435	871,95	2,36
35	1989,28	1,62	136	1259,11	2,16	236	1060,44	1,56	336	1689,57	2,62	436	724,22	3,25
36	947,52	2,82	137	1769,38	2,09	237	766,67	3,28	337	1521,46	1,83	437	1709,10	3,38
37	1188,64	2,72	138	1654,76	1,85	238	1389,01	2,80	338	1855,13	2,51	438	1987,58	2,57
38	790,45	2,86	139	1312,60	2,03	239	1497,69	1,90	339	924,59	2,43	439	1672,59	3,01
39	1840,70	4,36	140	1455,24	2,65	240	1895,88	2,92	340	1209,02	2,68	440	1837,30	2,27
40	1582,59	1,57	141	594,32	2,42	241	1239,58	3,57	341	1224,30	2,78	441	1695,51	2,17
41	1196,28	1,72	142	1519,76	2,00	242	2055,50	1,61	342	2489,35	1,92	442	791,30	2,85
42	2117,48	1,80	143	887,24	2,56	243	964,50	1,73	343	1246,38	1,64	443	1460,33	1,88
43	1369,49	3,02	144	1180,15	3,45	244	1032,42	2,80	344	972,14	2,44	444	834,60	2,13
44	1182,70	1,54	145	881,29	3,01	245	1492,59	1,42	345	1411,94	1,72	445	984,87	2,72
45	1196,28	1,69	146	1200,53	2,53	246	1247,22	2,15	346	1234,49	2,20	446	1960,41	2,19
46	907,61	2,01	147	1301,56	1,82	247	1167,42	2,39	347	1603,82	2,28	447	1749,85	2,89
47	1172,51	3,35	148	972,99	2,75	248	1401,75	2,83	348	1631,84	1,94	448	952,61	2,30
48	1271,00	3,02	149	2366,25	1,69	249	1040,91	2,53	349	1183,55	3,01	449	2167,57	1,59
49	1429,77	1,66	150	1967,20	4,34	250	798,94	1,30	350	1961,26	2,57	450	1342,32	3,59
50	1228,55	2,31	151	1213,26	2,41	251	1528,25	3,62	351	1624,19	1,57	451	1353,35	3,12
51	1333,83	3,70	152	1040,06	3,11	252	2727,93	2,10	352	1673,44	1,78	452	1539,29	2,59
52	1450,99	2,19	153	2122,57	2,83	253	2237,19	2,73	353	1039,21	3,06	453	1280,34	3,10
53	984,03	1,81	154	935,63	3,34	254	1963,81	2,24	354	986,57	2,82	454	1369,49	3,10
54	1041,76	1,97	155	1545,23	2,41	255	1760,89	1,73	355	1569,86	4,55	455	1328,73	3,94
55	1982,48	2,56	156	1079,12	2,54	256	1854,28	2,96	356	1624,19	2,30	456	1781,26	4,89
56	961,95	5,18	157	1517,22	1,90	257	2004,56	1,81	357	1435,71	2,06	457	1215,81	3,58
57	2896,89	2,77	158	1739,66	2,67	258	978,08	2,40	358	2110,69	2,12	458	1212,41	2,14
58	1537,59	3,63	159	1858,53	1,92	259	1338,92	2,13	359	952,61	1,90	459	2329,74	2,83
59	735,26	1,87	160	1453,54	2,34	260	1000,16	1,95	360	2594,63	2,86	460	1242,13	2,54
60	1888,24	2,12	161	1465,43	3,45	261	1148,74	2,71	361	1236,19	1,85	461	1318,54	2,10
61	1242,98	2,44	162	1162,32	2,20	262	1405,14	1,77	362	1004,40	2,57	462	1835,60	2,08
62	846,48	2,40	163	1346,56	2,38	263	1023,93	1,74	363	1254,87	2,31	463	2119,18	1,81
63	1389,01	2,65	164	1861,92	1,62	264	1377,98	1,91	364	1122,42	1,90	464	1228,55	2,78
64	1500,24	2,28	165	970,44	1,35	265	1647,97	1,80	365	1521,46	3,22	465	1613,16	2,13
65	1200,53	4,71	166	1296,47	2,82	266	1027,33	1,48	366	1245,53	2,06	466	1569,86	2,68
66	1022,23	1,21	167	1799,94	2,18	267	1972,30	2,28	367	804,03	4,03	467	1217,51	2,57
67	1529,10	3,34	168	1008,65	2,08	268	1750,70	1,50	368	2008,80	4,11	468	990,82	2,25
68	970,44	2,77	169	748,00	2,64	269	1610,61	2,96	369	1489,20	2,37	469	899,12	4,49
69	1367,79	5,44	170	2018,14	2,10	270	1550,33	2,01	370	1184,40	2,72	470	1696,36	2,13
70	785,35	2,74	171	1124,12	2,16	271	1170,81	1,73	371	1377,98	2,22	471	971,29	3,55
71	908,46	1,41	172	1482,41	1,89	272	1310,05	1,79	372	2759,35	2,37	472	1383,07	1,96
72	1431,46	2,21	173	1909,47	1,70	273	1822,87	2,62	373	2000,31	1,66	473	1184,40	3,68
73	3226,31	2,46	174	1583,44	2,50	274	809,13	1,86	374	1839,85	1,92	474	1501,93	2,23
74	1581,74	2,07	175	1023,93	2,20	275	1881,45	2,62	375	1305,81	3,73	475	2084,37	2,03
75	923,74	2,48	176	1579,20	3,15	276	1540,14	1,46	376	1291,37	2,09	476	1394,11	2,81
76	1068,08	1,15	177	1787,21	1,99	277	1750,70	2,82	377	927,99	4,15	477	1832,21	2,10
77	1095,25	2,67	178	1715,89	4,75	278	691,96	2,51	378	1301,56	2,47	478	1400,05	2,21
78	1653,91	2,11	179	1209,87	3,71	279	2206,63	1,71	379	1821,17	2,99	479	1167,42	3,68
79	1973,99	1,58	180	1169,96	3,05	280	1559,67	3,47	380	873,65	2,87	480	1653,06	1,94
80	1342,32	1,46	181	2078,42	2,07	281	1348,26	2,49	381	971,29	2,24	481	1020,53	4,16
81	2120,03	2,64	182	1061,29	2,61	282	1298,17	3,68	382	1790,60	4,01	482	845,63	3,26
82	1728,62	1,77	183	1203,92	2,77	283	1316,00	2,44	383	1190,34	1,78	483	1066,38	2,62
83	673,28	2,57	184											

M 72h	ÁREA	REDONDEZ	101	1321,09	1,98	201	2065,69	2,20	301	1459,48	2,34	401	2305,12	2,48
1	2085,22	2,21	102	1799,94	3,27	202	2802,65	1,90	302	2172,67	4,05	402	2037,67	1,71
2	1865,32	2,43	103	2637,94	1,70	203	2683,78	1,88	303	1835,60	2,94	403	1585,99	2,34
3	2369,64	2,35	104	2349,27	1,83	204	1995,22	1,81	304	2603,97	3,45	404	2943,59	1,94
4	1689,57	1,77	105	2906,23	2,36	205	1704,00	2,85	305	3543,85	1,49	405	3289,99	2,14
5	1594,48	2,58	106	2389,17	2,51	206	1689,57	2,22	306	1707,40	3,48	406	1742,21	1,59
6	2039,37	2,00	107	2422,28	2,13	207	3208,48	1,89	307	1949,37	2,36	407	1082,51	1,95
7	1597,87	2,70	108	1349,96	1,55	208	2062,29	2,15	308	2981,79	1,93	408	2378,98	1,61
8	1684,48	2,68	109	1458,63	2,53	209	2334,83	2,34	309	3413,10	2,65	409	2388,32	2,38
9	2143,80	3,40	110	1703,15	2,30	210	2254,17	2,27	310	1288,83	2,54	410	1887,39	2,56
10	2474,92	1,50	111	1143,64	4,01	211	2250,78	2,43	311	1178,45	4,24	411	1829,66	1,98
11	1429,77	2,82	112	1681,93	2,69	212	1797,40	1,99	312	2319,55	1,84	412	1989,28	2,51
12	1033,27	1,57	113	1849,19	2,92	213	1228,55	1,58	313	2911,32	2,16	413	1440,80	2,05
13	1766,83	1,52	114	2991,13	2,97	214	2235,50	2,02	314	2220,21	1,69	414	1777,02	2,16
14	1929,00	1,32	115	2137,01	2,10	215	1495,14	2,04	315	3036,13	2,62	415	1858,53	1,82
15	1636,93	2,31	116	1884,00	1,71	216	2525,01	1,67	316	2789,06	1,95	416	1539,29	1,29
16	1338,07	2,79	117	1720,98	2,14	217	1867,87	2,08	317	4436,18	2,19	417	2503,79	1,75
17	1344,86	2,12	118	1013,74	3,53	218	2607,37	1,46	318	1352,50	2,82	418	2322,10	1,50
18	1515,52	2,63	119	1584,29	1,56	219	2063,14	2,02	319	1568,16	3,15	419	1681,08	1,99
19	3012,36	2,08	120	2041,92	2,66	220	1744,76	2,56	320	3220,37	2,18	420	1300,71	1,99
20	3239,05	2,04	121	1436,56	2,42	221	1701,46	2,26	321	2309,36	2,08	421	1475,61	2,30
21	1100,34	3,05	122	1857,68	3,73	222	1508,73	4,91	322	1278,64	2,18	422	1612,31	2,06
22	1455,24	2,67	123	1691,27	2,79	223	1214,96	2,04	323	3061,60	2,60	423	2165,87	1,71
23	1625,04	1,94	124	1872,11	2,05	224	1908,62	2,18	324	1580,04	3,52	424	1391,56	1,95
24	2067,39	1,88	125	1762,59	2,22	225	1180,15	1,73	325	2752,55	2,50	425	2131,91	2,28
25	2240,59	2,82	126	1940,03	2,71	226	2139,55	2,36	326	2961,42	2,63	426	1296,47	3,25
26	1097,80	4,37	127	2007,11	2,28	227	2158,23	3,22	327	2528,41	1,73	427	2385,77	2,14
27	2141,25	3,97	128	1657,31	2,93	228	1988,43	2,36	328	1590,23	2,30	428	1796,55	1,75
28	3308,67	1,77	129	1181,85	2,49	229	2030,88	2,90	329	1107,14	2,65	429	1844,09	1,79
29	2709,25	2,66	130	2229,55	1,88	230	1510,42	3,40	330	2794,16	2,00	430	1051,10	2,67
30	1516,37	3,45	131	1565,61	1,68	231	1680,23	2,94	331	2052,10	2,18	431	3442,82	2,42
31	1439,11	2,23	132	1591,08	4,06	232	2619,26	2,57	332	1400,90	1,71	432	2119,18	1,51
32	1574,10	1,37	133	2478,32	2,17	233	1362,69	2,65	333	1495,99	2,16	433	2309,36	3,33
33	1975,69	2,50	134	2768,69	2,08	234	2140,40	2,23	334	3276,41	1,68	434	2026,63	2,69
34	2492,75	3,00	135	2089,46	2,51	235	2055,50	1,87	335	1280,34	2,05	435	2124,27	1,91
35	1266,75	2,28	136	2096,25	2,02	236	1811,83	2,36	336	1669,19	2,67	436	1851,73	2,32
36	1752,40	2,17	137	2614,16	2,44	237	1271,85	2,13	337	1426,37	1,81	437	1305,81	2,27
37	2724,54	3,18	138	2140,40	2,12	238	1934,94	3,31	338	3048,02	1,53	438	2033,43	2,45
38	1538,44	2,40	139	2283,89	2,45	239	1586,84	3,39	339	2576,81	1,88	439	2174,37	1,45
39	1339,77	2,43	140	1940,88	3,22	240	2043,61	2,17	340	1294,77	2,45	440	3266,22	2,69
40	1552,03	2,46	141	2500,39	1,93	241	1740,51	2,57	341	1803,34	2,24	441	2098,80	1,46
41	1389,01	1,87	142	2110,69	2,58	242	2462,19	2,80	342	1597,03	2,32	442	1985,03	2,72
42	3076,03	2,74	143	2398,51	4,16	243	1718,44	2,05	343	1366,09	1,76	443	1323,64	1,64
43	2984,34	2,61	144	1839,00	1,91	244	1792,30	2,90	344	2222,76	2,22	444	1372,03	1,67
44	2061,44	2,66	145	1959,56	2,23	245	2426,53	2,41	345	2721,14	1,89	445	2230,40	2,33
45	1581,74	2,21	146	3533,66	1,61	246	1893,34	2,08	346	2153,99	2,71	446	1295,62	4,22
46	3057,36	2,49	147	1876,36	2,47	247	1814,38	2,38	347	2531,81	2,85	447	1834,75	1,63
47	2286,44	3,01	148	2101,35	2,23	248	2786,52	1,87	348	1977,39	1,44	448	1862,77	2,52
48	2243,99	2,86	149	2891,80	1,79	249	2615,01	2,08	349	1595,33	3,55	449	3662,71	2,85
49	3082,83	3,62	150	2086,92	3,33	250	2041,07	2,61	350	1399,20	5,23	450	1200,53	2,45
50	1808,43	2,04	151	2562,37	2,46	251	3352,82	1,94	351	1532,50	1,53	451	2662,56	2,26
51	1498,54	1,48	152	2709,25	2,97	252	2856,98	1,83	352	2295,78	3,32	452	2289,83	2,07
52	1369,49	1,96	153	2815,38	1,80	253	1547,78	3,37	353	1682,78	1,55	453	2381,53	2,58
53	3269,61	2,39	154	1148,74	2,65	254	2884,15	1,79	354	2540,30	2,13	454	1732,02	2,55
54	1663,25	1,95	155	1916,26	2,04	255	1731,17	1,64	355	1461,18	2,81	455	1406,84	2,48
55	2030,88	1,67	156	1659,00	4,10	256	2847,65	1,66	356	1957,86	1,97	456	1725,23	2,20
56	1884,85	3,97	157	1124,12	2,13	257	2594,63	2,24	357	2511,43	2,77	457	1982,48	1,59
57	3092,17	2,50	158	2549,64	2,00	258	2760,20	1,82	358	1039,21	2,13	458	1384,77	2,34
58	2524,16	2,02	159	1540,99	2,47	259	2002,01	2,37	359	2428,23	2,31	459	2202,38	1,65
59	2146,35	3,74	160	2153,99	2,23	260	1826,26	1,86	360	1866,17	2,42	460	2023,24	2,94
60	3834,22	2,60	161	1568,16	2,86	261	2183,70	1,75	361	734,41	4,66	461	2323,79	1,41
61	1556,27	3,07	162	1746,45	2,34	262	1153,83	2,61	362	1872,96	2,52	462	2211,72	3,04
62	2034,27	3,25	163	2885,85	1,87	263	2503,79	2,10	363	1972,30	1,78	463	1425,52	2,16
63	2317,85	2,88	164	1890,79	1,96	264	2306,81	1,87	364	2338,23	2,95	464	1911,17	1,78
64	2492,75	2,14	165	1877,20	2,19	265	1423,82	2,74	365	1377,98	2,28	465	1795,70	2,68
65	2041,07	2,96	166	1457,78	3,20	266	1261,66	2,87	366	1780,42	3,23	466	1384,77	2,39
66	2627,75	2,93	167	2617,56	3,08	267	1372,03	2,60	367	2061,44	2,89	467	2211,72	1,45
67	2144,65	2,27	168	2686,33	2,29	268	1687,87	2,31	368	1345,71	2,37	468	2165,87	2,62
68	2153,14	3,25	169	2177,76	1,54	269	1815,23	2,69	369	1341,47	2,22	469	2225,31	1,48
69	1415,33	3,66	170	2867,17	2,15	270	2154,84	2,48	370	2017,29	2,01	470	2051,26	2,40
70	1274,39	2,03	171	2193,04	3,82	271	3974,31	2,50	371	2557,28	2,00	471	1942,58	2,16
71	3507,34	3,43	172	2698,22	2,31	272	2758,50	1,85	372	2241,44	2,40	472	1992,67	2,28
72	2149,74	1,85	173	1914,56	1,92	273	1722,68	2,30	373	2311,91	2,74	473	2126,82	2,45
73	2244,83	3,01	174	2992,83	3,28	274	2454,54	2,08	374	1480,71	1,63	474	2338,23	1,78
74	2033,43	3,46	175	2478,32	2,82	275	3206,79	2,05	375	967,04	2,11	475	2030,88	1,81
75	2328,04	1,99	176	3335,84	2,25	276	1908,62	1,87	376	2738,97	2,37	476	2265,21	2,22
76	2800,95	2,77	177	3236,50	2,46	277	1964,65	1,71	377	2156,54	2,84	477	3010,66	2,03
77	2545,39	3,00	178	2354,36	3,03	278	2428,23	1,83	378	2073,33	2,65	478	1606,36	2,33
78	2595,48	2,89	179	1641,17	2,38	279	2047,01	2,17	379	2156,54	2,09	479	2177,76	1,83
79	2951,23	1,91	180	2856,14	2,50	280	1486,65	2,08	380	1452,69	2,41	480	4251,94	1,88
80	1494,29	1,42	181	1973,15	2,18	281	2183,70	3,74	381	1252,32	2,57	481	1482,41	4,34
81	3285,74	2,70	182	3203,39	2,05	282	1667,49	2,62	382	2278,80	1,65	482	1829,66	2,20
82	2519,07	2,20	183	1935,79	1,55	283	1613,16	1,98	383	1707,40	2,81			

