



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
Y ESTUDIOS AVANZADOS EN ODONTOLOGÍA  
“DR. KEISABURO MIYATA”

**“CORROSIÓN DE APARATOLOGÍA FIJA EN CULTIVO  
CELULAR HUMANO: CITOTOXICIDAD, EVALUACIÓN  
QUÍMICA Y MICROESTRUCTURAL”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

PRESENTA:

E. EN ORT. DAVID BAUTISTA MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS:  
DR. EN O. ROGELIO J. SCOUGALL VILCHIS

TUTORES:  
DR. EN C.S. RENÉ GARCÍA CONTRERAS  
DRA. EN O. ROSALÍA CONTRERAS BULNES

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, JULIO DE 2020.



2017-2021

## ÍNDICE

<b>1. Resumen</b> .....	<b>4</b>
<b>2. Introducción</b> .....	<b>5</b>
<b>3. Antecedentes</b> .....	<b>7</b>
3.1. Brackets.....	7
3.1.1. Bracket edgewise original.....	7
3.1.2. Diseños posteriores y brackets de acero inoxidable tradicionales.....	7
3.1.3. Tamaño de la ranura del bracket.....	8
3.1.4. Aparato de arco recto .....	8
3.1.5. Brackets metálicos .....	9
3.2. Fibroblastos .....	14
3.2.1. Estructura del fibroblasto .....	15
3.2.2. Proceso de envejecimiento del fibroblasto .....	15
3.2.3. Heterogeneidad del fibroblasto en el periodonto .....	15
3.2.4. Tasa de proliferación .....	16
<b>4. Planteamiento del problema</b> .....	<b>17</b>
<b>5. Justificación</b> .....	<b>18</b>
<b>6. Hipótesis</b> .....	<b>19</b>
6.1. Hipótesis de investigación ( $H_1$ ) .....	19
6.2. Hipótesis nula ( $H_0$ ).....	19
<b>7. Objetivos</b> .....	<b>20</b>
7.1. Objetivo general.....	20
7.2. Objetivos específicos.....	20
<b>8. Materiales y métodos</b> .....	<b>21</b>
8.1. Diseño del estudio .....	21
8.2. Población y universo de estudio .....	21
8.3. Muestreo.....	21
8.4. Criterios de selección.....	21
8.4.1. Inclusión .....	21
8.4.2. Exclusión .....	22
8.4.3. Eliminación .....	22
8.5. Variables de estudio .....	22
8.5.1. Variables dependientes .....	22

8.5.2. Variables independientes .....	23
8.6. Procedimiento.....	23
8.6.1. Fase 1 – Aislamiento celular.....	23
8.6.1.1. Cultivo celular primario.....	23
8.6.1.2. Subcultivo y criopreservación.....	24
8.6.2. Fase 2 – Cementación y corrosión .....	26
8.6.2.1. Cementación .....	26
8.6.2.2. Corrosión .....	28
8.6.3. Fase 3 – Pruebas de citotoxicidad.....	29
8.6.4. Fase 4 – Microscopía óptica.....	32
8.6.5. Fase 5 – Espectroscopía Raman .....	33
8.6.6. Fase 6 – Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)/Espectroscopia de Energía Dispersiva (EDS).....	34
8.6.7. Fase 7 – Espectrometría de Masas con Fuente de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) .....	34
8.7. Consideraciones bioéticas .....	36
8.8. Análisis estadístico .....	37
<b>9. Resultados.....</b>	<b>38</b>
9.1. Acuse de envío para publicación .....	38
9.2. Resultados adicionales .....	39
9.2.1. Microscopía óptica.....	39
9.2.2. ICP-MS.....	40
<b>10. Discusión.....</b>	<b>42</b>
<b>11. Conclusiones .....</b>	<b>46</b>
<b>12. Referencias.....</b>	<b>47</b>
<b>13. Anexos .....</b>	<b>54</b>
13.1. Anexo 1. Consentimiento informado.....	54
13.2. Anexo 2. Instrumento de medición .....	56
13.3. Anexo 3. Presentación en foros académicos.....	57

## 1. Resumen

**Objetivo:** evaluar la citotoxicidad causada por los productos de corrosión de aparatología de ortodoncia fija metálica en fibroblastos gingivales humanos (HGF) y fibroblastos del ligamento periodontal humanos (HPLF).

**Materiales y métodos:** Se evaluaron tres materiales: brackets metálicos 3M Unitek Gemini (Monrovia, California), arcos NiTi Bio-MEMalloy (Borgatta, Ciudad de México, México) y ligaduras metálicas (TP Orthodontics, Indiana). Estos materiales fueron cementados en dientes humanos extraídos y sometidos a un proceso de corrosión (48 y 72 horas). Se obtuvieron muestras y se inocularon en HGF y HPLF; la viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de reducción de tetrazolio (ensayo MTT) (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2, 5-difeniltetrazolio). Se realizó análisis SEM/EDS en los dispositivos. Las soluciones después de la corrosión se evaluaron mediante espectroscopía Raman e ICP-MS. El análisis estadístico se realizó mediante pruebas de normalidad de Shapiro-Wilks, ANOVA de un factor y post-hoc de Tukey ( $P < 0.05$ ).

**Resultados:** Las muestras en contacto con HGF y HPLF mostraron efectos citotóxicos. Desde el nivel más alto de citotoxicidad como sigue:  $46.1\% \pm 13.8$  (HPLF 48 horas),  $52.01\% \pm 4.95$  (HPLF 72 horas),  $67.8\% \pm 3.1$  (HGF 72 horas) y  $75.8\% \pm 10.6$  (HGF 48 horas). No existieron diferencias estadísticas entre los grupos. El análisis SEM/EDS mostró diferencias visuales y químicas entre los brackets de control, 48 y 72 horas y diferencias visuales en los alambres NiTi. La espectroscopía Raman mostró bandas de absorción correspondientes a los grupos sales, sulfato, metilo y metileno. El análisis ICP-MS evidenció un aumento considerable de cromo y níquel.

**Conclusiones:** los productos de corrosión de los aparatos de ortodoncia fijos metálicos en contacto con HGF y HPLF causaron efectos citotóxicos leves a moderados, mostrando un efecto de hormesis.

## 2. Introducción

Actualmente, se encuentra disponible una gran variedad de diseños de brackets y arcos de ortodoncia, que ofrecen a los ortodoncistas una gama diversa de combinaciones a emplear en las distintas mecánicas de tratamiento. La introducción de arcos más flexibles como los de NiTi o TMA ha aumentado la eficacia del tratamiento y permitido al ortodoncista alargar los intervalos entre citas, sin embargo, el tiempo total de tratamiento con aparatología fija oscila normalmente entre 18 y 24 meses.<sup>1-4</sup> Esto implica mantener la aparatología en boca durante un tiempo prolongado, pudiendo estar los pacientes expuestos a reacciones electroquímicas, fuerzas mecánicas de masticación y desgaste generalizado.<sup>5</sup> Todos estos fenómenos pueden acelerar el proceso de corrosión con la consiguiente liberación de los productos de degradación en el entorno oral.

Los constituyentes de las aleaciones utilizadas en ortodoncia son principalmente níquel, cromo, cobalto, hierro, molibdeno y titanio. Con respecto a la biocompatibilidad, el níquel se destaca entre los otros elementos. Se ha afirmado que los iones que se liberan en la cavidad oral a partir de aparatos de ortodoncia pueden causar algunas manifestaciones clínicas orales.<sup>6</sup> Por otro lado, las alteraciones superficiales de los dispositivos de ortodoncia debido a la corrosión pueden comprometer la estética del aparato, aumentar la fricción durante el deslizamiento, provocar fracturas de alambre y disminuir la expresión de torque en los aparatos preajustados.

La mayoría de las investigaciones sobre la corrosión se han enfocado en evaluar los efectos de arcos de níquel titanio, pero prácticamente no existen estudios que consideren la corrosión resultante de la combinación de brackets, arcos y ligadura, hechos a base de metal. En consecuencia, el objetivo de este estudio fue evaluar la citotoxicidad causada por los productos de corrosión de los tres materiales antes citados sobre fibroblastos gingivales humanos (HGF) y fibroblastos del ligamento periodontal humanos (HPLF), basándose en la ISO 10993-5 "Biological evaluation of medical devices - Part 5: Test for in vitro cytotoxicity".<sup>7</sup> Para evaluar la presencia

de iones metálicos liberados durante el proceso de corrosión así como la topografía y análisis elemental de la aparatología metálica, se realizaron diversos análisis incluyendo microscopía óptica, espectroscopia Raman, Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Espectroscopia de Energía Dispersiva (EDS) y Espectrometría de Masas con Fuente de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS).