M 72h M	ÁREA	REDONDEZ	101	1358,45	3,00	201	1803,34	1,38	301	1677,68	1,89	401	1687,87	2,72
1	1722,68	2,61	102	1522,31	2,07	202	1418,73	4,77	302	1745,61	2,68	402	1175,06	3,10
2	1357,60	2,30	103	1033,27	2,09	203	1273,54	2,48	303	1250,62	3,40	403	1469,67	2,32
3	1247,22	2,18	104	1389,01	2,34	204	1382,22	1,46	304	1295,62	2,15	404	1068,93	2,59
4	943,27	1,86	105	1162,32	2,84	205	1979,94	1,68	305	1284,58	1,79	405	1111,38	2,68
5	1497,69	1,70	106	2420,58	2,32	206	1915,41	1,81	306	1851,73	2,04	406	1188,64	2,34
6	1681,08	2,12	107	1581,74	2,25	207	1211,57	2,04	307	1575,80	2,95	407	1326,18	2,52
7	1351,66	2,93	108	5241,91	4,00	208	2088,61	2,17	308	1820,32	1,33	408	989,12	3,26
8	2362,85	1,83	109	2835,76	3,09	209	2128,52	2,15	309	1500,24	2,26	409	1397,50	2,79
9	1967,20	2,40	110	1483,26	1,90	210	2016,45	1,91	310	1919,66	2,02	410	1834,75	2,17
10	1424,67	2,04	111	1304,11	2,37	211	1302,41	2,60	311	1869,56	3,26	411	1389,86	1,50
11	1288,83	2,12	112	1902,68	2,36	212	1131,76	1,89	312	1567,31	1,97	412	1133,45	2,03
12	1038,36	1,73	113	1327,03	2,35	213	2690,58	1,39	313	1651,36	1,38	413	1820,32	2,01
13	2014,75	2,08	114	2356,91	1,56	214	2515,68	2,61	314	1376,28	2,86	414	1276,94	1,73
14	1857,68	1,84	115	2012,20	2,15	215	1692,97	1,73	315	1760,89	2,18	415	1696,36	2,63
15	1715,04	2,34	116	1599,57	2,98	216	909,31	2,02	316	1593,63	1,71	416	1989,28	1,58
16	1898,43	2,10	117	1805,04	1,72	217	2431,62	1,51	317	1412,79	2,18	417	1213,26	3,03
17	1559,67	2,45	118	1400,90	2,47	218	2297,47	1,61	318	2044,46	1,87	418	1239,58	1,76
18	1254,02	1,40	119	1029,02	1,80	219	2113,24	2,46	319	1740,51	1,94	419	1500,24	2,67
19	1696,36	2,86	120	2297,47	1,84	220	2034,28	1,59	320	1346,56	2,90	420	2432,47	2,32
20	2098,80	2,78	121	2117,48	2,01	221	2094,56	2,21	321	1273,54	2,17	421	1484,95	2,27
21	1753,25	2,13	122	1819,47	1,52	222	2543,69	2,70	322	1374,58	2,26	422	1102,04	2,05
22	959,40	1,91	123	1889,94	1,96	223	1518,91	4,34	323	2118,33	2,42	423	1526,56	2,38
23	1147,89	1,48	124	1785,51	2,48	224	2875,66	1,96	324	1256,56	2,75	424	1022,23	3,05
24	1008,65	2,44	125	1079,97	2,57	225	2184,55	2,12	325	2429,07	2,13	425	1475,61	2,35
25	1549,48	1,73	126	1608,06	2,21	226	2674,44	1,97	326	1657,31	2,28	426	1346,56	1,88
26	1116,47	2,00	127	2418,04	1,78	227	1728,62	2,71	327	1147,04	3,40	427	1264,21	2,22
27	1346,56	2,16	128	1042,61	3,43	228	2620,95	3,61	328	1366,09	1,47	428	1372,88	2,02
28	1197,98	1,62	129	1878,90	2,22	229	1181,00	2,80	329	1192,04	1,71	429	1771,93	1,76
29	2013,90	2,30	130	1594,48	2,74	230	2100,50	2,03	330	1428,07	2,66	430	1833,06	2,06
30	1933,24	2,33	131	2221,06	2,27	231	1899,28	2,98	331	1878,05	2,41	431	1871,26	2,11
31	751,39	2,48	132	2171,82	2,42	232	3908,08	2,44	332	1622,50	1,87	432	1254,02	1,61
32	1454,39	1,70	133	2131,06	1,95	233	900,82	3,06	333	1478,16	1,71	433	1321,94	2,03
33	1417,03	2,01	134	2739,82	2,56	234	2598,88	1,87	334	1526,56	2,57	434	1079,12	1,84
34	1996,07	1,55	135	1630,14	2,18	235	1603,82	2,37	335	1029,02	2,40	435	1009,50	1,92
35	1923,05	1,73	136	2461,34	2,66	236	1495,14	1,90	336	1324,49	1,76	436	934,78	1,57
36	1878,05	1,98	137	797,24	1,47	237	3746,77	2,15	337	853,27	2,41	437	1421,28	1,89
37	1254,87	3,72	138	2024,94	2,14	238	2192,19	2,36	338	1170,81	3,33	438	1865,32	2,07
38	2127,67	1,63	139	1610,61	2,09	239	2474,07	3,30	339	1756,64	1,38	439	1276,09	2,81
39	2205,78	1,87	140	1847,49	2,12	240	2026,63	2,21	340	954,31	2,47	440	1523,16	1,91
40	2579,35	1,79	141	1021,38	2,73	241	1496,84	2,00	341	1857,68	2,25	441	1569,86	2,58
41	1617,40	3,20	142	1920,51	3,40	242	1925,60	2,05	342	1062,99	3,51	442	1186,94	2,31
42	2729,63	1,36	143	2574,26	1,96	243	3211,88	1,63	343	2038,52	1,73	443	1736,27	1,67
43	1578,35	1,99	144	2725,39	1,93	244	2596,33	1,72	344	973,84	3,22	444	1416,18	2,04
44	2000,31	2,40	145	1498,54	3,06	245	2060,60	2,69	345	1757,49	1,71	445	2159,08	1,79
45	2437,56	2,44	146	1494,29	2,65	246	696,20	3,18	346	1884,00	2,33	446	1219,21	2,32
46	1760,04	1,48	147	1694,66	1,69	247	2913,87	2,00	347	2599,73	1,49	447	1031,57	2,05
47	1957,01	1,97	148	2356,06	2,30	248	1460,33	5,15	348	1203,08	2,71	448	1316,85	1,89
48	1554,57	2,51	149	2339,93	1,39	249	2629,45	1,70	349	1400,90	2,03	449	1001,01	1,80
49	1689,57	2,94	150	1488,35	2,43	250	1810,13	2,22	350	1715,04	1,54	450	2047,86	1,89
50	1831,36	2,99	151	1643,72	2,49	251	1505,33	2,10	351	2075,03	2,56	451	1658,16	1,76
51	1552,03	2,09	152	1530,80	2,17	252	1406,84	1,98	352	1186,09	2,92	452	1597,87	1,93
52	1738,81	1,85	153	984,87	2,84	253	733,56	2,43	353	1318,54	1,90	453	1388,16	2,48
53	1636,93	1,73	154	1828,81	2,10	254	1675,14	1,88	354	1606,36	1,84	454	1852,58	2,21
54	1996,07	2,57	155	2296,63	1,79	255	2540,30	1,88	355	978,08	2,52	455	1548,63	1,59
55	1896,73	2,17	156	1420,43	2,82	256	1475,61	3,09	356	2253,32	1,66	456	3381,69	1,60
56	3054,81	2,30	157	1608,91	2,84	257	1735,42	2,87	357	674,13	3,83	457	2009,65	2,19
57	1872,96	3,19	158	2332,28	2,15	258	2413,79	2,28	358	1445,90	1,55	458	1442,50	1,90
58	2052,10	2,41	159	1784,66	2,40	259	1814,38	2,67	359	1121,57	2,53	459	2106,44	2,18
59	1294,77	2,66	160	1962,11	2,00	260	2986,04	2,42	360	2637,94	1,93	460	2478,32	1,91
60	977,23	2,35	161	1816,92	3,01	261	1015,44	2,10	361	2429,07	1,55	461	2114,08	1,58
61	1480,71	2,93	162	2553,03	1,79	262	1834,75	4,26	362	2513,98	1,95	462	1521,46	2,58
62	1526,56	2,47	163	1831,36	2,36	263	915,25	2,33	363	1203,08	2,18	463	1302,41	2,43
63	1545,23	2,18	164	1788,06	2,69	264	2373,89	2,75	364	3941,20	2,27	464	2614,16	1,67
64	1096,10	2,85	165	2007,96	2,35	265	1978,24	2,49	365	2288,14	2,63	465	1760,04	2,00
65	1507,88	2,00	166	2189,65	2,40	266	1586,84	4,44	366	1500,24	2,64	466	1633,53	2,78
66	1975,69	2,62	167	1683,63	2,81	267	1329,58	2,11	367	1905,22	2,76	467	1962,96	2,13
67	2121,73	2,40	168	3301,03	1,96	268	1994,37	1,99	368	2247,38	2,17	468	928,84	2,67
68	1834,75	2,14	169	1321,09	2,12	269	1265,05	1,90	369	1690,42	2,22	469	1506,18	2,88
69	2013,05	3,32	170	1612,31	3,94	270	2041,07	1,93	370	2227,00	2,84	470	709,79	2,24
70	1497,69	1,70	171	3132,07	2,39	271	2192,19	2,14	371	2984,34	2,57	471	1287,13	2,61
71	1757,49	1,96	172	2119,18	1,59	272	1376,28	2,79	372	4974,46	3,34	472	1145,34	2,54
72	1326,18	2,56	173	1957,86	2,88	273	1479,01	2,79	373	1572,40	2,40	473	1200,53	1,70
73	1653,06	2,86	174	2211,72	2,02	274	1779,57	2,37	374	1898,43	2,95	474	1447,60	1,92
74	1526,56	3,07	175	2137,01	1,87	275	2238,89	2,65	375	2248,23	4,12	475	1540,99	2,13
75	1000,16	2,45	176	1244,68	2,66	276	1925,60	1,73	376	2066,54	2,30	476	867,71	2,40
76	1430,61	2,69	177	1457,78	3,19	277	1580,04	3,48	377	1909,47	2,36	477	1429,77	1,90
77	1295,62	2,07	178	2068,24	3,32	278	2308,51	1,99	378	2019,84	2,72	478	1973,15	1,95
78	1452,69	3,14	179	1526,56	1,79	279	1411,94	2,25	379	3638,94	2,64	479	1767,68	2,42
79	2086,91	2,34	180	1648,82	3,49	280	1810,98	2,35	380	2298,32	1,90	480	2006,26	1,60
80	1157,23	4,20	181	2538,60	2,07	281	1618,25	2,55	381	2169,27	2,25	481	2240,59	1,96
81	1310,05	3,14	182	2408,70	3,46	282	1303,26	1,83	382	1739,66	2,59	482	1997,77	2,03
82	2175,21	1,84	183	1914,56	1,86	283	2002,01	3,45	383	2142,10	2,19	483	1875,51	1,82
83														

G 72h	ÁREA	REDONDEZ	101	2697,37	2,06	201	1782,11	1,66	301	1632,68	1,66	401	2926,61	1,76
1	977,23	1,98	102	1718,44	1,91	202	1559,67	2,18	302	2378,13	2,22	402	2814,53	1,92
2	2129,37	1,80	103	2277,10	1,58	203	1930,69	2,79	303	2679,54	1,82	403	1667,49	2,29
3	1113,08	1,98	104	1595,33	2,64	204	1850,88	1,63	304	2902,83	1,83	404	1715,89	2,18
4	1251,47	2,04	105	1559,67	2,24	205	1887,39	2,30	305	2099,65	2,52	405	1573,25	1,74
5	1490,05	1,95	106	1678,53	2,76	206	1406,84	1,65	306	1704,85	2,43	406	1298,17	1,25
6	1039,21	1,79	107	2845,10	1,82	207	2876,51	1,64	307	1517,22	2,62	407	1912,86	2,36
7	1907,77	2,12	108	2506,34	2,11	208	2185,40	2,24	308	2576,81	3,24	408	2293,23	2,22
8	2255,87	1,87	109	959,40	3,80	209	2648,97	1,69	309	2407,00	1,74	409	2472,37	1,88
9	1829,66	2,87	110	1647,12	2,11	210	1194,59	1,67	310	2773,78	1,74	410	2895,19	2,16
10	1023,08	1,75	111	1551,18	2,00	211	1882,30	2,43	311	1799,09	1,61	411	2058,05	1,53
11	1309,20	2,13	112	2325,49	2,03	212	1172,51	2,73	312	2247,38	1,82	412	1883,15	1,71
12	1524,01	1,40	113	1379,67	1,83	213	1720,98	2,93	313	1810,98	1,90	413	2217,67	1,91
13	1317,69	1,53	114	1242,98	1,90	214	2479,17	1,57	314	1558,82	3,13	414	1245,53	1,80
14	1266,75	2,12	115	1959,56	1,92	215	1306,66	1,45	315	1386,47	2,21	415	1609,76	2,49
15	2134,46	2,04	116	1085,91	1,51	216	1769,38	4,02	316	1802,49	1,87	416	1251,47	2,40
16	2260,12	1,69	117	1499,39	1,45	217	1356,75	2,07	317	2041,92	2,96	417	1520,61	2,16
17	1872,11	1,86	118	1498,54	2,11	218	1743,91	3,17	318	2441,81	1,83	418	1321,94	4,01
18	2415,49	1,86	119	1558,82	2,07	219	1565,61	2,55	319	3000,47	1,87	419	1958,71	2,72
19	1255,72	1,43	120	1051,95	1,68	220	1945,98	4,49	320	2291,53	1,86	420	3361,31	2,71
20	1236,19	1,94	121	1891,64	1,24	221	1665,80	3,51	321	1676,83	1,96	421	1822,87	2,22
21	1187,79	2,01	122	2123,42	2,43	222	2443,51	2,53	322	3116,79	3,00	422	1760,89	2,29
22	939,88	2,15	123	1870,41	2,76	223	1857,68	2,13	323	1429,77	1,78	423	1486,65	3,56
23	2563,22	1,36	124	1656,46	1,57	224	1203,08	5,14	324	2183,70	2,09	424	1753,25	2,92
24	1990,13	1,63	125	1569,01	1,88	225	1642,02	2,12	325	1736,27	2,09	425	2120,03	2,18
25	718,28	2,83	126	2231,25	1,85	226	1790,60	1,82	326	1850,04	2,13	426	1420,43	2,80
26	955,16	3,41	127	1780,42	2,12	227	1799,09	1,67	327	2863,78	1,95	427	1428,07	1,84
27	1489,20	2,53	128	1292,22	2,04	228	1382,22	1,54	328	1887,39	2,15	428	1577,50	2,48
28	1552,88	2,35	129	1868,71	1,81	229	2246,53	2,04	329	1972,30	1,97	429	3613,47	1,98
29	1430,62	1,84	130	1479,01	1,88	230	1445,90	3,06	330	1688,72	2,50	430	1932,39	1,39
30	1614,85	1,34	131	1515,52	1,66	231	3052,26	2,00	331	1424,67	3,03	431	1414,48	2,39
31	1434,86	2,91	132	1148,74	2,55	232	1975,69	2,50	332	1993,52	2,80	432	1905,22	1,59
32	1366,94	2,30	133	1184,40	1,47	233	1705,70	2,49	333	2046,16	2,22	433	2092,86	2,15
33	1468,82	1,98	134	2271,15	1,43	234	1931,54	2,08	334	2088,61	2,29	434	1230,24	4,29
34	1248,07	4,81	135	1275,24	1,93	235	1651,36	2,72	335	2112,39	1,96	435	1194,59	2,42
35	2082,67	1,52	136	2291,53	1,83	236	1763,43	2,76	336	1469,67	1,49	436	1346,56	2,02
36	1506,18	2,58	137	2303,42	1,84	237	973,84	1,65	337	1642,02	2,15	437	1730,32	2,06
37	1781,26	1,95	138	1618,25	1,86	238	1000,16	2,28	338	2789,06	2,77	438	1715,04	2,10
38	1306,66	1,51	139	660,55	3,35	239	1485,80	4,52	339	2580,20	1,97	439	2446,05	3,39
39	1997,77	2,05	140	1659,85	2,31	240	1222,60	4,54	340	1464,58	1,77	440	1989,28	2,11
40	2039,37	2,20	141	1800,79	1,64	241	1183,55	4,58	341	1653,06	1,93	441	3085,37	1,23
41	1090,15	1,81	142	530,64	3,07	242	3065,85	2,93	342	2034,28	1,56	442	1310,90	2,58
42	1924,75	2,05	143	1427,22	1,84	243	2146,35	1,49	343	1580,04	2,36	443	1949,37	1,59
43	1636,93	1,64	144	1287,13	1,72	244	1010,35	2,45	344	5017,77	3,79	444	3053,11	1,68
44	1302,41	1,60	145	2083,52	2,35	245	1599,57	1,92	345	2578,50	2,21	445	2209,18	1,66
45	2193,04	1,98	146	1101,19	1,82	246	1456,09	3,40	346	2035,12	1,63	446	2449,45	2,17
46	1102,04	2,29	147	2737,27	1,89	247	2935,94	2,02	347	3059,05	1,65	447	1555,42	1,47
47	2162,48	2,23	148	1776,17	1,60	248	1973,15	2,45	348	2640,48	2,07	448	1379,67	2,28
48	1592,78	3,17	149	1689,57	1,50	249	1389,01	1,78	349	2505,49	1,90	449	2024,94	1,81
49	2474,92	1,76	150	1446,75	1,70	250	967,04	2,77	350	1402,60	3,76	450	2213,42	1,83
50	2075,88	1,74	151	1778,72	1,84	251	2398,51	1,49	351	1958,71	2,18	451	1557,97	1,88
51	993,36	1,78	152	1807,58	1,45	252	2004,56	2,02	352	1800,79	2,46	452	2292,38	1,86
52	1002,70	2,41	153	1864,47	1,62	253	1576,65	2,80	353	2184,55	3,44	453	1614,01	2,40
53	2036,82	2,33	154	2682,93	1,98	254	2952,93	2,05	354	2425,68	2,99	454	2249,08	1,93
54	1659,00	3,04	155	1648,82	1,93	255	1104,59	3,22	355	2057,20	2,01	455	1251,47	1,82
55	1501,93	1,77	156	1383,07	2,03	256	2693,12	2,15	356	1434,86	2,08	456	1417,88	2,03
56	1694,66	2,23	157	1968,90	1,60	257	2728,78	2,47	357	2524,17	1,61	457	1839,00	2,46
57	1280,34	1,78	158	1716,74	2,45	258	1649,66	1,59	358	1488,35	3,03	458	2002,01	2,25
58	2443,51	1,51	159	1160,62	1,46	259	1352,50	3,36	359	2476,62	1,79	459	930,54	1,97
59	2235,50	1,93	160	1487,50	1,90	260	1523,16	2,40	360	2527,56	2,57	460	2803,50	1,65
60	2005,41	2,14	161	2536,90	1,43	261	1588,53	1,90	361	2411,24	1,39	461	1605,52	1,35
61	1490,05	2,52	162	3100,66	1,69	262	2104,74	2,43	362	2588,69	2,78	462	1355,90	3,11
62	1663,25	1,75	163	1289,68	3,77	263	1035,82	2,57	363	1717,59	1,81	463	1213,26	1,49
63	2930,00	1,48	164	1673,44	1,61	264	2289,83	1,46	364	1973,99	1,75	464	1444,20	2,04
64	1308,35	3,63	165	2468,13	1,72	265	3734,88	2,18	365	2570,86	1,50	465	2366,25	1,64
65	1052,80	2,35	166	2007,11	2,05	266	1137,70	2,22	366	1298,17	2,06	466	1141,95	2,51
66	2422,28	2,04	167	1515,52	3,32	267	1659,00	1,96	367	3100,66	2,02	467	1703,15	1,54
67	1069,78	2,15	168	2525,86	1,96	268	1223,45	1,89	368	1882,30	1,75	468	1526,56	1,88
68	1908,62	2,22	169	2036,82	3,30	269	1301,56	3,23	369	1181,00	4,53	469	1373,73	2,39
69	1455,24	1,84	170	2097,95	1,91	270	1952,77	3,15	370	3817,24	2,08	470	1167,42	2,58
70	1260,81	2,67	171	2112,39	2,31	271	2553,88	3,58	371	1444,20	2,14	471	902,52	2,66
71	1837,30	1,69	172	2353,51	1,70	272	2423,13	1,90	372	1687,02	2,57	472	2994,53	2,79
72	1551,18	2,46	173	1177,60	2,00	273	2486,81	2,52	373	2026,63	1,81	473	2418,89	2,62
73	1713,34	2,02	174	1524,01	2,35	274	2920,66	2,17	374	1874,66	2,96	474	1865,32	1,94
74	1340,62	1,98	175	1550,33	1,45	275	2576,81	1,98	375	1764,28	1,67	475	1616,55	3,04
75	2139,55	1,56	176	1365,24	1,61	276	1719,29	1,46	376	2788,21	2,82	476	1073,17	2,38
76	2140,40	2,09	177	2225,31	2,04	277	3210,18	1,68	377	2011,35	1,95	477	1200,53	2,61
77	1777,87	3,52	178	2054,65	1,78	278	1834,75	2,90	378	1082,51	3,73	478	2378,98	1,99
78	2424,83	1,59	179	1630,99	1,99	279	1796,55	2,05	379	2137,86	1,96	479	2134,46	2,73
79	1422,13	2,00	180	1576,65	1,99	280	3291,69	1,79	380	1994,37	5,68	480	2758,50	1,93
80	1648,82	1,95	181	2415,49	1,56	281	2025,78	1,97	381	1972,30	2,79	481	2303,42	2,18
81	1469,67	1,85	182	1279,49	2,35	282	1929,84	1,96	382	3238,20	3,21	482	2203,23	2,39
82	1276,94	2,19	183	1151,28	1,82	283	2637,09	1,90	383	1516,37	2,08	483		