### **3. Antecedentes**

#### **Brackets**

##### **Bracket edgewise original**

El aparato de ortodoncia fijo multibanda, introducido por Angle en 1928,<sup>8</sup> involucraba un arco labial rectangular colocado en los brackets o tubos fijados en bandas que se cementaban a los dientes de manera individual. El bracket edgewise original presentado por Angle era un solo bracket angosto con un juego de aletas, inferior a un bracket gemelar sobre control rotatorio e inclinación, aunque producía una ligera fuerza ortodónica debido al aumento de la distancia interbracket.

##### **Diseños posteriores y brackets de acero inoxidable tradicionales**

Para superar la ineficacia de un solo bracket para controlar la rotación y la inclinación de un diente, se introdujo el bracket Lewis<sup>9</sup>, que tenía aletas de extensión mesiales y distales en contacto con la parte inferior del arco. Posteriormente, un bracket de doble ancho, con dos juegos de aletas, que permitió un mejor control de rotación, así como de la posición de la raíz en dirección mesiodistal, fue introducido por Brainerd Swain y al cual se llamó el bracket Siamés (actualmente denominado bracket gemelo).<sup>10</sup>

Después de que Buonocore<sup>11</sup> introdujera la técnica de grabado ácido en la década de 1950 y Newman<sup>12</sup> introdujera la adhesión directa de los brackets de ortodoncia al esmalte a mediados de la década de 1960, los sistemas que utilizaban adhesivos a base de resinas se hicieron populares en la ortodoncia clínica. Típicamente, el bracket tradicional de acero inoxidable consiste en una base, ranura(s) y aletas. Para lograr un nivel clínicamente adecuado de resistencia de adhesión, los fabricantes han utilizado una variedad de diseños de base para los brackets metálicos, tales como malla soldada, rebajada por fresado, pulida con chorro de

arena y químicamente grabada, lo cual se señala en un artículo de revisión publicado a principios de los años 90.<sup>13</sup>

### **Tamaño de la ranura del bracket**

Los dos tamaños de ranura de bracket más comúnmente utilizados son 0.018x0.025” y 0.022x0.028”. Junto con el ancho del bracket (simple o doble), el tamaño de la ranura del bracket es de fundamental importancia en la ortodoncia clínica, ya que influye en el "juego" entre el arco y la ranura del bracket, que indica cuántos grados debe girar el arco dentro del bracket antes de que sus bordes entren en contacto con la pared de la ranura. El ancho de ranura de .022“ produce una fuerza ortodóncica más ligera que la ranura de .018”, y puede proporcionar una fuerza más cómoda al inicio del tratamiento.

### **Aparato de arco recto**

En el aparato edgewise estándar tradicional, la orientación de la ranura del bracket forma ángulos rectos con respecto al eje longitudinal del diente, y el grosor de la base del bracket es el mismo para todos los tipos de dientes. Durante el tratamiento, se incorporan dobleces en el arco para posicionar individualmente cada diente en dirección buco-lingual (in-out o dobleces de primer orden), así como para idealizar la angulación del eje longitudinal del diente en dirección mesiodistal (tip o dobleces de segundo orden) y en dirección bucolingual (torque o dobleces de tercer orden).

El aparato de arco recto (straight-wire appliance) fue introducido por Andrews a través de una serie de artículos en el Journal of Clinical Orthodontics durante 1976. En este aparato, la información de los dobleces de alambre se incorpora en los brackets, de manera preajustada para cada diente, variando el grosor de la base y la angulación de la ranura con respecto al eje longitudinal del diente, tanto en dirección mesiodistal como en la bucolingual. El principal logro del aparato de arco recto fue simplificar el tratamiento de ortodoncia al minimizar la necesidad de



realizar dobleces de alambre, que requiere mucho tiempo, para el acabado y el detallado de los casos, así como hacer que el tratamiento sea más eficiente desde el principio.

## **Brackets metálicos**

Los brackets metálicos tienen una larga historia con resultados clínicos exitosos en la terapia ortodóncica. Inicialmente, los brackets metálicos se fabricaron a partir de una variedad de aleaciones de acero inoxidable en las que la base y las aletas se fabricaron por colado y/o maquinado, y se unían las diferentes partes mediante soldadura. Avances recientes en tecnología de fabricación, como soldadura láser y moldeo por inyección de metal (MIM), así como en nuevos materiales, han enriquecido el mercado de la ortodoncia con brackets de titanio y sus aleaciones, aleaciones de cobalto-cromo y aleaciones de oro.<sup>14</sup>

Todos estos avances han sido resultado de la necesidad de que los brackets posean una amplia gama de propiedades un tanto contradictorias. Desde un punto de vista mecánico, la aleta, que está en contacto con el alambre de ortodoncia, debe fabricarse de una aleación que tenga un módulo de elasticidad relativamente alto para minimizar el gasto de energía transferido por el alambre de la indeseable deformación plástica localizada y suficientemente dura para minimizar el desgaste inducido durante el movimiento del alambre en la ranura. Por otro lado, la base del bracket en contacto con el esmalte dental debe ser capaz de deformarse lo suficiente para facilitar el desprendimiento de la superficie del esmalte al final del tratamiento.<sup>15</sup>

## **Aleaciones de brackets de acero inoxidable tradicionales y procesos de fabricación**

Se ha empleado una variedad de aleaciones inoxidables para la producción de los componentes de las aletas y la base de los brackets inoxidables, siendo los más

populares el 303, 304, 316 y 17-4 PH (precipitation-hardening, endurecimiento por precipitación).<sup>16</sup>

Dado que el acero inoxidable 17-4 PH endurecido por precipitación muestra propiedades mecánicas mucho más altas que las de los aceros inoxidables austeníticos 303, 204 y 316/316L, esta aleación puede ser ventajosa para los brackets sobre el control del movimiento de los dientes. Sin embargo, se ha observado la baja resistencia a la corrosión localizada de los aceros inoxidables 304 y 17-4 PH en soluciones de cloruro agresivo.<sup>17</sup> Dado que la biocompatibilidad está estrechamente relacionada con las propiedades de corrosión, ha habido un interés considerable en la corrosión de las aleaciones ortodóncicas en el entorno oral y en las reacciones alérgicas al níquel que ocurren en algunos pacientes.<sup>18-20</sup> El acero inoxidable 2205 sin níquel, tanto con austenita como ferrita en la microestructura, se ha utilizado para la fabricación de brackets, y es bien sabido en la ciencia de los materiales de ingeniería que esta aleación presenta una mayor dureza y menos corrosión por fisuras que los aceros inoxidables convencionales con la estructura austenítica.<sup>21</sup>

Los componentes de los brackets de acero inoxidable se fabricaban tradicionalmente mediante fundición o fresado. Sin embargo, la fundición es muy costosa ya que una gran parte del metal (~90%) se desperdicia en bebederos y conductos. Asimismo, durante el maquinado, entre 50 y 75% de la aleación puede convertirse en chatarra. Después de la producción de ambos componentes, la unión de las aletas a la base se logra mediante soldadura, para lo cual se coloca una aleación de relleno en la interfaz de la base-aleta. Aunque la capacidad de soldadura del acero inoxidable depende de la composición elemental específica de la aleación, la mayoría de los aceros inoxidables se pueden soldar fácilmente utilizando diferentes familias de aleaciones de relleno que incluyen aleaciones de plata, níquel, cobre y oro.<sup>22</sup> Inicialmente, se utilizaron con frecuencia aleaciones de relleno con base de plata en los procesos de fabricación de brackets, aunque se ven afectados por la presencia de cadmio, un elemento que se usa para mejorar la

humectación y disminuir la temperatura de fusión de la aleación.<sup>23,24</sup> Sin embargo, esta unión de base-aleta es propensa a la corrosión galvánica, lo que a su vez induce la liberación iónica de cobre y zinc, que son elementos típicos en las aleaciones de relleno a base de plata. Más allá de los problemas de biocompatibilidad, la disolución progresiva de la aleación de soldadura puede resultar en el desprendimiento de las aletas de la base durante la remoción del bracket del esmalte.

Para superar esta limitación, algunos fabricantes han usado una aleación a base de oro para soldar las aletas a la base. Sin embargo, en esta unión galvánica, las aleaciones de oro eran más anódicas que el acero inoxidable, lo que provocó una corrosión intraoral de las bases del bracket<sup>25</sup> y la lixiviación de Ni<sup>26</sup>, lo cual es una gran preocupación para la salud del paciente debido a las reacciones alérgicas y los efectos citotóxicos. Para minimizar la unión galvánica entre el acero inoxidable y la aleación de soldadura de oro, se adoptaron aleaciones de soldadura a base de níquel. Sin embargo, actualmente no hay datos clínicos o experimentales para el comportamiento de corrosión de estas aleaciones de soldadura. En resumen, ninguna aleación actualmente disponible para soldadura puede cumplir todos los requisitos, incluida la compatibilidad con el acero inoxidable, la resistencia mecánica suficiente de los componentes unidos y la minimización del acoplamiento galvánico con el acero inoxidable. El desarrollo de aleaciones de soldadura apropiadas para los brackets de ortodoncia de acero inoxidable es un área prometedora para futuras investigaciones.

### **Fabricación de brackets mediante Moldeo por Inyección de Metal (MIM)**

Un nuevo método para la producción de piezas metálicas, comúnmente conocido como moldeo por inyección de metal (MIM), se desarrolló a principios de la década de 1980 y fue adoptado por los fabricantes de dispositivos de ortodoncia. En este método, los polvos metálicos se mezclan con aglutinantes orgánicos, produciendo una mezcla homogénea; esta mezcla luego se inyecta en una máquina de moldeo

que proporciona a las partes inyectadas la geometría final deseada. Sin embargo, la geometría está sobredimensionada en un 20% para compensar la contracción posterior durante la etapa de cocción. El siguiente paso es el "desbastado", donde más del 90% del aglutinante se elimina utilizando un disolvente, calor o una combinación de ambos. En la etapa final, las piezas se sinterizan a altas temperaturas, y los brackets sufren una contracción de hasta el 22%, alcanzando las dimensiones deseadas y más del 97% de la densidad teórica del material utilizado.<sup>15</sup>

El método MIM es el proceso de producción menos costoso para los brackets de ortodoncia, debido al considerable ahorro de material en comparación con la fundición y el maquinado. Dos de las aleaciones de acero inoxidable utilizadas para la producción de brackets convencionales (tipos 316 y 17-4 PH) también se han utilizado con MIM para la producción de brackets de ortodoncia. También se han empleado otras aleaciones de hierro-cromo y de cromo-cobalto.<sup>27</sup>

Dado que los brackets producidos por MIM son dispositivos de una sola pieza, no tienen ninguna preocupación sobre el acoplamiento galvánico con la aleación de soldadura, como es el caso de los brackets convencionales. Sin embargo, se debe tener en cuenta que las propiedades electroquímicas y la biocompatibilidad pueden ser muy diferentes entre las diferentes aleaciones, incluso con formulaciones similares. Por otra parte, la porosidad interna se ha identificado en todos los brackets disponibles comercialmente, que puede atribuirse a la contracción durante la etapa final. El desarrollo de la porosidad es un problema bien conocido para los productos MIM, y afecta negativamente las propiedades mecánicas y electroquímicas. Un estudio anterior informó que la dureza Vickers de los brackets MIM oscilaba entre 154 y 287<sup>28</sup>, muy inferior a la dureza Vickers de 400 aproximadamente para las aleaciones de acero inoxidable utilizadas en brackets convencionales. Esta diferencia puede aumentar los fenómenos de desgaste que se producen durante la activación del arco, especialmente cuando se usan arcos de acero inoxidable muy duros (dureza Vickers de 530 a 600)<sup>29</sup>. Aunque el MIM

proporciona avances tanto económicos como tecnológicos, será necesaria una extensa investigación clínica y de laboratorio para optimizar las propiedades de los brackets ortodóncicos fabricados mediante este proceso.

## **Fibroblastos**

Los fibroblastos son células de origen mesodérmico presentes en todas las formas de tejido conectivo. Son los menos especializados de los tipos de células del tejido conectivo. El papel principal de los fibroblastos es la producción de proteínas y polisacáridos que se secretan en la matriz extracelular. Las combinaciones apropiadas de estos productos sintéticos derivados de fibroblastos confieren a cada forma de tejido conectivo unas características mecánicas y físicas adecuadas. La composición de la matriz extracelular producida por los fibroblastos está marcada por factores microambientales locales. Algunos fibroblastos conservan la capacidad de diferenciarse en tipos más especializados de células de tejido conectivo, incluidos condrocitos, osteocitos, adipocitos y células del músculo liso. Estos fibroblastos multipotenciales también se conocen como células mesenquimales.<sup>30</sup>

Los fibroblastos también funcionan como células accesorias en muchas respuestas inmunes e inflamatorias. Estos pueden producir o responder a una amplia variedad de citoquinas, y estos mediadores permiten que los fibroblastos y los leucocitos cooperen durante procesos complejos como la curación de heridas.<sup>31,32</sup> Los fibroblastos son capaces de modificar la salida de componentes de la matriz extracelular en respuesta a mediadores liberados por otros tipos de células.

En tejidos conectivos blandos tales como el ligamento periodontal sano o la encía, los fibroblastos constituyen, por mucho, el tipo de célula más abundante. Como el tipo celular predominante en el tejido conectivo periodontal, el fibroblasto se considera un componente celular importante en la enfermedad periodontal. Los fibroblastos gingivales, como los fibroblastos en otros tejidos conectivos, sintetizan y secretan las fibras de colágeno, así como la elastina, las proteínas no colágenas, las glucoproteínas y los glicosaminoglicanos. En el periodonto inflamatorio, contribuyen a la patogénesis de la enfermedad periodontal por una exuberante secreción de mediadores inflamatorios, metaloproteinasas de matriz y citoquinas.<sup>33</sup>

## **Estructura del fibroblasto**

Bajo el microscopio de luz, los fibroblastos son normalmente reconocidos en asociación con agrupaciones de fibras colágenas. En reposo, en cortes coloreados con hematoxilina-eosina, estos se presentan como células achatadas o ahusadas, con finas prolongaciones, núcleo oval cerrado, algo achatado, y escaso citoplasma. Contiene 1-2 nucléolos, y escasa cromatina finamente granulada. En actividad (como es el caso del fibroblasto del ligamento periodontal), presenta un núcleo abierto, con una coloración pálida y mucho más contenido citoplasmático.

Bajo el microscopio electrónico, los fibroblastos activos cuentan con una gran cantidad de organelos complementarios dentro de los que se observan numerosos complejos de Golgi y perfiles de retículo endoplásmico rugoso, mitocondria y vesículas secretoras, todos indicativos de la actividad sintética y secretora manifiesta por este tipo de células. Asimismo, es posible apreciar la presencia de un citoesqueleto complejo, constituido por un sistema de microtúbulos y microfilamentos, los cuales completan el patrón de complejidad estructural de esta célula multifuncional.

## **Proceso de envejecimiento del fibroblasto**

Una vez diferenciados, los fibroblastos poseen la capacidad de replicarse mediante divisiones mitóticas. En cultivos de fibroblastos de tejido embrionario, estos pueden experimentar aproximadamente 50 divisiones antes de que adquieran una condición de senescencia y mueran. Sin embargo, este número se reduce a 20 cuando los fibroblastos provienen de tejido adulto.

## **Heterogeneidad del fibroblasto en el periodonto**

El fibroblasto juega un papel determinante en los procesos de recambio celular. Diversos estudios han provisto la evidencia para sustentar esta afirmación; sin embargo, aún persisten muchos vacíos en cuanto a la existencia de marcadores de

superficie específicos, que permitan diferenciar claramente entre los fibroblastos del ligamento periodontal (HPLF) y los fibroblastos gingivales (HGF), y sus correspondientes subpoblaciones.

Existen 2 tipos de fibroblastos periodontales, principalmente definidos por su localización dentro del tejido. El fibroblasto gingival (HGF) construye el tejido conectivo blando que rodea el hueso alveolar (encía). Estos fibroblastos producen y mantienen los componentes extracelulares que proveen la integridad del tejido. El fibroblasto del ligamento periodontal (HPLF) es la célula principal del ligamento que rodea la porción radicular del diente, produce y mantiene la inserción del tejido conectivo que provee anclaje firme del mismo dentro del alvéolo. El colágeno es el componente estructural primordial y el HPLF es el responsable por el remodelado extenso y rápido de las fibras de inserción.

### **Tasa de proliferación**

En varios estudios *in vitro* que requieren el cultivo de estos tipos celulares se han encontrado diferencias en las tasas de proliferación y confluencia. Giannopoulou *et al.*<sup>34</sup> observaron que para el día 20 de cultivo se encontraban HPLF y HGF en crecimiento a partir de los explantes procesados de las biopsias. Este crecimiento continuó hasta el día 30 a 35, en el cual las células revelaron confluencia suficiente para ser tripsinizadas. En general, en estos cultivos primarios, la proliferación de los HGF fue más rápida que la de los HPLF; sin embargo, la diferencia en la tasa de proliferación no fue estadísticamente significativa, aunque se encontró una viabilidad celular del 98%, mediante la técnica de exclusión con azul tripán. De forma similar, Mariotti y Cochran<sup>35</sup>, observaron que durante el cultivo de estas dos clases de fibroblastos, aquellos derivados de la encía (HGF) hallaron confluencia en el día 4, mientras que los HPLF sólo la alcanzaron en el día 6. Ellos atribuyen esta diferencia en la tasa de proliferación a que las células gingivales son de mayor tamaño que los HPLF, lo cual a su vez se apoya sobre su hallazgo de que el contenido proteico y de DNA es inicialmente mayor para los HGF.