G 72h M	ÁREA	REDONDEZ	101	2567,47	2,29	201	1528,25	1,84	301	1676,83	3,49	401	2198,99	4,02
1	1415,33	1,94	102	2320,40	2,56	202	1220,06	1,90	302	1179,30	2,42	402	1741,36	3,40
2	1434,01	1,76	103	954,31	2,27	203	1785,51	2,49	303	1632,68	2,19	403	1878,05	2,00
3	1375,43	2,07	104	1793,15	1,58	204	1405,99	2,29	304	1278,64	2,28	404	2148,89	3,47
4	977,23	2,29	105	1216,66	1,57	205	1022,23	2,16	305	2672,75	2,34	405	2085,22	1,63
5	2995,38	1,49	106	1672,59	2,02	206	1224,30	1,95	306	1964,65	1,93	406	2664,26	2,56
6	1405,14	2,54	107	1436,56	1,56	207	1175,06	2,45	307	2246,53	1,66	407	2049,56	2,39
7	1535,05	3,68	108	2235,50	2,97	208	2108,14	2,24	308	1984,18	2,63	408	953,46	3,17
8	1134,30	2,33	109	1302,41	2,73	209	1729,47	2,46	309	1875,51	2,22	409	2648,12	3,49
9	1829,66	2,20	110	1383,92	1,79	210	1248,07	2,51	310	1544,38	2,22	410	1034,12	2,95
10	1930,69	1,66	111	1113,08	3,29	211	2184,55	1,89	311	1258,26	2,03	411	3449,61	2,85
11	968,74	2,32	112	1613,16	2,23	212	1577,50	1,99	312	1591,08	1,93	412	1912,02	2,61
12	939,88	2,02	113	1555,42	2,06	213	1114,78	4,00	313	1216,66	2,34	413	2179,46	2,45
13	1141,95	3,79	114	1590,23	2,69	214	1581,74	2,29	314	1624,19	2,24	414	1593,63	2,28
14	2800,10	1,63	115	2064,84	1,42	215	1656,46	2,23	315	1448,44	2,26	415	1667,49	2,44
15	1227,70	2,60	116	1383,92	1,46	216	1227,70	3,07	316	837,14	1,97	416	1533,35	2,31
16	2104,74	2,53	117	1289,68	1,22	217	2106,44	2,99	317	1387,31	1,98	417	2185,40	2,25
17	1634,38	1,60	118	1668,34	1,52	218	2648,12	1,67	318	1614,85	2,02	418	1872,11	2,45
18	2225,31	1,66	119	2218,51	1,61	219	1532,50	2,08	319	1475,61	2,14	419	1999,47	1,56
19	1557,97	2,02	120	1546,93	1,69	220	1531,65	3,61	320	1197,98	2,00	420	1377,13	1,78
20	2339,08	1,64	121	1704,85	2,07	221	2159,08	2,42	321	2092,86	2,21	421	1130,91	2,26
21	3067,54	1,60	122	1624,19	1,82	222	1407,69	2,32	322	2114,93	2,11	422	1630,99	2,09
22	1255,72	2,17	123	2140,40	1,72	223	2420,58	1,90	323	1983,33	1,95	423	1648,82	1,63
23	1552,88	2,16	124	2768,69	1,37	224	2135,31	2,10	324	1721,83	1,96	424	1022,23	1,75
24	1504,48	2,36	125	2989,43	1,80	225	1685,32	3,56	325	1429,77	2,51	425	1278,64	1,86
25	1616,55	2,67	126	1265,05	1,21	226	1414,48	2,89	326	1175,91	1,91	426	2418,89	2,22
26	1487,50	2,02	127	1023,08	1,97	227	993,36	2,63	327	1388,16	2,45	427	2661,71	1,96
27	1713,34	2,53	128	1639,48	1,27	228	3149,05	3,70	328	1424,67	1,95	428	999,31	1,62
28	1490,05	2,86	129	1349,11	1,70	229	2695,67	1,91	329	2094,56	2,32	429	1988,43	1,99
29	1652,21	2,14	130	1991,82	1,28	230	1665,80	1,83	330	1441,65	1,78	430	1233,45	2,79
30	3003,02	2,24	131	1822,02	1,28	231	1307,51	2,44	331	1768,53	1,51	431	1858,53	2,14
31	1239,58	3,39	132	1675,14	1,48	232	2116,63	3,20	332	1651,36	2,43	432	1859,38	2,01
32	1238,73	1,89	133	1132,61	1,48	233	1900,13	3,01	333	490,74	2,75	433	2000,31	2,48
33	1514,67	3,90	134	1405,99	1,12	234	1833,90	1,58	334	1387,31	1,72	434	1788,91	1,71
34	2127,67	1,50	135	1306,66	1,88	235	1767,68	2,37	335	1640,33	3,78	435	894,88	2,29
35	2031,73	1,80	136	1201,38	2,93	236	1520,61	2,00	336	1857,68	2,82	436	1068,08	1,78
36	1469,67	2,81	137	1137,70	1,67	237	1403,45	2,19	337	1537,59	1,97	437	2361,15	1,62
37	1957,01	2,13	138	2439,26	1,28	238	1587,69	2,78	338	995,06	2,27	438	1614,85	1,55
38	1551,18	2,56	139	1473,92	1,96	239	1059,59	2,50	339	967,89	2,94	439	2293,23	1,84
39	652,05	3,10	140	1548,63	2,01	240	1475,61	1,84	340	1320,24	2,83	440	3003,02	1,50
40	1514,67	1,85	141	1484,10	1,39	241	2256,72	3,25	341	2407,00	1,67	441	1531,65	1,92
41	2265,21	2,38	142	1036,67	1,67	242	1039,21	3,68	342	1163,17	1,85	442	1590,23	1,53
42	1999,47	1,60	143	1465,43	2,03	243	1541,84	1,80	343	2252,48	1,55	443	1560,52	1,55
43	1315,15	1,98	144	957,71	1,58	244	1332,98	2,62	344	1034,12	2,00	444	2154,84	1,54
44	2596,33	1,48	145	1056,19	1,76	245	1127,51	1,99	345	1518,91	2,26	445	1842,39	1,46
45	2177,76	2,46	146	1892,49	1,52	246	1225,15	1,77	346	2370,49	2,40	446	2738,12	2,36
46	1309,20	2,09	147	1853,43	1,45	247	1782,96	2,02	347	1423,82	2,07	447	2038,52	2,38
47	1762,59	2,71	148	2063,99	2,04	248	1553,72	1,96	348	1217,51	2,17	448	2373,89	1,38
48	1230,24	3,16	149	699,60	1,85	249	1304,96	2,09	349	1791,45	1,87	449	1445,05	2,08
49	1777,02	2,44	150	1552,88	1,80	250	1225,15	3,25	350	2166,72	1,51	450	2304,27	1,68
50	2076,73	1,94	151	2148,89	2,46	251	1394,96	2,04	351	2137,01	1,66	451	2123,42	2,11
51	1895,03	2,17	152	1216,66	2,60	252	2367,09	1,83	352	1069,78	1,74	452	1133,45	2,35
52	2301,72	2,47	153	1282,88	1,65	253	2671,05	1,92	353	1901,83	2,29	453	1254,02	2,09
53	1981,64	2,46	154	2418,04	2,84	254	2665,10	2,06	354	1781,26	2,19	454	3812,99	2,31
54	1449,29	3,62	155	3138,01	1,69	255	2120,88	1,92	355	1594,48	1,93	455	1846,64	1,72
55	2575,11	2,18	156	1815,23	1,48	256	1223,45	2,43	356	1262,51	2,97	456	1580,89	1,76
56	1800,79	1,60	157	1283,73	2,38	257	1118,17	1,78	357	1954,47	2,22	457	1544,39	1,86
57	1154,68	1,48	158	1313,45	3,54	258	1535,05	2,12	358	1442,50	1,85	458	1158,93	3,00
58	1954,47	2,17	159	1280,34	1,80	259	2654,07	1,47	359	1551,18	2,35	459	824,41	2,69
59	2795,85	2,32	160	1147,89	2,50	260	1959,56	1,82	360	1018,84	2,15	460	1181,00	1,99
60	2294,93	1,79	161	1528,25	2,04	261	1814,38	2,50	361	1372,03	2,16	461	1234,49	2,41
61	1057,89	2,35	162	1198,83	1,86	262	1593,63	3,13	362	1725,23	2,00	462	1023,93	2,04
62	1542,69	2,55	163	1355,05	1,74	263	1308,35	2,11	363	1813,53	1,91	463	1630,99	2,19
63	1758,34	2,35	164	1918,81	1,54	264	1201,38	1,61	364	1114,78	2,17	464	1328,73	2,74
64	1459,48	1,62	165	2322,95	1,85	265	1101,19	2,00	365	1609,76	1,68	465	1169,11	1,92
65	1505,33	1,96	166	1235,34	2,42	266	1058,74	1,72	366	1278,64	1,98	466	1232,79	2,43
66	1468,82	2,41	167	1182,70	1,87	267	1855,98	2,54	367	1872,11	2,02	467	1422,97	2,30
67	1299,86	2,10	168	1205,62	1,80	268	1275,24	3,81	368	686,02	2,42	468	1398,35	1,97
68	922,90	3,14	169	2428,23	2,19	269	1822,02	1,92	369	2279,64	2,20	469	2305,96	2,06
69	1485,80	2,53	170	1318,54	1,98	270	2086,92	2,52	370	1201,38	1,88	470	1215,81	2,05
70	1360,15	2,57	171	1099,49	2,76	271	2123,42	2,42	371	1276,94	2,25	471	1077,42	2,71
71	1293,92	2,49	172	1823,72	2,32	272	2175,21	2,48	372	1893,34	2,30	472	1177,60	3,16
72	1501,08	4,03	173	2069,93	2,01	273	1401,75	2,43	373	1259,11	2,22	473	996,76	1,64
73	2046,16	2,01	174	1508,73	1,69	274	1736,27	2,06	374	1186,94	2,04	474	1593,33	2,35
74	1362,69	2,76	175	1980,79	2,07	275	1632,68	2,60	375	1895,03	2,29	475	703,00	3,10
75	984,03	1,83	176	1703,15	2,24	276	1279,49	2,26	376	1253,17	2,70	476	1718,44	2,69
76	1210,72	3,04	177	1955,32	1,69	277	1962,11	2,18	377	1504,48	1,98	477	822,71	3,38
77	1460,33	2,30	178	911,01	1,68	278	1394,11	2,51	378	1259,96	2,92	478	1895,03	2,19
78	2697,37	3,25	179	1394,11	2,70	279	1696,36	1,84	379	1153,83	1,88	479	1779,57	1,50
79	994,21	1,69	180	1867,87	1,90	280	2345,87	2,08	380	1810,98	2,25	480	2302,57	2,21
80	1298,17	2,53	181	2205,78	1,60	281	1688,72	2,60	381	1936,64	2,03	481	935,63	2,47
81	991,67	1,51	182	1831,36	2,15	282	1788,91	2,23	382	1214,11	1,98	482	1417,03	2,17
82	1316,00	2,10	183	1058,74	2,46	283	1688,72	2,21	383	1912,86	1,94	483	1644,57	1,75
83	1928													

GF 72h	ÁREA	REDONDEZ	101	1286,28	1,79	201	1329,58	3,38	301	680,92	2,81	401	1926,45	1,80
1	1637,78	1,99	102	2062,29	2,97	202	2395,96	2,12	302	1816,07	1,94	402	2892,64	2,63
2	1367,79	2,59	103	2371,34	1,55	203	1830,51	2,12	303	1321,94	1,75	403	1709,10	3,56
3	1913,71	1,65	104	1332,98	1,68	204	2297,47	2,74	304	1702,30	1,59	404	1994,37	1,82
4	1613,16	2,85	105	1605,51	2,59	205	1074,02	2,22	305	2030,88	3,18	405	1942,58	2,86
5	1188,64	1,92	106	1749,85	1,66	206	1730,32	2,84	306	3466,59	2,00	406	2721,14	3,29
6	1295,62	1,62	107	1949,37	2,04	207	2727,08	2,01	307	1843,24	3,49	407	2713,50	1,64
7	2040,22	1,88	108	1091,00	1,92	208	1658,16	2,99	308	1214,11	2,94	408	1710,80	3,79
8	2221,91	1,82	109	1527,40	2,12	209	1782,11	1,86	309	1867,02	2,09	409	1809,28	3,34
9	2356,91	1,85	110	1214,96	2,14	210	1495,14	3,02	310	2154,84	2,43	410	2022,39	1,90
10	1560,52	2,36	111	1845,79	1,80	211	1198,83	2,29	311	2677,84	1,96	411	2010,50	2,33
11	1077,42	1,48	112	1194,58	2,62	212	1822,87	4,92	312	1808,43	1,96	412	2293,23	1,52
12	2401,06	2,31	113	1489,20	1,59	213	961,95	1,49	313	1388,16	2,39	413	867,71	2,51
13	1643,72	2,39	114	1772,77	1,95	214	2117,48	3,12	314	1082,51	1,84	414	1440,80	1,53
14	1754,10	2,00	115	1820,32	2,83	215	1580,89	2,68	315	849,03	3,37	415	1031,57	2,94
15	2186,25	2,26	116	2069,93	2,20	216	1973,99	1,96	316	1423,82	2,10	416	2172,67	4,59
16	1733,72	1,70	117	1914,56	2,54	217	1274,39	2,77	317	1595,33	1,87	417	1018,84	2,95
17	1782,96	1,89	118	1490,05	1,53	218	2215,97	2,16	318	1490,05	1,56	418	2058,05	2,82
18	1379,67	1,54	119	1065,53	1,44	219	1090,15	3,71	319	1608,06	2,40	419	1900,13	3,58
19	1937,49	3,15	120	1944,28	3,02	220	1207,32	2,31	320	741,20	2,33	420	2968,21	2,08
20	2822,17	1,16	121	1645,42	2,47	221	1514,67	1,60	321	1639,48	1,58	421	1184,40	2,50
21	1366,09	2,42	122	2071,63	2,96	222	2555,58	2,05	322	1878,05	1,98	422	2509,73	1,51
22	940,72	1,73	123	1858,53	2,57	223	1959,56	1,65	323	1382,22	2,10	423	1547,78	1,61
23	1528,25	2,65	124	1468,82	2,35	224	1151,28	2,81	324	1697,21	2,15	424	1068,93	2,14
24	2560,67	2,17	125	1688,72	2,40	225	1540,99	1,81	325	1886,54	3,66	425	1084,21	2,43
25	1847,49	2,90	126	2428,23	1,96	226	1746,45	2,98	326	2234,65	2,82	426	2058,90	2,45
26	1456,09	2,09	127	1733,72	2,03	227	1880,60	2,53	327	1468,82	2,56	427	1389,86	2,26
27	2271,15	2,63	128	2564,92	2,13	228	1552,03	1,62	328	1044,31	2,66	428	1803,34	2,13
28	1601,27	1,92	129	3276,41	2,72	229	2237,19	1,97	329	2294,93	2,77	429	738,66	1,94
29	1040,06	2,83	130	2172,67	2,33	230	1927,30	3,20	330	1248,07	2,63	430	1944,28	3,02
30	1388,16	2,25	131	1008,65	3,01	231	1406,84	1,73	331	1515,52	2,32	431	1979,94	2,60
31	1678,53	2,05	132	3050,56	2,75	232	1157,23	2,33	332	2362,85	1,77	432	1338,92	2,86
32	1642,87	2,05	133	1802,49	2,15	233	2542,84	2,47	333	1138,55	1,95	433	1405,99	2,40
33	1130,91	2,34	134	3340,93	2,03	234	2168,42	2,72	334	1597,87	1,68	434	1402,60	2,74
34	2125,12	2,24	135	1915,41	3,67	235	1189,49	2,52	335	2086,07	1,51	435	1840,70	2,35
35	1455,24	1,88	136	2255,87	2,37	236	1933,24	2,13	336	1034,12	1,68	436	2035,12	2,42
36	1659,00	1,70	137	1656,46	1,60	237	1546,08	1,81	337	952,61	2,49	437	2551,33	1,79
37	1340,62	3,13	138	1749,00	2,26	238	1731,17	2,04	338	1326,18	2,24	438	1809,28	1,75
38	1175,91	2,15	139	1355,05	1,81	239	1535,05	3,28	339	1205,62	1,92	439	1917,11	2,58
39	1555,42	1,64	140	1687,02	2,88	240	2013,90	2,75	340	1333,83	2,49	440	1973,15	1,90
40	1515,52	2,53	141	1946,83	2,33	241	1490,05	1,37	341	1550,33	2,46	441	979,78	1,90
41	1535,05	1,83	142	1688,72	2,26	242	1412,79	1,63	342	1213,26	2,15	442	1400,05	1,80
42	1285,43	2,14	143	2636,24	4,49	243	1593,63	2,58	343	3198,29	2,11	443	1184,40	2,27
43	2485,11	2,06	144	2132,76	1,76	244	1506,18	2,01	344	1144,49	2,74	444	1549,48	1,93
44	1720,98	3,20	145	1296,47	2,49	245	1588,53	2,83	345	828,65	4,35	445	1677,68	2,28
45	1388,16	2,03	146	1776,17	3,01	246	2104,74	2,23	346	1360,15	2,96	446	1471,37	2,22
46	1856,83	1,79	147	2063,14	1,98	247	1017,14	2,57	347	2097,10	3,20	447	1288,83	1,64
47	1085,91	2,18	148	1479,01	2,21	248	2007,11	2,09	348	1821,17	1,70	448	1866,17	2,39
48	1051,95	1,44	149	1709,10	2,06	249	1314,30	2,46	349	1459,48	1,50	449	2621,80	1,78
49	1462,03	2,07	150	1335,52	2,80	250	3272,16	2,37	350	1079,97	3,23	450	1421,28	2,46
50	1237,89	2,28	151	2245,68	2,88	251	2066,54	1,72	351	984,87	3,74	451	1509,57	3,98
51	2105,59	2,43	152	1404,30	2,55	252	1850,04	3,51	352	1567,31	4,68	452	2936,79	1,93
52	1171,66	2,17	153	2431,62	1,90	253	2557,28	2,34	353	607,06	2,75	453	1109,68	1,73
53	1595,33	2,61	154	1151,28	3,24	254	1762,59	2,08	354	1190,34	3,24	454	2092,01	2,09
54	1014,59	3,35	155	2045,31	3,18	255	1020,53	2,05	355	919,50	2,32	455	3247,54	2,25
55	1618,25	2,62	156	2474,07	1,90	256	2031,73	2,38	356	1985,03	3,01	456	1226,00	1,87
56	1366,94	1,61	157	2112,39	1,60	257	1501,93	3,03	357	1495,14	2,58	457	1410,24	1,69
57	1152,98	2,08	158	1972,30	1,80	258	1907,77	2,10	358	1720,13	2,16	458	1799,94	1,89
58	973,84	2,73	159	2067,39	2,39	259	1695,51	1,58	359	1333,83	4,75	459	1067,23	2,61
59	1492,59	2,07	160	2049,56	1,99	260	1370,33	2,36	360	1372,88	2,56	460	1351,66	3,69
60	1648,82	2,15	161	2213,42	1,70	261	2182,01	3,04	361	1245,53	2,35	461	1141,10	1,89
61	1219,21	3,96	162	1281,19	2,90	262	2251,63	2,52	362	1724,38	3,05	462	1445,05	1,40
62	1324,49	3,23	163	1473,07	2,38	263	1642,87	1,58	363	1175,91	2,85	463	1949,37	2,26
63	1646,27	2,45	164	2072,48	1,87	264	2271,15	1,75	364	1212,41	2,03	464	617,24	2,30
64	1597,87	3,07	165	1597,87	3,06	265	2860,38	1,47	365	1215,81	2,46	465	1131,76	3,28
65	1262,51	2,44	166	1878,90	1,71	266	1681,93	2,09	366	1873,81	4,17	466	826,95	2,07
66	3104,05	2,54	167	1834,75	3,79	267	944,12	2,12	367	982,33	2,29	467	1839,00	2,40
67	1344,86	2,62	168	2093,71	3,06	268	1238,73	2,77	368	1076,57	4,46	468	1836,45	1,69
68	2238,89	3,06	169	1417,03	2,34	269	1362,69	2,06	369	1254,02	1,48	469	1740,00	1,94
69	723,37	3,44	170	1782,96	3,21	270	967,04	2,30	370	1259,11	2,50	470	1420,43	1,85
70	1637,78	1,61	171	1185,25	4,02	271	1167,42	2,48	371	1468,82	1,67	471	868,56	2,36
71	2086,07	1,87	172	2346,72	1,50	272	1607,21	2,39	372	1040,06	1,74	472	1210,72	2,68
72	1218,36	2,07	173	2350,96	2,84	273	1282,04	2,38	373	1878,05	3,62	473	1741,36	2,12
73	1102,04	2,49	174	1863,62	2,05	274	1169,11	3,34	374	837,14	2,09	474	1688,72	2,53
74	2177,76	1,76	175	1876,36	1,93	275	1303,26	1,93	375	2216,82	2,02	475	1794,00	2,17
75	2256,72	2,53	176	1552,88	1,84	276	1482,41	2,53	376	2272,85	1,98	476	1673,44	2,44
76	1724,38	2,03	177	1928,15	3,12	277	1513,82	2,09	377	1813,53	1,53	477	1110,53	2,73
77	1461,18	2,37	178	1930,69	2,47	278	1259,96	2,76	378	1820,32	1,41	478	1757,49	1,70
78	2112,39	1,90	179	1272,70	2,65	279	1799,94	2,27	379	2062,29	4,05	479	1191,19	1,86
79	2113,24	2,30	180	1379,67	2,86	280	1515,52	3,33	380	1574,95	2,52	480	1175,06	3,03
80	1313,45	2,72	181	801,48	2,68	281	797,24	2,61	381	750,54	1,79	481	1515,52	1,50
81	2446,05	1,98	182	1917,96	2,30	282	1425,52	1,99	382	1743,91	2,04	482	1422,97	1,60
82	1434,01	1,90	183	1425,52	2,68	283	1211,57	2,59	383	1422,13	1,73	483	1909,47	2,47
83	132													

GF	72h	M <sup>2</sup>	ÁREA	REDONDEZ	101	1732,02	3,76	201	1406,84	1,62	301	1623,34	2,00	401	1257,41	3,72
1	2027,48	2,84	102	2449,45	1,78	202	1157,23	3,07	302	483,95	2,06	402	607,06	2,59		
2	1639,48	2,75	103	1409,39	2,58	203	1131,76	3,47	303	845,63	2,81	403	1625,04	1,52		
3	764,13	2,68	104	1233,64	4,68	204	1371,18	1,99	304	1487,50	3,76	404	1704,85	1,72		
4	837,14	1,42	105	1361,84	3,81	205	1109,68	2,39	305	3302,73	1,60	405	775,16	3,82		
5	1878,05	4,41	106	1179,30	2,79	206	1462,03	2,58	306	1426,37	1,74	406	517,06	2,24		
6	1303,26	3,04	107	1001,86	2,38	207	1406,84	1,47	307	1777,02	3,53	407	1012,89	1,93		
7	1221,75	1,77	108	1490,05	2,80	208	2681,24	1,69	308	1310,05	3,82	408	830,35	2,17		
8	1304,96	5,23	109	1414,48	2,17	209	1681,08	3,80	309	1240,43	1,97	409	1794,85	2,29		
9	1376,28	2,56	110	1358,45	2,65	210	2474,92	1,79	310	1500,24	5,38	410	2325,49	3,39		
10	3443,66	3,28	111	1940,88	2,73	211	2372,19	2,55	311	1277,79	2,59	411	685,17	5,26		
11	1002,70	2,32	112	634,23	3,44	212	2941,04	2,02	312	1563,91	2,63	412	1319,39	2,63		
12	973,84	2,50	113	1017,99	2,64	213	1477,31	2,64	313	1252,32	1,69	413	1271,00	1,70		
13	676,68	2,35	114	1780,42	5,17	214	1097,80	2,46	314	1881,45	1,64	414	1235,34	2,51		
14	1001,01	2,08	115	1101,19	2,18	215	1321,94	3,80	315	1821,17	3,14	415	1356,75	1,34		
15	1178,45	1,65	116	1064,68	3,34	216	2750,86	2,05	316	531,49	3,03	416	847,33	2,37		
16	2890,10	1,57	117	966,20	2,28	217	841,39	5,48	317	2296,63	2,24	417	1280,34	2,08		
17	1083,36	2,20	118	1490,05	1,70	218	1487,50	1,80	318	861,77	1,62	418	1645,42	2,86		
18	1517,22	2,08	119	754,79	2,34	219	2586,14	1,51	319	1126,66	2,83	419	1285,43	2,27		
19	1475,61	2,01	120	1369,49	2,21	220	1000,16	3,04	320	1242,13	2,31	420	771,77	2,07		
20	713,18	2,36	121	720,83	4,37	221	1557,97	1,74	321	1154,68	2,47	421	1008,65	2,87		
21	796,39	2,36	122	602,81	3,48	222	1206,47	1,57	322	1585,99	1,57	422	1928,15	1,67		
22	844,78	1,76	123	1793,15	2,80	223	1612,31	2,26	323	1436,56	2,60	423	2126,82	1,63		
23	1463,73	1,61	124	1653,06	1,87	224	1697,21	2,00	324	2350,96	1,53	424	2159,93	3,84		
24	1603,82	1,90	125	1095,25	3,16	225	1788,06	2,03	325	2047,86	2,09	425	1983,33	2,41		
25	958,55	1,45	126	1978,24	2,58	226	1720,98	3,42	326	1550,33	1,91	426	1640,33	6,96		
26	1058,74	2,54	127	1491,75	3,61	227	1085,06	2,16	327	1199,68	1,33	427	2159,08	1,88		
27	2645,58	2,33	128	1705,70	2,49	228	1255,72	1,75	328	1694,66	2,20	428	1466,27	2,04		
28	1058,74	1,59	129	1063,83	2,26	229	1313,45	2,72	329	1712,49	2,12	429	1670,89	2,25		
29	1033,27	2,23	130	1619,10	1,78	230	1765,13	1,51	330	1856,83	2,65	430	985,72	2,20		
30	1012,04	2,60	131	1015,44	2,39	231	1163,17	2,51	331	757,33	2,67	431	753,09	2,23		
31	1495,99	2,67	132	1037,51	3,18	232	1592,78	2,64	332	1316,85	1,53	432	1435,71	1,94		
32	1621,65	5,52	133	1367,79	2,07	233	2339,08	1,82	333	1066,38	1,76	433	1526,56	3,12		
33	1174,21	1,93	134	1481,56	1,81	234	1561,37	2,61	334	1473,07	2,62	434	1509,57	1,88		
34	784,50	2,14	135	1177,60	4,43	235	2238,04	2,10	335	696,20	2,20	435	1109,68	1,89		
35	1167,42	2,78	136	970,44	1,94	236	1216,66	5,40	336	2367,94	1,55	436	1084,21	3,21		
36	1226,85	2,54	137	1953,62	2,32	237	1338,07	2,29	337	731,01	2,56	437	806,58	1,76		
37	1757,49	2,95	138	1215,81	3,28	238	864,31	2,96	338	1214,96	2,71	438	1206,47	1,27		
38	1165,72	2,40	139	1427,22	1,82	239	1091,00	1,77	339	1046,85	3,47	439	1311,75	2,17		
39	976,38	1,71	140	1368,64	2,79	240	2318,70	3,63	340	2291,53	3,38	440	989,12	2,41		
40	1075,72	2,49	141	1113,93	1,97	241	1840,70	1,84	341	2435,87	1,71	441	1637,78	2,41		
41	966,20	3,13	142	2041,07	1,97	242	2237,19	3,05	342	1357,60	3,07	442	1218,36	2,79		
42	1242,98	1,91	143	1421,28	2,84	243	1061,29	5,32	343	976,38	2,60	443	1073,17	1,63		
43	1553,72	1,63	144	1434,86	1,32	244	3257,73	2,58	344	1888,24	1,80	444	1239,58	3,05		
44	1390,71	2,61	145	1030,72	3,64	245	2603,13	1,98	345	2137,01	1,58	445	1136,00	1,60		
45	1310,05	1,69	146	931,39	2,98	246	1251,47	3,30	346	1191,19	3,75	446	788,75	1,69		
46	1038,36	1,83	147	1274,39	2,33	247	1852,58	2,27	347	1111,38	3,47	447	2069,09	1,81		
47	2348,42	2,42	148	967,04	2,65	248	773,47	4,13	348	694,51	2,46	448	1591,93	2,44		
48	1102,04	3,05	149	1417,03	2,37	249	1130,06	2,38	349	1351,66	2,49	449	1224,30	2,30		
49	781,11	2,46	150	1082,51	1,78	250	984,87	3,22	350	705,54	1,73	450	984,87	3,52		
50	1349,96	1,92	151	1547,78	1,98	251	1735,42	3,74	351	674,13	3,65	451	2160,78	1,92		
51	1289,68	2,67	152	1923,05	1,48	252	1232,79	4,29	352	691,11	2,48	452	2982,64	3,18		
52	875,35	1,38	153	1542,69	3,10	253	770,07	3,01	353	1717,59	2,30	453	1262,51	1,95		
53	974,69	2,01	154	1406,84	4,64	254	1836,45	3,07	354	1375,43	1,78	454	1318,54	1,54		
54	1914,56	2,30	155	1569,01	4,82	255	1979,09	1,85	355	1417,03	2,48	455	1751,55	2,10		
55	1149,59	3,01	156	891,48	3,32	256	1306,66	2,00	356	1021,38	2,32	456	1004,40	3,83		
56	2687,18	2,70	157	1177,60	2,28	257	1097,80	3,76	357	1957,86	1,96	457	1316,85	2,32		
57	1716,74	2,09	158	1287,13	2,25	258	1091,85	1,85	358	1963,81	2,74	458	966,20	3,30		
58	856,67	2,36	159	1971,45	2,72	259	1140,25	1,92	359	1148,74	2,09	459	1304,11	2,39		
59	2541,15	1,54	160	1766,83	2,49	260	1057,89	4,00	360	928,84	2,38	460	1401,75	2,09		
60	2165,03	2,18	161	1798,25	3,55	261	832,90	2,35	361	1332,13	1,87	461	1342,32	2,58		
61	578,19	2,65	162	1031,57	3,23	262	1536,74	2,50	362	1574,10	2,18	462	943,27	2,45		
62	1799,09	2,45	163	1187,79	3,85	263	1726,08	2,28	363	1641,17	2,24	463	1534,20	2,53		
63	1629,29	2,26	164	1372,88	2,04	264	1653,06	2,36	364	1208,17	2,14	464	1563,91	2,24		
64	820,16	2,35	165	1774,47	3,96	265	1925,60	3,02	365	2048,71	2,69	465	995,91	4,39		
65	1181,85	3,46	166	1507,88	1,41	266	1287,13	2,31	366	1098,64	4,07	466	1856,83	3,52		
66	1524,86	2,03	167	1061,29	3,63	267	1263,36	2,30	367	1484,10	2,81	467	2266,06	2,86		
67	1214,96	2,21	168	1507,88	2,53	268	3003,87	1,84	368	1105,44	3,61	468	1729,47	3,43		
68	991,67	3,03	169	1010,35	2,59	269	1400,90	2,21	369	1224,30	1,50	469	874,50	4,62		
69	1144,49	2,43	170	1156,38	2,43	270	2406,15	1,67	370	1230,24	2,09	470	2229,55	3,80		
70	1386,47	2,26	171	797,24	3,04	271	1450,99	2,14	371	1482,41	3,85	471	1495,99	1,47		
71	1067,23	2,24	172	1913,71	2,17	272	1827,11	2,58	372	1269,30	2,10	472	985,72	4,99		
72	761,58	1,47	173	2014,75	4,61	273	1372,88	3,91	373	1374,58	3,33	473	1445,05	2,33		
73	1032,42	4,32	174	1216,66	1,57	274	1253,17	1,73	374	1206,47	2,84	474	1377,13	1,57		
74	1383,92	3,17	175	956,86	1,41	275	805,73	3,65	375	1141,10	2,77	475	772,62	2,66		
75	1378,82	3,48	176	1372,88	3,77	276	1865,32	3,72	376	971,29	1,73	476	1544,39	1,66		
76	1687,87	2,04	177	1402,60	2,03	277	1864,47	3,54	377	928,84	3,29	477	1000,16	1,47		
77	881,29	4,41	178	1284,58	4,85	278	2221,91	2,48	378	1216,66	1,88	478	681,77	1,95		
78	2007,96	2,45	179	1137,70	2,66	279	1660,70	2,52	379	1136,85	2,19	479	500,08	2,91		
79	1440,80	2,08	180	1370,33	3,01	280	1301,56	3,60	380	2419,73	2,13	480	1007,80	2,28		
80	1193,74	1,93	181	1110,53	2,74	281	1186,94	2,10	381	1011,19	2,93	481	1540,99	2,56		
81	1524,86	1,51	182	1169,96	2,98	282	964,50	4,76	382	585,83	1,65	482	1104,59	1,59		
82	913,56	2,26	183	1433,16	2,23	283	877,90	2,26	383	1636,93	1,71	483	719,13	2,07		
83	1268,45	1,45														

Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1
Column B	GF 24 h	Column C	G 24 h	Column C	G 24 h
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column A	M 24 h	Column A	M 24 h	Column B	GF 24 h
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	< 0,0001	P value	< 0,0001	P value	< 0,0001
Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	****	P value summary	****	P value summary	****
Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	321095 , 179405	Sum of ranks in column A,C	292364 , 208136	Sum of ranks in column B,C	213088 , 287413
Mann-Whitney U	54155	Mann-Whitney U	82886	Mann-Whitney U	87838
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column A	2356	Median of column A	2356	Median of column B	1569
Median of column B	1569	Median of column C	1898	Median of column C	1898
Difference: Actual	-786,2	Difference: Actual	-458,1	Difference: Actual	328,1
Difference: Hodges-Lehmann	-727,6	Difference: Hodges-Lehmann	-416	Difference: Hodges-Lehmann	313,7

Tabla 28: Test de Mann-Whitney para área celular: comparación entre pares de grupos tras 24 horas de cultivo sin melatonina.

Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1
Column H	GF 24 h + melatonina	Column I	G 24 h + melatonina	Column I	G 24 h + melatonina
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column G	M 24 h + melatonina	Column G	M 24 h + melatonina	Column H	GF 24 h + melatonina
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	< 0,0001	P value	< 0,0001	P value	< 0,0001
Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	****	P value summary	****	P value summary	****
Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column G,H	326647 , 173854	Sum of ranks in column G,I	293057 , 207444	Sum of ranks in column H,I	205580 , 294920
Mann-Whitney U	48604	Mann-Whitney U	82194	Mann-Whitney U	80330
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column G	2015	Median of column G	2015	Median of column H	1308
Median of column H	1308	Median of column I	1639	Median of column I	1639
Difference: Actual	-706,4	Difference: Actual	-375,3	Difference: Actual	331,1
Difference: Hodges-Lehmann	-680,9	Difference: Hodges-Lehmann	-377,8	Difference: Hodges-Lehmann	305,6

Tabla 29: Test de Mann-Whitney para área celular: comparación entre pares de grupos tras 24 horas de cultivo con melatonina.

Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1
Column E	GF 72 h	Column F	G 72 h	Column F	G 72 h
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column D	M 72 h	Column D	M 72 h	Column E	GF 72 h
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	< 0,0001	P value	< 0,0001	P value	< 0,0001
Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	****	P value summary	****	P value summary	****
Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column D,E	299176 , 201325	Sum of ranks in column D,F	272303 , 228197	Sum of ranks in column E,F	223434 , 277066
Mann-Whitney U	76075	Mann-Whitney U	102947	Mann-Whitney U	98184
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column D	1991	Median of column D	1991	Median of column E	1606
Median of column E	1606	Median of column F	1799	Median of column F	1799
Difference: Actual	-384,6	Difference: Actual	-191,9	Difference: Actual	192,7
Difference: Hodges-Lehmann	-377	Difference: Hodges-Lehmann	-177,5	Difference: Hodges-Lehmann	199,5

Tabla 30: Test de Mann-Whitney para área celular: comparación entre pares de grupos tras 72 horas de cultivo sin melatonina.



Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1
Column K	GF 72 h + melatonina	Column L	G 72 h + melatonina	Column L	G 72 h + melatonina
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column J	M 72 h + melatonina	Column J	M 72 h + melatonina	Column K	GF 72 h + melatonina
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	< 0,0001	P value	0,0009	P value	< 0,0001
Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	****	P value summary	***	P value summary	****
Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column J,K	303179 , 197321	Sum of ranks in column J,L	265418 , 235083	Sum of ranks in column K,L	209474 , 291026
Mann-Whitney U	72071	Mann-Whitney U	109833	Mann-Whitney U	84224
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column J	1697	Median of column J	1697	Median of column K	1311
Median of column K	1311	Median of column L	1567	Median of column L	1567
Difference: Actual	-386,1	Difference: Actual	-130,1	Difference: Actual	256
Difference: Hodges-Lehmann	-373,4	Difference: Hodges-Lehmann	-104,2	Difference: Hodges-Lehmann	266,6

Tabla 31: Test de Mann-Whitney para área celular: comparación entre pares de grupos tras 72 horas de cultivo con melatonina.

Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1
Column G	M 24 h + melatonina	Column H	GF 24 h + melatonina	Column I	G 24 h + melatonina
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column A	M 24 h	Column B	GF 24 h	Column C	G 24 h
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	< 0,0001	P value	< 0,0001	P value	< 0,0001
Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	****	P value summary	****	P value summary	****
Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,G	275717 , 224784	Sum of ranks in column B,H	283820 , 216681	Sum of ranks in column C,I	280029 , 220471
Mann-Whitney U	99534	Mann-Whitney U	91431	Mann-Whitney U	95221
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column A	2356	Median of column B	1569	Median of column C	1898
Median of column G	2015	Median of column H	1308	Median of column I	1639
Difference: Actual	-340,9	Difference: Actual	-261,1	Difference: Actual	-258,1

Tabla 32: Test de Mann-Whitney para área celular: comparación de grupos sin melatonina con sus homólogos con melatonina, tras 24 horas de cultivo.

Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1
Column J	M 72 h + melatonina	Column K	GF 72 h + melatonina	Column L	G 72 h + melatonina
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column D	M 72 h	Column E	GF 27 h	Column F	G 72 h
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	< 0,0001	P value	< 0,0001	P value	< 0,0001
Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	****	P value summary	****	P value summary	****
Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column D,J	285866 , 214635	Sum of ranks in column E,K	290553 , 209948	Sum of ranks in column F,L	277533 , 222967
Mann-Whitney U	89385	Mann-Whitney U	84698	Mann-Whitney U	97717
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column D	1991	Median of column E	1606	Median of column F	1799
Median of column J	1697	Median of column K	1311	Median of column L	1567
Difference: Actual	-294	Difference: Actual	-295,5	Difference: Actual	1567

Tabla 33: Test de Mann-Whitney para área celular: comparación de grupos sin melatonina con sus homólogos con melatonina, tras 72 horas de cultivo.

Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1
Column D	M 72 h	Column E	GF 72 h	Column F	G 72 h
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column A	M 24 h	Column B	GF 24 h	Column C	G 24 h
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	< 0,0001	P value	0,6481	P value	0,0103
Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	****	P value summary	ns	P value summary	*
Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,D	284885 , 215615	Sum of ranks in column B,E	248165 , 252335	Sum of ranks in column C,F	261971 , 238529
Mann-Whitney U	90365	Mann-Whitney U	122915	Mann-Whitney U	113279
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column A	2356	Median of column B	1569	Median of column C	1898
Median of column D	1991	Median of column E	1606	Median of column F	1799
Difference: Actual	-364,7	Difference: Actual	36,93	Difference: Actual	-98,49
Difference: Hodges-Lehmann	-336,2	Difference: Hodges-Lehmann	16,13	Difference: Hodges-Lehmann	-96,79

Tabla 34: Test de Mann-Whitney para área celular: comparación de grupos en ausencia de melatonina tras 24 horas de cultivo con sus homólogos tras 72 horas de cultivo.

Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1
Column J	M 72 h + melatonina	Column K	GF 72 h + melatonina	Column L	G 72 h + melatonina
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column G	M 24 h + melatonina	Column H	GF 24 h + melatonina	Column I	G 24 h + melatonina
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	< 0,0001	P value	0,4551	P value	0,0569
Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	****	P value summary	ns	P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column G,J	289680 , 211820	Sum of ranks in column H,K	253662 , 246838	Sum of ranks in column I,L	258946 , 241554
Mann-Whitney U	86570	Mann-Whitney U	121588	Mann-Whitney U	116304
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column G	2015	Median of column H	1308	Median of column I	1639
Median of column J	1697	Median of column K	1311	Median of column L	1567
Difference: Actual	-317,8	Difference: Actual	2,545	Difference: Actual	-72,59

Tabla 35: Test de Mann-Whitney para área celular: comparación de grupos en presencia de melatonina tras 24 horas de cultivo con sus homólogos tras 72 horas de cultivo.

Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1
Column B	GF 24 h	Column C	G 24 h	Column C	G 24 h
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column A	M 24 h	Column A	M 24 h	Column B	GF 24 h
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	0,3659	P value	< 0,0001	P value	< 0,0001
Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns	P value summary	****	P value summary	****
Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	254380 , 246120	Sum of ranks in column A,C	284034 , 216467	Sum of ranks in column B,C	277754 , 222746
Mann-Whitney U	120870	Mann-Whitney U	91217	Mann-Whitney U	97496
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column A	2,725	Median of column A	2,725	Median of column B	2,708
Median of column B	2,708	Median of column C	2,34	Median of column C	2,34
Difference: Actual	-0,01698	Difference: Actual	-0,385	Difference: Actual	-0,368
Difference: Hodges-Lehmann	-0,05142	Difference: Hodges-Lehmann	-0,37	Difference: Hodges-Lehmann	-0,3173

Tabla 36: Test de Mann-Whitney para índice de redondez celular: comparación entre pares de grupos tras 24 horas de cultivo sin melatonina.

Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1
Column H	3F 24 h + melatonina	Column I	G 24 h + melatonina	Column I	G 24 h + melatonina
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column G	M 24 h + melatonina	Column G	M 24 h + melatonina	Column H	GF 24 h + melatonina
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	0,1836	P value	< 0,0001	P value	0,0071
Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns	P value summary	****	P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column G,H	256324 , 244177	Sum of ranks in column G,I	269841 , 230659	Sum of ranks in column H,I	262541 , 237959
Mann-Whitney U	118927	Mann-Whitney U	105409	Mann-Whitney U	112709
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column G	2,41	Median of column G	2,41	Median of column H	2,335
Median of column H	2,335	Median of column I	2,218	Median of column I	2,218
Difference: Actual	-0,075	Difference: Actual	-0,1922	Difference: Actual	-0,1172
Difference: Hodges-Lehmann	-0,06	Difference: Hodges-Lehmann	-0,1674	Difference: Hodges-Lehmann	-0,109

Tabla 37: Test de Mann-Whitney para índice de redondez celular: comparación entre pares de grupos tras 24 horas de cultivo con melatonina.

Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1
Column E	GF 72 h	Column F	G 72 h	Column F	G 72 h
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column D	M 72 h	Column D	M 72 h	Column E	GF 72 h
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	0,1698	P value	< 0,0001	P value	< 0,0001
Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns	P value summary	****	P value summary	****
Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column D,E	256521 , 243979	Sum of ranks in column D,F	281347 , 219153	Sum of ranks in column E,F	274486 , 226014
Mann-Whitney U	118729	Mann-Whitney U	93903	Mann-Whitney U	100764
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column D	2,3	Median of column D	2,3	Median of column E	2,26
Median of column E	2,26	Median of column F	2,022	Median of column F	2,022
Difference: Actual	-0,04	Difference: Actual	-0,2784	Difference: Actual	-0,2384
Difference: Hodges-Lehmann	-0,05	Difference: Hodges-Lehmann	-0,2281	Difference: Hodges-Lehmann	-0,1767

Tabla 38: Test de Mann-Whitney para índice de redondez celular: comparación entre pares de grupos tras 72 horas de cultivo sin melatonina.

Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1
Column K	3F 72 h + melatonina	Column L	G 72 h + melatonina	Column L	G 72 h + melatonina
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column J	M 72 h + melatonina	Column J	M 72 h + melatonina	Column K	3F 72 h + melatonina
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	< 0,0001	P value	0,0029	P value	< 0,0001
Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	****	P value summary	**	P value summary	****
Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column J,K	231154 , 269346	Sum of ranks in column J,L	263847 , 236653	Sum of ranks in column K,L	281330 , 219170
Mann-Whitney U	105904	Mann-Whitney U	111403	Mann-Whitney U	93920
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column J	2,193	Median of column J	2,193	Median of column K	2,38
Median of column K	2,38	Median of column L	2,11	Median of column L	2,11
Difference: Actual	0,1871	Difference: Actual	-0,0829	Difference: Actual	-0,27
Difference: Hodges-Lehmann	0,1658	Difference: Hodges-Lehmann	-0,09426	Difference: Hodges-Lehmann	-0,26

Tabla 39: Test de Mann-Whitney para índice de redondez celular: comparación entre pares de grupos tras 72 horas de cultivo con melatonina.

Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1
Column G	M 24 h + melatonina	Column H	GF 24 h + melatonina	Column I	G 24 h + melatonina
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column A	M 24 h	Column B	GF 24 h	Column C	G 24 h
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	< 0,0001	P value	< 0,0001	P value	0,003
Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	****	P value summary	****	P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,G	281234 , 219267	Sum of ranks in column B,H	278981 , 221520	Sum of ranks in column C,I	263804 , 236696
Mann-Whitney U	94017	Mann-Whitney U	96270	Mann-Whitney U	111446
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column A	2,725	Median of column B	2,708	Median of column C	2,34
Median of column G	2,41	Median of column H	2,335	Median of column I	2,218
Difference: Actual	-0,315	Difference: Actual	-0,373	Difference: Actual	-0,1222
Difference: Hodges-Lehmann	-0,33	Difference: Hodges-Lehmann	-0,332	Difference: Hodges-Lehmann	-0,1197

Tabla 40: Test de Mann-Whitney para índice de redondez celular: comparación de grupos sin melatonina con sus homólogos con melatonina, tras 24 horas de cultivo.

Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1
Column J	M 72 h + melatonina	Column K	GF 72 h + melatonina	Column L	G 72 h + melatonina
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column D	M 72 h	Column E	GF 72 h	Column F	G 72 h
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	0,0194	P value	0,0011	P value	0,0478
Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	*	P value summary	**	P value summary	*
Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column D,J	260931 , 239569	Sum of ranks in column E,K	235369 , 265132	Sum of ranks in column F,L	241210 , 259290
Mann-Whitney U	114319	Mann-Whitney U	110119	Mann-Whitney U	115960
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column D	2,3	Median of column E	2,26	Median of column F	2,022
Median of column J	2,193	Median of column K	2,38	Median of column L	2,11
Difference: Actual	-0,1071	Difference: Actual	0,12	Difference: Actual	0,08843
Difference: Hodges-Lehmann	-0,07873	Difference: Hodges-Lehmann	0,13	Difference: Hodges-Lehmann	0,05799

Tabla 41: Test de Mann-Whitney para índice de redondez celular: comparación de grupos sin melatonina con sus homólogos con melatonina, tras 72 horas de cultivo.

Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1
Column D	M 72 h	Column E	GF 72 h	Column F	G 72 h
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column A	M 24 h	Column B	GF 24 h	Column C	G 24 h
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	< 0,0001	P value	< 0,0001	P value	< 0,0001
Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	****	P value summary	****	P value summary	****
Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,D	293388 , 207113	Sum of ranks in column B,E	289713 , 210788	Sum of ranks in column C,F	283323 , 217177
Mann-Whitney U	81863	Mann-Whitney U	85538	Mann-Whitney U	91927
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column A	2,725	Median of column B	2,708	Median of column C	2,34
Median of column D	2,3	Median of column E	2,26	Median of column F	2,022
Difference: Actual	-0,425	Difference: Actual	-0,448	Difference: Actual	-0,3184
Difference: Hodges-Lehmann	-0,43	Difference: Hodges-Lehmann	-0,426	Difference: Hodges-Lehmann	-0,273

Tabla 42: Test de Mann-Whitney para índice de redondez celular: comparación de grupos en ausencia de melatonina tras 24 horas de cultivo con sus homólogos tras 72 horas de cultivo.

Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1
Column J	M 72 h + melatonina	Column K	3F 72 h + melatonina	Column L	G 72 h + melatonina
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column G	M 24 h + melatonina	Column H	3F 24 h + melatonina	Column I	G 24 h + melatonina
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	< 0,0001	P value	0,3614	P value	0,0016
Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	****	P value summary	ns	P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column G,J	272571 , 227929	Sum of ranks in column H,K	246081 , 254419	Sum of ranks in column I,L	264684 , 235816
Mann-Whitney U	102679	Mann-Whitney U	120831	Mann-Whitney U	110566
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column G	2,41	Median of column H	2,335	Median of column I	2,218
Median of column J	2,193	Median of column K	2,38	Median of column L	2,11
Difference: Actual	-0,2171	Difference: Actual	0,045	Difference: Actual	-0,1078
Difference: Hodges-Lehmann	-0,1831	Difference: Hodges-Lehmann	0,04	Difference: Hodges-Lehmann	-0,107

Tabla 43: Test de Mann-Whitney para índice de redondez celular: comparación de grupos en presencia de melatonina tras 24 horas de cultivo con sus homólogos tras 72 horas de cultivo.

GRUPO M. 1 SEM EN AUSENCIA DE MELATONINA		
	PROMEDIO	SD
ALPL	1,08645	0,54873
BGLAP	1,07007	0,39948
COLIA1	1,00716	0,13424
PHEX	1,01125	0,17639
SPARC	1,01583	0,19554
GRUPO G. 1 SEM EN AUSENCIA DE MELATONINA		
	PROMEDIO	SD
ALPL	0,64047	0,40153
BGLAP	0,93203	0,68665
COLIA1	0,75411	0,12790
PHEX	0,52399	0,30184
SPARC	0,68076	0,17466
GRUPO GF. 1 SEM EN AUSENCIA DE MELATONINA		
	PROMEDIO	SD
ALPL	0,94111	0,82324
BGLAP	1,65009	0,73265
COLIA1	0,54159	0,15587
PHEX	0,79144	0,26892
SPARC	0,49735	0,11526

Tabla 44: Valores promedio y desviación estándar de  $2^{-ddCt}$  obtenidos de los diferentes genes estudiados. Grupos M, G y GF tras 1 semana de cultivo en ausencia de melatonina.

GRUPO M. 5 SEM EN AUSENCIA DE MELATONINA		
	PROMEDIO	SD
ALPL	1,20131	0,79080
BGLAP	1,06625	0,41340
COLIA1	1,13455	0,55542
PHEX	1,04434	0,33776
SPARC	1,04047	0,31286
GRUPO G. 5 SEM EN AUSENCIA DE MELATONINA		
	PROMEDIO	SD
ALPL	0,51684	0,36907
BGLAP	1,33689	1,24196
COLIA1	0,88067	0,53471
PHEX	0,59836	0,41072
SPARC	0,95861	0,72196
GRUPO GF. 5 SEM EN AUSENCIA DE MELATONINA		
	PROMEDIO	SD
ALPL	1,69857	2,40560
BGLAP	1,52137	0,96769
COLIA1	1,73088	1,41428
PHEX	2,13080	0,93029
SPARC	1,87578	0,63738

Tabla 45: Valores promedio y desviación estándar de  $2^{-ddCt}$  obtenidos de los diferentes genes estudiados. Grupos M, G y GF tras 5 semanas de cultivo en ausencia de melatonina.

GRUPO M. 1 SEM EN PRESENCIA DE MELATONINA		
	PROMEDIO	SD
ALPL	1,12084	0,66548
BGLAP	1,19422	0,50927
COLIA1	1,06515	0,37600
PHEX	1,02546	0,26016
SPARC	1,05427	0,40659
GRUPO G. 1 SEM EN PRESENCIA DE MELATONINA		
	PROMEDIO	SD
ALPL	0,55407	0,41208
BGLAP	0,94026	0,62703
COLIA1	0,65547	0,14749
PHEX	0,82531	0,53670
SPARC	0,72934	0,35017

GRUPO GF. 1 SEM EN PRESENCIA DE MELATONINA		
	PROMEDIO	SD
ALPL	1,31726	0,88397
BGLAP	1,28519	1,15948
COLIA1	0,96030	0,10117
PHEX	3,38780	1,84204
SPARC	0,98347	0,28577

Tabla 46: Valores promedio y desviación estándar de  $2^{-ddCt}$  obtenidos de los diferentes genes estudiados. Grupos M, G y GF tras 1 semana de cultivo en presencia de melatonina.

GRUPO M. 5 SEM EN PRESENCIA DE MELATONINA		
	PROMEDIO	SD
ALPL	2,03426	2,53714
BGLAP	0,92640	0,50954
COLIA1	1,10814	0,59254
PHEX	1,17452	0,70467
SPARC	1,06702	0,45490
GRUPO G. 5 SEM EN PRESENCIA DE MELATONINA		
	PROMEDIO	SD
ALPL	0,46593	0,34574
BGLAP	0,65954	0,51398
COLIA1	0,52140	0,26529
PHEX	0,62197	0,56305
SPARC	0,64213	0,46216
GRUPO GF. 5 SEM EN PRESENCIA DE MELATONINA		
	PROMEDIO	SD
ALPL	0,61841	0,22301
BGLAP	0,60789	0,18985
COLIA1	0,81548	0,23113
PHEX	3,29600	1,91436
SPARC	0,89868	0,47168

Tabla 47: Valores promedio y desviación estándar de  $2^{-ddCt}$  obtenidos de los diferentes genes estudiados. Grupos M, G y GF tras 5 semanas de cultivo en presencia de melatonina.

Table Analyzed	ALPL 1SEM
Column C	GF
vs.	vs.
Column A	M
Mann Whitney test	
P value	0,2222
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	34,00 , 21,00
Mann-Whitney U	6
Difference between medians	
Median of column A	0,9011
Median of column C	0,6007
Difference: Actual	-0,3004
Difference: Hodges-Lehmann	-0,2817

Table Analyzed	ALPL 1SEM
Column B	G
vs.	vs.
Column A	M
Mann Whitney test	
P value	0,3095
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	33,00 , 22,00
Mann-Whitney U	7
Difference between medians	
Median of column A	0,9011
Median of column B	0,6934
Difference: Actual	-0,2077
Difference: Hodges-Lehmann	-0,2249

Table Analyzed	ALPL 1SEM
Column C	GF
vs.	vs.
Column B	G
Mann Whitney test	
P value	0,9444
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column B,C	28,00 , 27,00
Mann-Whitney U	12
Difference between medians	
Median of column B	0,6934
Median of column C	0,6007
Difference: Actual	-0,09269
Difference: Hodges-Lehmann	-0,07553

Tabla 48: Test de Mann-Whitney para la cuantificación de la expresión relativa del gen ALPL: comparación entre pares de grupos tras 1 semana de cultivo sin melatonina.

Table Analyzed	BGLAP 1SEM
Column C	GF
vs.	vs.
Column A	M
Mann Whitney test	
P value	0,5317
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	24,00 , 31,00
Mann-Whitney U	9
Difference between medians	
Median of column A	1,274
Median of column C	1,229
Difference: Actual	-0,04509
Difference: Hodges-Lehmann	0,4908

Table Analyzed	BGLAP 1SEM
Column B	G
vs.	vs.
Column A	M
Mann Whitney test	
P value	0,5317
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	31,00 , 24,00
Mann-Whitney U	9
Difference between medians	
Median of column A	1,274
Median of column B	1,166
Difference: Actual	-0,1081
Difference: Hodges-Lehmann	-0,1677

Table Analyzed	BGLAP 1SEM
Column C	GF
vs.	vs.
Column B	G
Mann Whitney test	
P value	0,2222
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column B,C	21,00 , 34,00
Mann-Whitney U	6
Difference between medians	
Median of column B	1,166
Median of column C	1,229
Difference: Actual	0,06305
Difference: Hodges-Lehmann	0,703

Tabla 49: Test de Mann-Whitney para la cuantificación de la expresión relativa del gen BGLAP: comparación entre pares de grupos tras 1 semana de cultivo sin melatonina.

Table Analyzed	COLIA1 1SEM
Column C	GF
vs.	vs.
Column A	M
Mann Whitney test	
P value	0,0079
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	40,00 , 15,00
Mann-Whitney U	0
Difference between medians	
Median of column A	0,9681
Median of column C	0,5109
Difference: Actual	-0,4572
Difference: Hodges-Lehmann	-0,4572

Table Analyzed	COLIA1 1SEM
Column B	G
vs.	vs.
Column A	M
Mann Whitney test	
P value	0,0159
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	*
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	39,00 , 16,00
Mann-Whitney U	1
Difference between medians	
Median of column A	0,9681
Median of column B	0,8172
Difference: Actual	-0,1509
Difference: Hodges-Lehmann	-0,243

Table Analyzed	COLIA1 1SEM
Column C	GF
vs.	vs.
Column B	G
Mann Whitney test	
P value	0,0556
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column B,C	37,00 , 18,00
Mann-Whitney U	3
Difference between medians	
Median of column B	0,8172
Median of column C	0,5109
Difference: Actual	-0,3063
Difference: Hodges-Lehmann	-0,2723

Tabla 50: Test de Mann-Whitney para la cuantificación de la expresión relativa del gen COLIA1: comparación entre pares de grupos tras 1 semana de cultivo sin melatonina.



Table Analyzed	PHEX 1SEM	Table Analyzed	PHEX 1SEM	Table Analyzed	PHEX 1SEM
Column C	GF	Column B	G	Column C	GF
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column A	M	Column A	M	Column B	G
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	0,3095	P value	0,0079	P value	0,3095
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns	P value summary	**	P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	33,00 , 22,00	Sum of ranks in column A,B	40,00 , 15,00	Sum of ranks in column B,C	22,00 , 33,00
Mann-Whitney U	7	Mann-Whitney U	0	Mann-Whitney U	7
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column A	0,9184	Median of column A	0,9184	Median of column B	0,6034
Median of column C	0,7755	Median of column B	0,6034	Median of column C	0,7755
Difference: Actual	-0,1429	Difference: Actual	-0,315	Difference: Actual	0,1721
Difference: Hodges-Lehmann	-0,2831	Difference: Hodges-Lehmann	-0,3416	Difference: Hodges-Lehmann	0,2109

Tabla 51: Test de Mann-Whitney para la cuantificación de la expresión relativa del gen PHEX: comparación entre pares de grupos tras 1 semana de cultivo sin melatonina.

Table Analyzed	SPARC 1SEM	Table Analyzed	SPARC 1SEM	Table Analyzed	SPARC 1SEM
Column C	GF	Column B	G	Column C	GF
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column A	M	Column A	M	Column B	G
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	0,0079	P value	0,0556	P value	0,0952
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**	P value summary	ns	P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	40,00 , 15,00	Sum of ranks in column A,B	37,00 , 18,00	Sum of ranks in column B,C	36,00 , 19,00
Mann-Whitney U	0	Mann-Whitney U	3	Mann-Whitney U	4
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column A	1,102	Median of column A	1,102	Median of column B	0,7233
Median of column C	0,504	Median of column B	0,7233	Median of column C	0,504
Difference: Actual	-0,5983	Difference: Actual	-0,3791	Difference: Actual	-0,2192
Difference: Hodges-Lehmann	-0,5302	Difference: Hodges-Lehmann	-0,3455	Difference: Hodges-Lehmann	-0,1939

Tabla 52: Test de Mann-Whitney para la cuantificación de la expresión relativa del gen SPARC: comparación entre pares de grupos tras 1 semana de cultivo sin melatonina.

Table Analyzed	ALPL 5SEM	Table Analyzed	ALPL 5SEM	Table Analyzed	ALPL 5SEM
Column C	GF	Column B	G	Column C	GF
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column A	M	Column A	M	Column B	G
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	0,5317	P value	0,1508	P value	0,8016
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns	P value summary	ns	P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	31,00 , 24,00	Sum of ranks in column A,B	35,00 , 20,00	Sum of ranks in column B,C	26,00 , 29,00
Mann-Whitney U	9	Mann-Whitney U	5	Mann-Whitney U	11
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column A	1,056	Median of column A	1,056	Median of column B	0,5246
Median of column C	0,4042	Median of column B	0,5246	Median of column C	0,4042
Difference: Actual	-0,6515	Difference: Actual	-0,5311	Difference: Actual	-0,1204
Difference: Hodges-Lehmann	-0,2182	Difference: Hodges-Lehmann	-0,5771	Difference: Hodges-Lehmann	0,228

Tabla 53: Test de Mann-Whitney para la cuantificación de la expresión relativa del gen ALPL: comparación entre pares de grupos tras 5 semanas de cultivo sin melatonina.

Table Analyzed	BGLAP 5SEM
Column C	GF
vs.	vs.
Column A	M
Mann Whitney test	
P value	0,5238
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	17,00 , 28,00
Mann-Whitney U	7
Difference between medians	
Median of column A	1,068
Median of column C	1,365
Difference: Actual	0,2971
Difference: Hodges-Lehmann	0,2971

Table Analyzed	BGLAP 5SEM
Column B	G
vs.	vs.
Column A	M
Mann Whitney test	
P value	> 0,9999
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	20,00 , 25,00
Mann-Whitney U	10
Difference between medians	
Median of column A	1,068
Median of column B	0,8457
Difference: Actual	-0,2225
Difference: Hodges-Lehmann	-0,09579

Table Analyzed	BGLAP 5SEM
Column C	GF
vs.	vs.
Column B	G
Mann Whitney test	
P value	0,6667
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	Nc
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column B,C	25,00 , 30,00
Mann-Whitney U	10
Difference between medians	
Median of column B	0,8457
Median of column C	1,365
Difference: Actual	0,5196
Difference: Hodges-Lehmann	0,0359

Tabla 54: Test de Mann-Whitney para la cuantificación de la expresión relativa del gen BGLAP: comparación entre pares de grupos tras 5 semanas de cultivo sin melatonina.

Table Analyzed	COLIA1 5SEM
Column C	GF
vs.	vs.
Column A	M
Mann Whitney test	
P value	0,8016
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	26,00 , 29,00
Mann-Whitney U	11
Difference between medians	
Median of column A	1,088
Median of column C	1,205
Difference: Actual	0,1167
Difference: Hodges-Lehmann	0,1227

Table Analyzed	COLIA1 5SEM
Column B	G
vs.	vs.
Column A	M
Mann Whitney test	
P value	0,6667
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	30,00 , 25,00
Mann-Whitney U	10
Difference between medians	
Median of column A	1,088
Median of column B	0,8383
Difference: Actual	-0,2496
Difference: Hodges-Lehmann	-0,2873

Table Analyzed	COLIA1 5SEM
Column C	GF
vs.	vs.
Column B	G
Mann Whitney test	
P value	0,3095
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column B,C	22,00 , 33,00
Mann-Whitney U	7
Difference between medians	
Median of column B	0,8383
Median of column C	1,205
Difference: Actual	0,3663
Difference: Hodges-Lehmann	0,3663

Tabla 55: Test de Mann-Whitney para la cuantificación de la expresión relativa del gen COLIA1: comparación entre pares de grupos tras 5 semanas de cultivo sin melatonina.