#### 4. Planteamiento del problema

A pesar de que actualmente están disponibles en el mercado diversos tipos de brackets, hechos a base de materiales estéticos como la alúmina, la zirconia o el policarbonato, los metálicos siguen siendo los más utilizados, brindando excelentes resultados. Así mismo, es de uso rutinario en ortodoncia, el empleo de arcos y ligadura metálica, los cuales están hechos de distintas aleaciones.

Como todos los metales, los utilizados en la boca son susceptibles de sufrir corrosión, la cual se potencializa con las condiciones que imperan en el ambiente bucal. Teniendo en cuenta que los tratamientos con aparatología fija ortodóncica pueden durar meses o años, cobra importancia el conocer los posibles efectos adversos de la liberación de productos de corrosión en los tejidos orales.

Dicho fenómeno puede ser reproducible de manera *in vitro*, simulando las condiciones orales en conjunto con aparatología fija cementada y siendo susceptibles de medición los resultados encontrados.

De acuerdo con lo anterior, surge la siguiente pregunta de investigación,

*¿Los productos de corrosión de aparatología fija causan efectos citotóxicos en fibroblastos gingivales humanos y fibroblastos del ligamento periodontal humanos?*

## 5. Justificación

En ortodoncia, diversas aleaciones metálicas son utilizadas para la fabricación de brackets, arcos, bandas y tubos, entre otros. Estas aleaciones están hechas principalmente de acero inoxidable, níquel, titanio, cromo y cobalto.<sup>6,36,37</sup> La influencia de estos metales sobre la proliferación celular y viabilidad ha sido objeto de estudio para determinar su toxicidad *in vitro*.<sup>38</sup> Esto es debido a que cuando se liberan iones metálicos en sitios del tejido, estos pueden presentar síntomas similares a las reacciones alérgicas, por ejemplo, inflamación de la piel o las membranas mucosas.<sup>39,40</sup> En el caso de la cavidad oral, se ha reportado que la liberación de iones por aparatología ortodóncica puede causar algunas manifestaciones clínicas tales como glositis, sabor a metal, gingivitis, desprendimiento del tejido labial, eritema multiforme e hipertrofia gingival.<sup>41-44</sup>

El ambiente oral es particularmente ideal para la degradación de metales, facilitando el proceso de corrosión de brackets y otros materiales metálicos usados en ortodoncia.<sup>45-47</sup> Condiciones orales como la temperatura, la cantidad y acidez de la saliva, la presencia de ciertas enzimas, así como las propiedades físicas y químicas de alimentos sólidos y líquidos pueden influenciar los procesos de corrosión.<sup>48</sup> El comportamiento corrosivo de estos materiales es un factor decisivo a la hora de evaluar su biocompatibilidad, siendo la resistencia a la corrosión una propiedad crucial de los metales y las aleaciones metálicas aplicadas a los brackets y alambres, principalmente. En el caso de alambres en ortodoncia, el níquel es uno de los metales más utilizados en la fabricación de arcos, incluido en las aleaciones de NiTi, CuNiTi y acero inoxidable. Se sabe que el níquel es el metal que más comúnmente causa dermatitis de contacto e induce más casos de reacciones alérgicas, reportando que una concentración de 30 mg/L aproximadamente, puede ser suficiente para desencadenar una respuesta citotóxica.<sup>6,49</sup> Tomando en cuenta las cuestiones citadas, es de vital importancia que los clínicos estén informados sobre las limitaciones y los riesgos potenciales de usar este tipo de materiales.

## **6. Hipótesis**

### **Hipótesis de investigación (H<sub>1</sub>)**

- ❖ Los productos de corrosión de aparatología fija metálica causan efectos citotóxicos severos, reduciendo más del 70% de la viabilidad celular de fibroblastos gingivales humanos (HGF) y fibroblastos del ligamento periodontal humanos (HPLF).

### **Hipótesis nula (H<sub>0</sub>)**

- ❖ Los productos de corrosión de aparatología fija metálica causan efectos citotóxicos leves a moderados, reduciendo menos del 70% de la viabilidad celular de fibroblastos gingivales humanos (HGF) y fibroblastos del ligamento periodontal humanos (HPLF).

## 7. Objetivos

### Objetivo general

- ❖ Evaluar la citotoxicidad causada por los productos de corrosión de aparatología fija metálica en fibroblastos gingivales humanos (HGF) y fibroblastos del ligamento periodontal humanos (HPLF) en un modelo *in vitro*.

### Objetivos específicos

- ❖ Establecer cultivos primarios de HGF y HPLF.
- ❖ Determinar los efectos citotóxicos, concentración citotóxica media (CC<sub>50</sub>) y capacidad proliferativa de las células orales en contacto con los productos de corrosión de aparatología fija metálica con base en la ISO 10993-5 "Biological evaluation of medical devices - Part 5: Test for *in vitro* cytotoxicity"<sup>7</sup>.
- ❖ Evaluar la topografía y composición elemental de la aparatología fija mediante análisis SEM/EDS.
- ❖ Analizar la composición química de los productos de corrosión por medio de espectroscopía Raman y análisis ICP-MS.

## 8. Materiales y métodos

### Diseño del estudio

**Tipo de estudio:** experimental *in vitro*, prospectivo y comparativo.

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria en el área de Nanoestructuras y Biomateriales de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) – Unidad León, UNAM.

### Población y universo de estudio

**Universo de estudio:** Número de células orales cultivadas y establecidas de tejidos orales humanos.

### Muestreo

**Muestra:** Probabilística.

**Método de muestreo:** Aleatorio simple.

**Tamaño:**  $n = 15$  platos de 96 pocillos a densidades de  $4 \times 10^5$  células/ml. Los ensayos se realizaron por triplicado de tres experimentos independientes para obtener reproducibilidad ( $n=15$ ).

### Criterios de selección

La selección de platos de pocillos con contenido celular se llevó tomando en cuenta las siguientes características.

### Inclusión

- Platos de 96 pocillos a densidades de  $4 \times 10^5$  células/ml.

## Exclusión

- Platos de cultivo que presentaran defectos de fabricación.

## Eliminación

- Platos de cultivo con pérdida del contenido durante su manipulación.
- Platos de cultivo con presencia de contaminación.
- Platos de cultivo en los que se vertieran cantidades inadecuadas de los productos de corrosión o se hiciera una disolución errónea.

## VARIABLES DE ESTUDIO

### VARIABLES DEPENDIENTES

**Tabla 1.** Definición conceptual y operacional de variables dependientes

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición
Citotoxicidad	Daño celular provocado por la acción de anticuerpos específicos y complemento o por células citotóxicas.	Se emplearán líneas celulares HGF y HPLF en contacto con los productos de corrosión derivados del proceso de desmineralización-remineralización de dientes con aparatología fija cementada. Se utilizará ensayo MTT para el análisis de viabilidad celular.	Cuantitativa continua	De razón 0-n cel (%)

## Variables independientes

**Tabla 2.** Definición conceptual y operacional de variables independientes

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición
Dilución	Reducción de la concentración de una sustancia química en una disolución.	Se realizarán diluciones del 0-100% de los productos de corrosión en contacto con HGF y HPLF.	Cuantitativa	De razón ml
Tiempo de proliferación celular	Incremento del número de células por división celular cuantificadas por medio de conteo celular con hematocitómetro.	Rango temporal a partir de la incubación con los productos de corrosión a las 24 horas	Cuantitativa discreta	De razón 0-n horas de incubación

## Procedimiento

Se establecieron 7 fases para este estudio:

1. Aislamiento celular
2. Cementación y corrosión
3. Pruebas de citotoxicidad
4. Microscopía óptica
5. Espectroscopía Raman
6. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)/ Espectroscopia de Energía Dispersiva (EDS)
7. Espectrometría de Masas con Fuente de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS)

## Fase 1 – Aislamiento celular

### Cultivo celular primario

La metodología para el establecimiento de cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos (HGF) se describe en la Figura 1.