Table Analyzed	PHEX 5SEM
Column C	GF
vs.	vs.
Column A	M
Mann Whitney test	
P value	0,0317
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	*
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	17,00 , 38,00
Mann-Whitney U	2
Difference between medians	
Median of column A	0,9026
Median of column C	1,883
Difference: Actual	0,9806
Difference: Hodges-Lehmann	0,975

Table Analyzed	PHEX 5SEM
Column B	G
vs.	vs.
Column A	M
Mann Whitney test	
P value	0,0952
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	36,00 , 19,00
Mann-Whitney U	4
Difference between medians	
Median of column A	0,9026
Median of column B	0,5529
Difference: Actual	-0,3497
Difference: Hodges-Lehmann	-0,3778

Table Analyzed	PHEX 5SEM
Column C	GF
vs.	vs.
Column B	G
Mann Whitney test	
P value	0,0079
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column B,C	15,00 , 40,00
Mann-Whitney U	0
Difference between medians	
Median of column B	0,5529
Median of column C	1,883
Difference: Actual	1,33
Difference: Hodges-Lehmann	1,33

Tabla 56: Test de Mann-Whitney para la cuantificación de la expresión relativa del gen PHEX: comparación entre pares de grupos tras 5 semanas de cultivo sin melatonina.

Table Analyzed	SPARC 5SEM	Table Analyzed	SPARC 5SEM	Table Analyzed	SPARC 5SEM
Column C	GF	Column B	G	Column C	GF
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column A	M	Column A	M	Column B	G
Mann-Whitney test		Mann-Whitney test		Mann-Whitney test	
P value	0,0556	P value	0,6667	P value	0,0556
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns	P value summary	ns	P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	18,00 , 37,00	Sum of ranks in column A,B	30,00 , 25,00	Sum of ranks in column B,C	18,00 , 37,00
Mann-Whitney U	3	Mann-Whitney U	10	Mann-Whitney U	3
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column A	0,963	Median of column A	0,963	Median of column B	0,8565
Median of column C	2,05	Median of column B	0,8565	Median of column C	2,05
Difference: Actual	1,087	Difference: Actual	-0,1065	Difference: Actual	1,193
Difference: Hodges-Lehmann	0,9945	Difference: Hodges-Lehmann	-0,1543	Difference: Hodges-Lehmann	0,916

Tabla 57: Test de Mann-Whitney para la cuantificación de la expresión relativa del gen SPARC: comparación entre pares de grupos tras 5 semanas de cultivo sin melatonina.

Table Analyzed	ALPL 1SEMM	Table Analyzed	ALPL 1SEMM	Table Analyzed	ALPL 1SEMM
Column C	GF	Column B	G	Column C	GF
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column A	M	Column A	M	Column B	G
Mann-Whitney test		Mann-Whitney test		Mann-Whitney test	
P value	0,8016	P value	0,0952	P value	0,0556
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns	P value summary	ns	P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	26,00 , 29,00	Sum of ranks in column A,B	36,00 , 19,00	Sum of ranks in column B,C	18,00 , 37,00
Mann-Whitney U	11	Mann-Whitney U	4	Mann-Whitney U	3
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column A	0,8623	Median of column A	0,8623	Median of column B	0,6097
Median of column C	0,7934	Median of column B	0,6097	Median of column C	0,7934
Difference: Actual	-0,06882	Difference: Actual	-0,2526	Difference: Actual	0,1837
Difference: Hodges-Lehmann	0,04746	Difference: Hodges-Lehmann	-0,4192	Difference: Hodges-Lehmann	0,4406

Tabla 58: Test de Mann-Whitney para la cuantificación de la expresión relativa del gen ALPL: comparación entre pares de grupos tras 1 semana de cultivo con melatonina.

Table Analyzed	BGLAP 1SEMM	Table Analyzed	BGLAP 1SEMM	Table Analyzed	BGLAP 1SEMM
Column C	GF	Column B	G	Column C	GF
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column A	M	Column A	M	Column B	G
Mann-Whitney test		Mann-Whitney test		Mann-Whitney test	
P value	0,7143	P value	0,873	P value	0,9444
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns	P value summary	ns	P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	22,00 , 23,00	Sum of ranks in column A,B	21,00 , 24,00	Sum of ranks in column B,C	28,00 , 27,00
Mann-Whitney U	8	Mann-Whitney U	9	Mann-Whitney U	12
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column A	1,089	Median of column A	1,089	Median of column B	0,9642
Median of column C	0,8382	Median of column B	0,9642	Median of column C	0,8382
Difference: Actual	-0,2504	Difference: Actual	-0,1245	Difference: Actual	-0,126
Difference: Hodges-Lehmann	-0,1851	Difference: Hodges-Lehmann	-0,1767	Difference: Hodges-Lehmann	-0,06016

Tabla 59: Test de Mann-Whitney para la cuantificación de la expresión relativa del gen BGLAP: comparación entre pares de grupos tras 1 semana de cultivo con melatonina.

Table Analyzed	COLIA1A 1SEMM
Column C	GF
vs.	vs.
Column A	M
Mann Whitney test	
P value	0,4127
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	32,00 , 23,00
Mann-Whitney U	8
Difference between medians	
Median of column A	1,048
Median of column C	0,9421
Difference: Actual	-0,1054
Difference: Hodges-Lehmann	-0,1165

Table Analyzed	COLIA1A 1SEMM
Column B	G
vs.	vs.
Column A	M
Mann Whitney test	
P value	0,0952
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	36,00 , 19,00
Mann-Whitney U	4
Difference between medians	
Median of column A	1,048
Median of column B	0,6498
Difference: Actual	-0,3978
Difference: Hodges-Lehmann	-0,4268

Table Analyzed	COLIA1A 1SEMM
Column C	GF
vs.	vs.
Column B	G
Mann Whitney test	
P value	0,0079
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column B,C	15,00 , 40,00
Mann-Whitney U	0
Difference between medians	
Median of column B	0,6498
Median of column C	0,9421
Difference: Actual	0,2924
Difference: Hodges-Lehmann	0,2924

Tabla 60: Test de Mann-Whitney para la cuantificación de la expresión relativa del gen COLIA1: comparación entre pares de grupos tras 1 semana de cultivo con melatonina.

Table Analyzed	PHEX 1SEMM
Column C	GF
vs.	vs.
Column A	M
Mann Whitney test	
P value	0,0317
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	*
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	17,00 , 38,00
Mann-Whitney U	2
Difference between medians	
Median of column A	0,9381
Median of column C	3,129
Difference: Actual	2,191
Difference: Hodges-Lehmann	2,266

Table Analyzed	PHEX 1SEMM
Column B	G
vs.	vs.
Column A	M
Mann Whitney test	
P value	0,8016
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	29,00 , 26,00
Mann-Whitney U	11
Difference between medians	
Median of column A	0,9381
Median of column B	0,9719
Difference: Actual	0,03376
Difference: Hodges-Lehmann	-0,09987

Table Analyzed	PHEX 1SEMM
Column C	GF
vs.	vs.
Column B	G
Mann Whitney test	
P value	0,0159
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	*
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column B,C	16,00 , 39,00
Mann-Whitney U	1
Difference between medians	
Median of column B	0,9719
Median of column C	3,129
Difference: Actual	2,157
Difference: Hodges-Lehmann	2,366

Tabla 61: Test de Mann-Whitney para la cuantificación de la expresión relativa del gen PHEX: comparación entre pares de grupos tras 1 semana de cultivo con melatonina.

Table Analyzed	SPARC 1SEMM
Column C	GF
vs.	vs.
Column A	M
Mann Whitney test	
P value	0,9444
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	28,00 , 27,00
Mann-Whitney U	12
Difference between medians	
Median of column A	0,8993
Median of column C	0,9294
Difference: Actual	0,0301
Difference: Hodges-Lehmann	-0,05452

Table Analyzed	SPARC 1SEMM
Column B	G
vs.	vs.
Column A	M
Mann Whitney test	
P value	0,4127
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	32,00 , 23,00
Mann-Whitney U	8
Difference between medians	
Median of column A	0,8993
Median of column B	0,8671
Difference: Actual	-0,03213
Difference: Hodges-Lehmann	-0,1852

Table Analyzed	SPARC 1SEMM
Column C	GF
vs.	vs.
Column B	G
Mann Whitney test	
P value	0,6667
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column B,C	25,00 , 30,00
Mann-Whitney U	10
Difference between medians	
Median of column B	0,8671
Median of column C	0,9294
Difference: Actual	0,06223
Difference: Hodges-Lehmann	0,1198

Tabla 62: Test de Mann-Whitney para la cuantificación de la expresión relativa del gen SPARC: comparación entre pares de grupos tras 1 semana de cultivo con melatonina.

Table Analyzed	ALPL 5SEMM
Column C	GF
vs.	vs.
Column A	M
Mann Whitney test	
P value	0,5317
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	31,00 , 24,00
Mann-Whitney U	9
Difference between medians	
Median of column A	0,7105
Median of column C	0,5524
Difference: Actual	-0,158
Difference: Hodges-Lehmann	-0,2269

Table Analyzed	ALPL 5SEMM
Column B	G
vs.	vs.
Column A	M
Mann Whitney test	
P value	0,4127
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	32,00 , 23,00
Mann-Whitney U	8
Difference between medians	
Median of column A	0,7105
Median of column B	0,6079
Difference: Actual	-0,1026
Difference: Hodges-Lehmann	-0,5037

Table Analyzed	ALPL 5SEMM
Column C	GF
vs.	vs.
Column B	G
Mann Whitney test	
P value	0,6667
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column B,C	25,00 , 30,00
Mann-Whitney U	10
Difference between medians	
Median of column B	0,6079
Median of column C	0,5524
Difference: Actual	-0,05545
Difference: Hodges-Lehmann	0,1572

Tabla 63: Test de Mann-Whitney para la cuantificación de la expresión relativa del gen ALPL: comparación entre pares de grupos tras 5 semanas de cultivo con melatonina.

Table Analyzed	BGLAP 5SEMM
Column C	GF
vs.	vs.
Column A	M
Mann Whitney test	
P value	0,2857
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	25,00 , 20,00
Mann-Whitney U	5
Difference between medians	
Median of column A	0,8021
Median of column C	0,6733
Difference: Actual	-0,1288
Difference: Hodges-Lehmann	-0,1502

Table Analyzed	BGLAP 5SEMM
Column B	G
vs.	vs.
Column A	M
Mann Whitney test	
P value	0,5556
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	23,00 , 22,00
Mann-Whitney U	7
Difference between medians	
Median of column A	0,8021
Median of column B	0,7832
Difference: Actual	-0,01893
Difference: Hodges-Lehmann	-0,1975

Table Analyzed	BGLAP 5SEMM
Column C	GF
vs.	vs.
Column B	G
Mann Whitney test	
P value	0,6667
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column B,C	30,00 , 25,00
Mann-Whitney U	10
Difference between medians	
Median of column B	0,7832
Median of column C	0,6733
Difference: Actual	-0,1098
Difference: Hodges-Lehmann	-0,05295

Tabla 64: Test de Mann-Whitney para la cuantificación de la expresión relativa del gen BGLAP: comparación entre pares de grupos tras 5 semanas de cultivo con melatonina.

Table Analyzed	COLIA1 5SEMM
Column C	GF
vs.	vs.
Column A	M
Mann Whitney test	
P value	0,4127
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	32,00 , 23,00
Mann-Whitney U	8
Difference between medians	
Median of column A	0,7972
Median of column C	0,7743
Difference: Actual	-0,02287
Difference: Hodges-Lehmann	-0,07974

Table Analyzed	COLIA1 5SEMM
Column B	G
vs.	vs.
Column A	M
Mann Whitney test	
P value	0,0952
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	36,00 , 19,00
Mann-Whitney U	4
Difference between medians	
Median of column A	0,7972
Median of column B	0,5649
Difference: Actual	-0,2323
Difference: Hodges-Lehmann	-0,4726

Table Analyzed	COLIA1 5SEMM
Column C	GF
vs.	vs.
Column B	G
Mann Whitney test	
P value	0,2222
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column B,C	21,00 , 34,00
Mann-Whitney U	6
Difference between medians	
Median of column B	0,5649
Median of column C	0,7743
Difference: Actual	0,2095
Difference: Hodges-Lehmann	0,2907

Tabla 65: Test de Mann-Whitney para la cuantificación de la expresión relativa del gen COLIA1: comparación entre pares de grupos tras 5 semanas de cultivo con melatonina.

Table Analyzed	PHEX 5SEMM	Table Analyzed	PHEX 5SEMM	Table Analyzed	PHEX 5SEMM
Column C	GF	Column B	G	Column C	GF
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column A	M	Column A	M	Column B	G
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	0,0556	P value	0,3095	P value	0,0159
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns	P value summary	ns	P value summary	*
Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	18,00 , 37,00	Sum of ranks in column A,B	33,00 , 22,00	Sum of ranks in column B,C	16,00 , 39,00
Mann-Whitney U	3	Mann-Whitney U	7	Mann-Whitney U	1
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column A	1,053	Median of column A	1,053	Median of column B	0,648
Median of column C	2,759	Median of column B	0,648	Median of column C	2,759
Difference: Actual	1,706	Difference: Actual	-0,4047	Difference: Actual	2,111
Difference: Hodges-Lehmann	1,706	Difference: Hodges-Lehmann	-0,4524	Difference: Hodges-Lehmann	2,111

Tabla 66: Test de Mann-Whitney para la cuantificación de la expresión relativa del gen PHEX: comparación entre pares de grupos tras 5 semanas de cultivo con melatonina.

Table Analyzed	SPARC 5 SEMM	Table Analyzed	SPARC 5 SEMM	Table Analyzed	SPARC 5 SEMM
Column C	GF	Column B	G	Column C	GF
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column A	M	Column A	M	Column B	G
Mann Whitney test		Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	0,5317	P value	0,2222	P value	0,4127
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns	P value summary	ns	P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	31,00 , 24,00	Sum of ranks in column A,B	34,00 , 21,00	Sum of ranks in column B,C	23,00 , 32,00
Mann-Whitney U	9	Mann-Whitney U	6	Mann-Whitney U	8
Difference between medians		Difference between medians		Difference between medians	
Median of column A	0,9349	Median of column A	0,9349	Median of column B	0,6949
Median of column C	0,8258	Median of column B	0,6949	Median of column C	0,8258
Difference: Actual	-0,1091	Difference: Actual	-0,24	Difference: Actual	0,1309
Difference: Hodges-Lehmann	-0,1502	Difference: Hodges-Lehmann	-0,4387	Difference: Hodges-Lehmann	0,1471

Tabla 67: Test de Mann-Whitney para la cuantificación de la expresión relativa del gen SPARC: comparación entre pares de grupos tras 5 semanas de cultivo con melatonina.