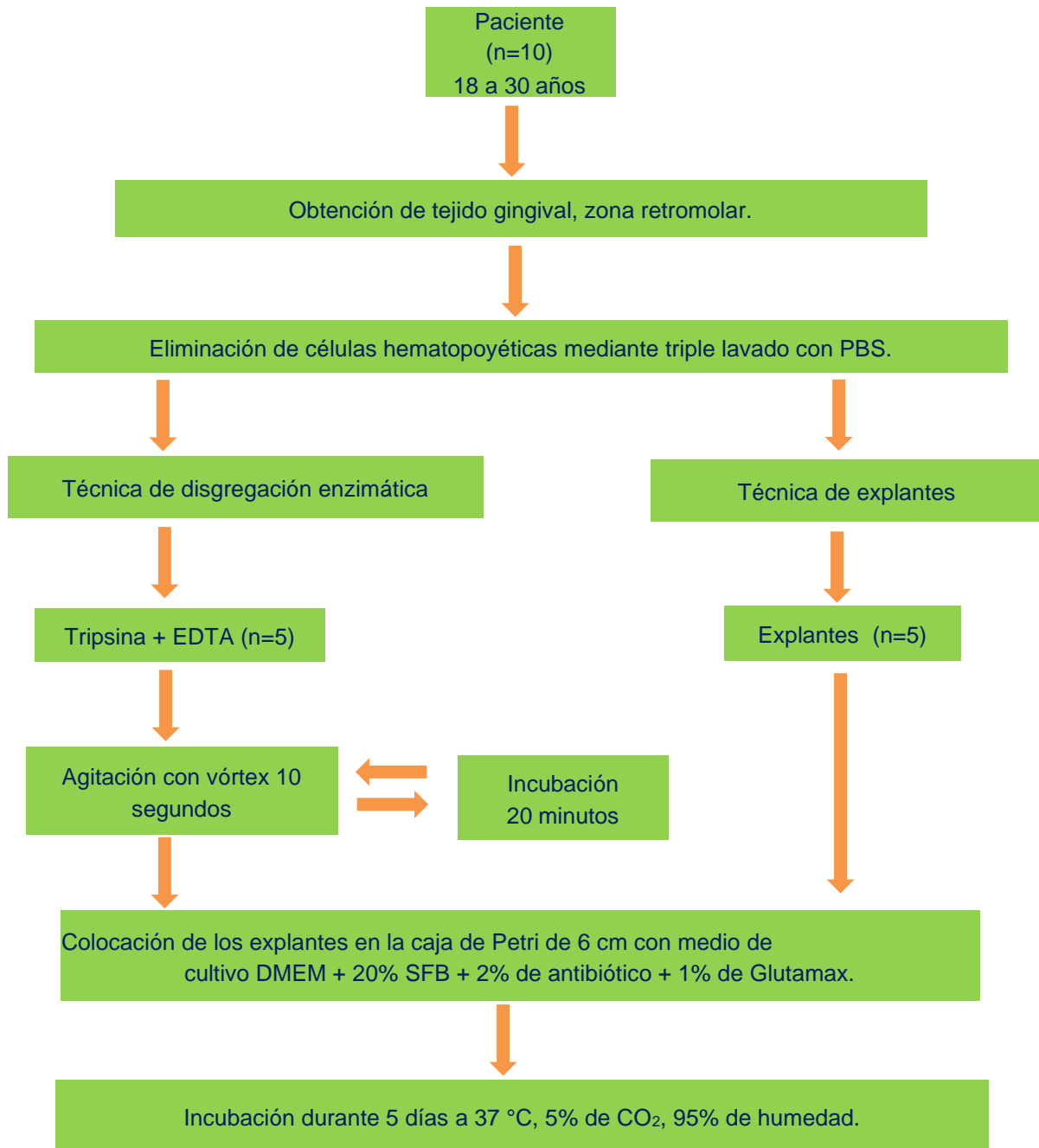


Figura 1. Metodología para el establecimiento de cultivos primarios de fibroblastos gingivales.<sup>50-52</sup>

### Subcultivo y criopreservación

La metodología para el subcultivo y criopreservación de fibroblastos gingivales (HGF) y del ligamento periodontal humanos (HPLF) se describe en la Figura 2.



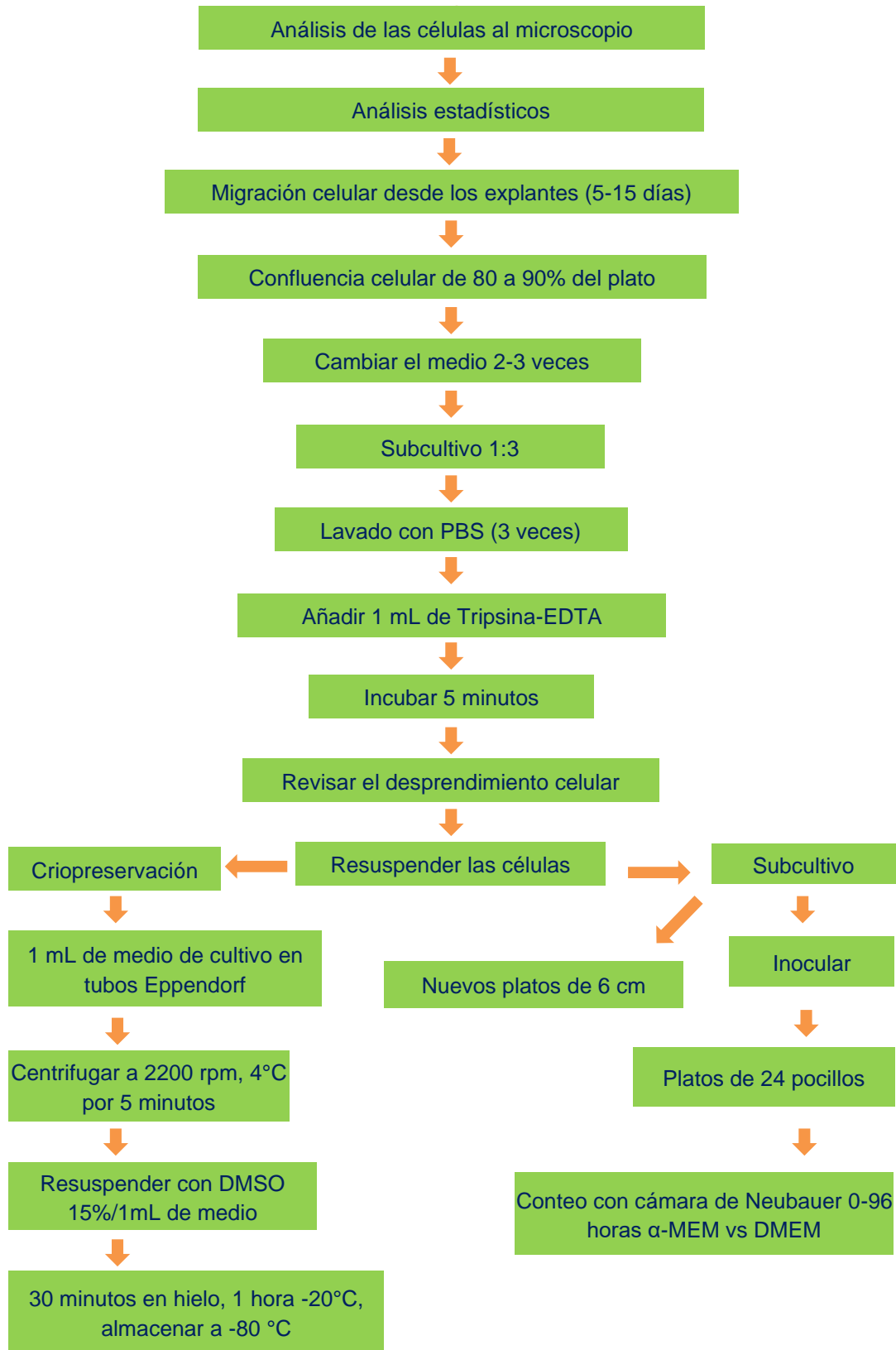


Figura 2. Metodología para subcultivo y criopreservación.<sup>51,52</sup>

## Fase 2 – Cementación y corrosión

### Cementación

Para la preparación de las muestras de aparatología fija, se utilizaron tres distintos materiales metálicos (Figura 3) para su evaluación:

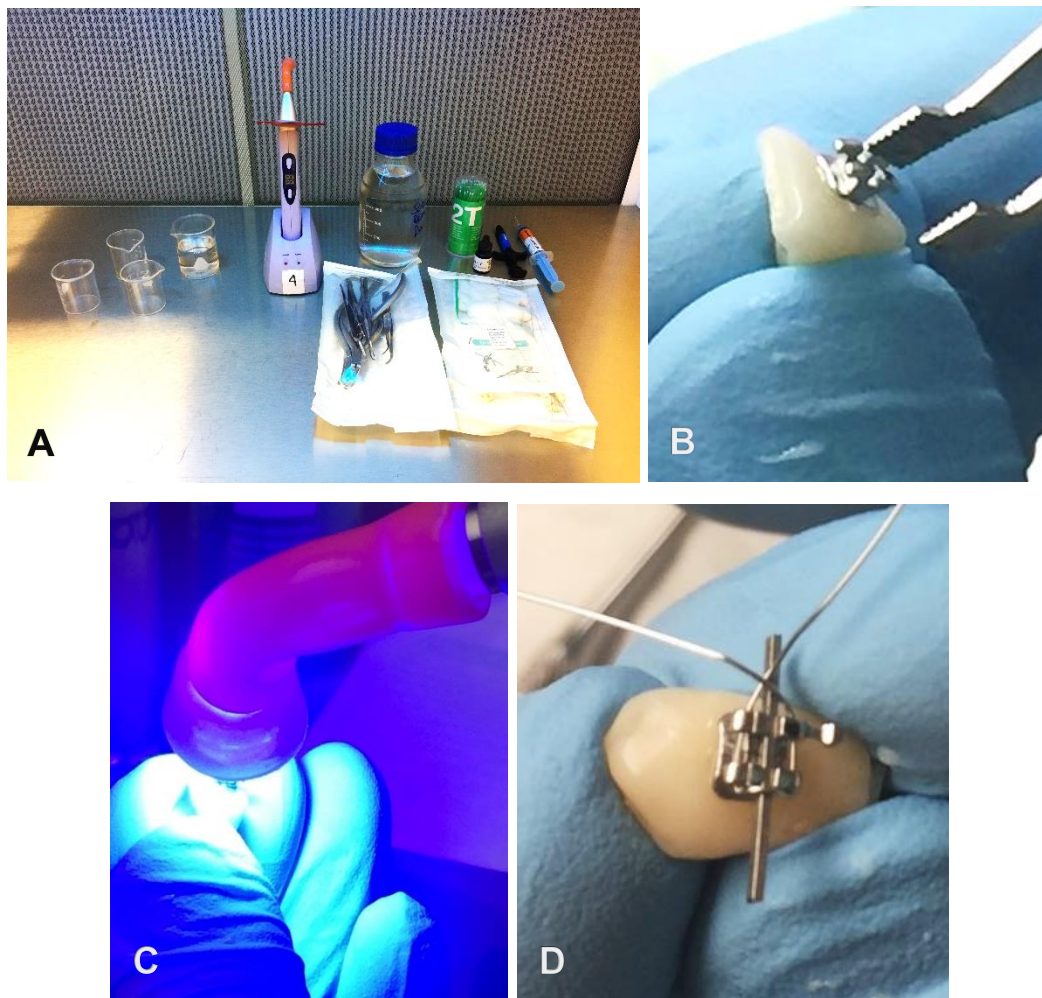
- Brackets convencionales de acero inoxidable slot 0.022" 3M Unitek (Monrovia, Minnesota, EE. UU.),
- Arcos de alambre de níquel titanio termo-activo 0.021"x0.025" Bio-MEMalloy (Borgatta, Ciudad de México, México) y
- Ligaduras metálicas preformadas de .010" (TP Orthodontics, Indiana, USA).



**Figura 3.** Materiales metálicos evaluados. **A.** Brackets convencionales de acero inoxidable, 3M Unitek. **B.** Arcos NiTi Bio-MEMalloy, Borgatta. **C.** Ligaduras preformadas, TP Orthodontics.

Se prepararon las muestras, cementando cada bracket a dientes humanos extraídos, con un sistema de adhesión fotopolimerizable (Enlight, Ormco, California)

según lo recomendado por el fabricante. Después, un segmento de alambre de níquel titanio, con una longitud recta de 10 mm, se fijó a la ranura de cada bracket con una ligadura metálica (Figura 4). Se realizaron muestras experimentales y de control (n = 18), de acuerdo con la Organización Internacional de Normalización (ISO) 10993-5.<sup>7</sup> Se incluyeron muestras experimentales (n = 15) para el proceso de corrosión (cinco experimentos por triplicado) y las muestras de control (n = 3 ) se refieren a los dientes que se mantuvieron para análisis por microscopía óptica y SEM/EDS.



**Figura 4.** Cementación de aparatología fija ortodóncica a dientes extraídos. **A.** Material e instrumental estéril en campana de flujo laminar. **B.** Posicionamiento de bracket. **C.** Aplicación de luz con lámpara de fotocurado. **D.** Sujeción de alambre NiTi mediante ligadura metálica.

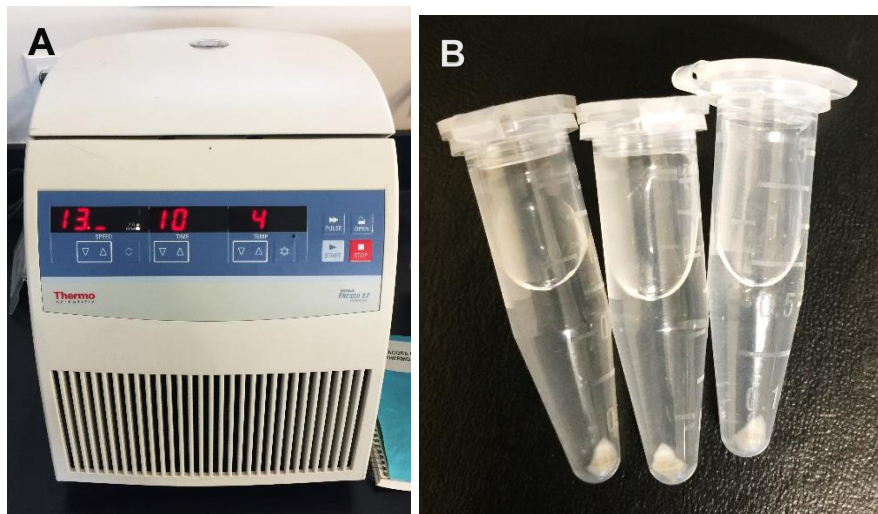
## Corrosión

Se esterilizaron tres muestras y se sumergieron en una solución desmineralizante ( $\text{CaCl}_2$  1,5 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,9 mM, KCl 150 mM y  $\text{CH}_3\text{COONa}$  0,1 mM)<sup>53</sup>, y se indujo un proceso de corrosión añadiendo ácido clorhídrico (HCl); el pH se ajustó a 4.5 y las muestras se mantuvieron a 37°C y 250 rpm en una incubadora con agitador. Cada 12 horas, se midió el pH y se añadió HCl para mantener un pH constante de 4.5, y se mantuvo en agitación bajo las mismas condiciones (Figura 5). El HCl es un conocido líquido altamente corrosivo y ácido.



**Figura 5.** Corrosión de aparatología metálica. **A.** Medición de pH de la solución corrosiva. **B.** Muestras en incubadora con agitación. **C.** Potenciómetro para medir pH.

Después de 48 horas, se tomaron muestras de la solución y se colocaron en tubos Eppendorf de 1 ml y se centrifugaron durante 10 minutos a 13,300 rpm (Figura 6). Después de la aspiración del sobrenadante, se añadió medio de cultivo, Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (Gibco, Carlsbad, California) a los productos de corrosión sedimentados para su posterior inoculación en las células. La relación entre el volumen de la dilución final y el peso de las muestras fue de 1 ml/0.1 mg, según lo recomendado por la Organización Internacional de Normalización.



**Figura 6.** Centrifugación de muestras obtenidas después del proceso de corrosión de 48 y 72 horas. **A.** Centrífuga de laboratorio. **B.** Muestras en tubos Eppendorf después de ser centrifugados.

El proceso de corrosión se continuó hasta 72 horas, ajustando el pH cada 12 horas y manteniéndolo en incubación en las condiciones mencionadas. De los productos de corrosión de 72 horas, se realizó el mismo procedimiento que con los productos de 48 horas para la inoculación posterior en cultivo celular.

### **Fase 3 – Pruebas de citotoxicidad**

El ensayo de citotoxicidad se realizó en fibroblastos gingivales humanos (HGF) y en fibroblastos del ligamento periodontal humano (HPLF), que fueron cultivados mediante una técnica de explante. Los tejidos gingivales y periodontales fueron

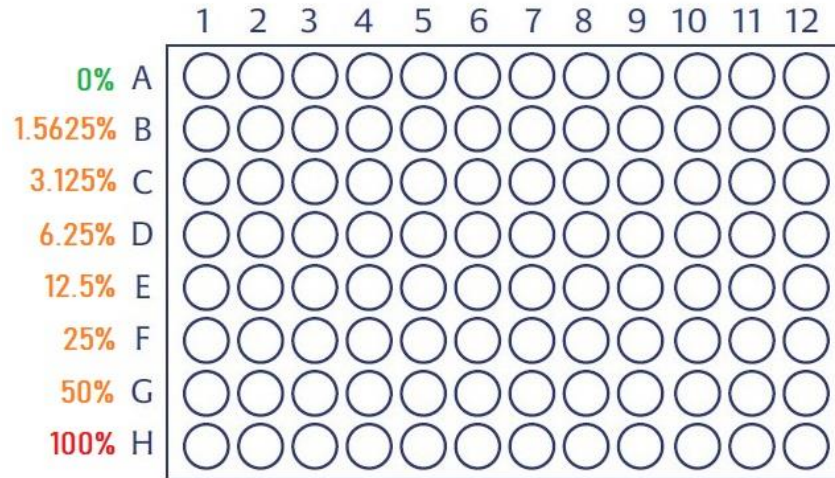
obtenidos de la remoción quirúrgica de terceros molares inferiores de pacientes sanos de entre 18 y 30 años, bajo consentimiento informado (Anexo 1) aprobado por el Comité de Bioética de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (León, Guanajuato, México).

Las células fueron mantenidas en medio de cultivo DMEM (Gibco, Carlsbad, CA), adicionado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) y 100 U/mL de penicilina-estreptomicina (Gibco), en concentraciones de  $4 \times 10^5$  células/ml. Las células se sembraron en placas estériles de 96 pocillos (Figura 7), inoculando 100  $\mu$ l/pocillo e incubando durante 24 horas a 37°C en una atmósfera húmeda de 95% y 5% de CO<sub>2</sub>.



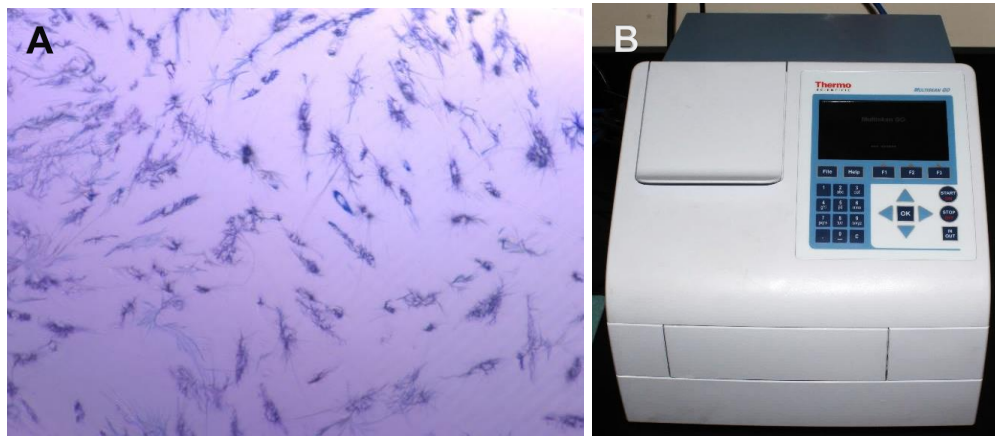
**Figura 7. A.** Inoculación de células en platos de 96 pocillos. **B.** Platos de 96 pocillos en incubadora de CO<sub>2</sub>.

Luego, se eliminó todo el medio de cultivo en la fila H y se colocaron 200  $\mu$ l de los productos de corrosión centrifugados en el medio de cultivo para las líneas celulares HGF y HPLF. Se dejaron 100  $\mu$ l en la fila H y se inocularon 100  $\mu$ l en la fila G, y se realizaron diluciones de 0-100% a partir de la dosis máxima hasta el 0%. La fila A se mantuvo como grupo de control negativo (Figura 8).



**Figura 8.** Esquematización de las diluciones realizadas.

Las células se incubaron durante 24 horas en las mismas condiciones. La viabilidad celular se determinó mediante un ensayo de bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio (MTT). Después de 24 horas, se eliminó el medio de cultivo y se agregaron 100  $\mu$ l de MTT (0,0002 g/ml en medio de cultivo) a cada pocillo, y las células se incubaron durante 7 horas en condiciones de cultivo estándar. Se aspiraron los sobrenadantes y se agregaron 100  $\mu$ l de dimetilsulfóxido DMSO (Karal, Guanajuato, México). La absorbancia (570 nm) se determinó mediante un espectrofotómetro (Bio-Rad, Hercules, CA) (Figura 9).

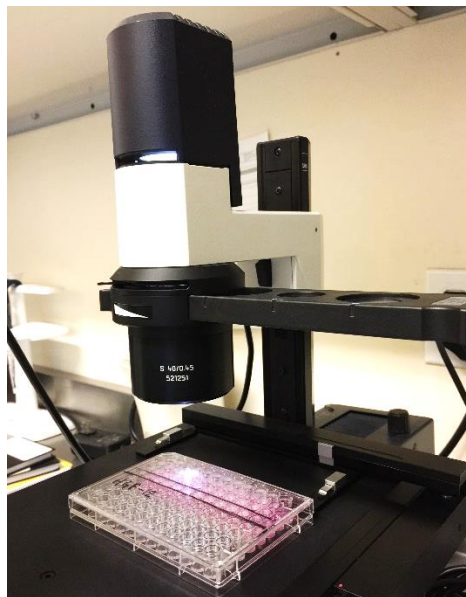


**Figura 9.** Ensayo MTT. **A.** Cristales de formazán que reflejan la actividad mitocondrial celular. **B.** Espectrofotómetro para determinar la cantidad de formazán, después de ser disuelto por acción del dimetilsulfóxido (DMSO).

La citotoxicidad fue clasificada basándose en la viabilidad celular, de acuerdo con Ahrari *et al.*<sup>54</sup>, en las siguientes categorías: no citotóxico (>90% de la viabilidad celular), ligeramente citotóxico (60–90%), moderadamente citotóxico (30–59%), y severamente citotóxico (<30%). Se determinó la concentración citotóxica al 50% (CC<sub>50</sub>); se consideró CC<sub>50</sub> como la concentración de material de prueba requerida para reducir la viabilidad celular en un 50%, en comparación con el control. El mismo método se realizó para productos de corrosión de 48 y 72 horas y los datos se obtuvieron de cinco experimentos diferentes por triplicado (n = 15).

#### **Fase 4 – Microscopía óptica**

El análisis microscópico se realizó tomando fotografías (aumentos 15x) de los dientes y aparatología fija, colocados antes y después del proceso de corrosión, mediante un estereoscopio (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) (Figura 10). Siguiendo el mismo procedimiento, se tomaron imágenes de los cambios morfológicos sufridos por las células a diferentes diluciones.

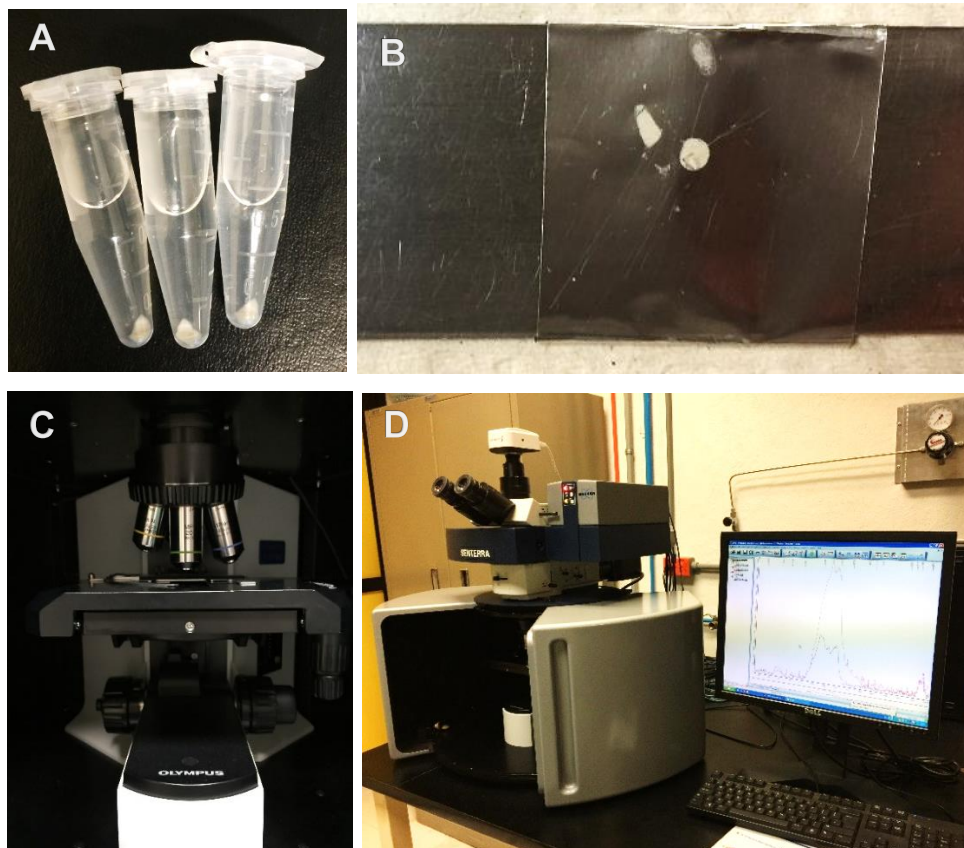


**Figura 10.** Microscopio óptico.



## Fase 5 – Espectroscopía Raman

Las muestras de solución de 48 y 72 horas de los productos de corrosión se analizaron mediante espectroscopia Raman (Figura 11) utilizando un Espectrómetro Raman Dispersivo Senterra (Bruker, Billerica, MA) equipado con un láser de 785 nm y acoplado con un microscopio Olympus. Las muestras se analizaron utilizando los siguientes parámetros: tiempos de integración entre 6 y 8s, 6 a 10 exploraciones, longitud de onda de láser de 785 nm, potencia de 25 mW, resolución de 9-15  $\text{cm}^{-1}$  y objetivo de 20x.



**Figura 11.** A. Muestras de los productos de corrosión. B. Deshidratación de las muestras para análisis de los residuos sólidos. C. Microscopio acoplado a espectrómetro. D. Equipo para espectrometría Raman.

## Fase 6 – Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)/Espectroscopia de Energía Dispersiva (EDS)

Los aparatos fijos de ortodoncia fueron examinados por caracterización topográfica y química. La microestructura de la superficie se evaluó antes y después del proceso de corrosión mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), utilizando un microscopio de mesa TM-1000 (Hitachi, Tokio, Japón) (Figura 12). Se obtuvieron imágenes de la misma área para los brackets (aleta) y alambres NiTi de los controles y muestras de 48 y 72 horas con aumentos de 1000x, 1500x y 3000x, operando a 15 kV. Las características de la superficie se determinaron con base en una evaluación visual. El análisis elemental por Espectroscopia de Energía Dispersiva (EDS) también se realizó, sobre un área de 10x10  $\mu\text{m}$  a 15 kV.

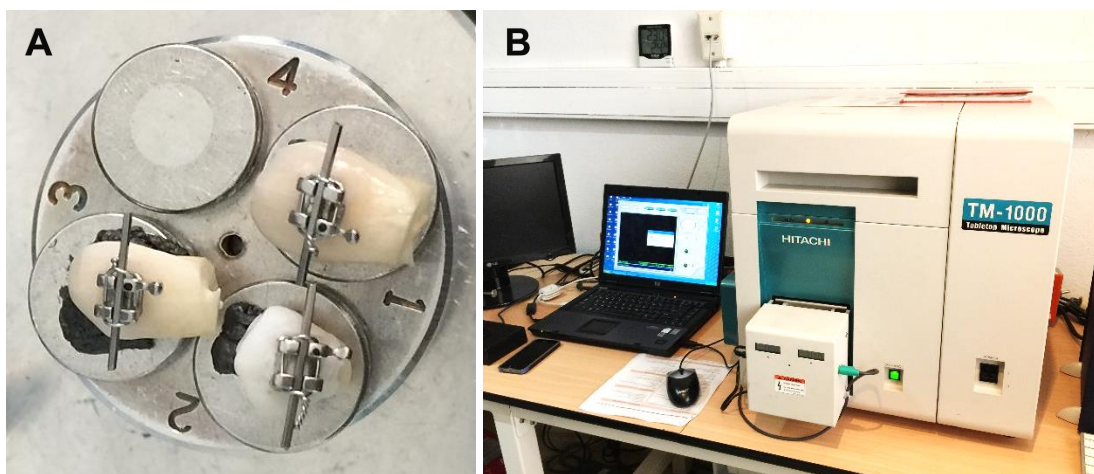


Figura 12. A. Muestras fijadas. B. Microscopio de mesa para análisis SEM/EDS.

## Fase 7 – Espectrometría de Masas con Fuente de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS)

Similar al análisis Raman, se tomaron muestras de las soluciones de 48 y 72 horas de los productos de corrosión y se analizaron mediante un espectrómetro de masas

con fuente de plasma acoplado inductivamente ICP-MS (iCAP Qc, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania) (Figura 13). El instrumento fue optimizado previamente al análisis de las muestras, con una solución acuosa certificada (High Purity Standards, North Charleston, SC), la cual contiene un amplio intervalo de masas (Li, Co, In, Ba, Bi, Ce y U de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ). La curva de calibración se realizó con 16 puntos (0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500,  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) a partir de una solución acuosa certificada (QCS-26, High Purity Standards) de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . El drift instrumental se corrigió con el estándar interno indio (In de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ). El límite de detección (L.D.) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$L.D. = \frac{3(SD \text{ int } BCO)(conc \text{ STD})}{(int \text{ STD} - prom \text{ int } BCO)}$$

Dónde:

*SD int BCO* – Desviación estándar de la intensidad del blanco

*conc STD* – Concentración de la solución estándar

*int STD* – Intensidad de la solución estándar

*prom int BCO* – Promedio de la intensidad del blanco



**Figura 13.** Espectrómetro iCAP Qc. **Fuente:** Instituto de Geofísica, UNAM. Recuperado de <http://www.geofisica.unam.mx/iframes/laboratorios/institucionales/icp/ICP/infraestructura.html>

## **Consideraciones bioéticas**

La presente investigación contempló los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (64ª Asamblea General de octubre de 2013). En el Artículo 7 de este documento se establece que “la investigación médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover y asegurar el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales”. La donación de órganos dentarios no representó daño alguno para los sujetos participantes, pues se realizó posterior a indicación ortodóncica o periodontal. La decisión de extraer un órgano dentario derivó siempre de la prescripción fundamental del Ortodoncista o el Periodoncista, y en ningún caso se vio influenciada por terceras personas.

Además, con apego al Artículo 9, se protegió a las personas que participaron en la investigación, velando por su integridad, salud, intimidad y dignidad, y resguardando su información personal en calidad de confidencialidad. La participación fue voluntaria en todos los casos y cada individuo potencial recibió la información adecuada acerca del proyecto de investigación y de su colaboración en el mismo, de acuerdo con el Artículo 26. Todas las dudas sobre de los objetivos, métodos, disposición de las muestras, beneficios calculados, entre otros, fueron aclaradas por el investigador o por el odontólogo tratante hasta asegurar el completo entendimiento de la información.<sup>55,56</sup>

Asimismo, se cumplieron las leyes y reglamentos vigentes en México, destacando las siguientes consideraciones estipuladas en el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud. Según el Artículo 17, la presente investigación se consideró “con riesgo mínimo”, debido a que involucró la obtención de dientes permanentes extraídos por indicación terapéutica, así como de muestras de tejido gingival para el caso de los cultivos celulares.

En el caso en el que el paciente fuera mayor de edad (donación de órganos dentarios, muestra de tejido gingival) firmó, junto con dos testigos, un escrito de

consentimiento informado que reunió los requisitos enunciados en el Artículo 22. Cuando el paciente fuera menor de edad (donación de órganos dentarios), firmó un escrito de asentimiento informado, conforme a lo establecido en el Artículo 37 y su representante legal y dos testigos firmaron el consentimiento informado que reunió los requisitos enunciados en el Artículo 22.<sup>57,58</sup>

Además, en todo momento se cuidó la integridad de los investigadores implementando las medidas de seguridad establecidas en el Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria en el área de Nanoestructuras y Biomateriales de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) – Unidad León. En relación con el investigador, se siguieron las normas de acuerdo con el reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud título cuarto, de la bioseguridad de las investigaciones capítulo I, de la investigación con microorganismos patógenos o material biológico que pueda contenerlos, descrito en los artículos 75 y 77.<sup>57,58</sup>

### **Análisis estadístico**

Los datos se expresaron como medias, porcentajes y desviaciones estándar. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante pruebas de normalidad de Shapiro-Wilks, análisis de varianza de un factor (ANOVA) y post-hoc de Tukey para los grupos de 48 y 72 horas, por dilución. El nivel de significancia se consideró en un valor *P* inferior a 0.05.

## 9. Resultados

### Acuse de envío para publicación



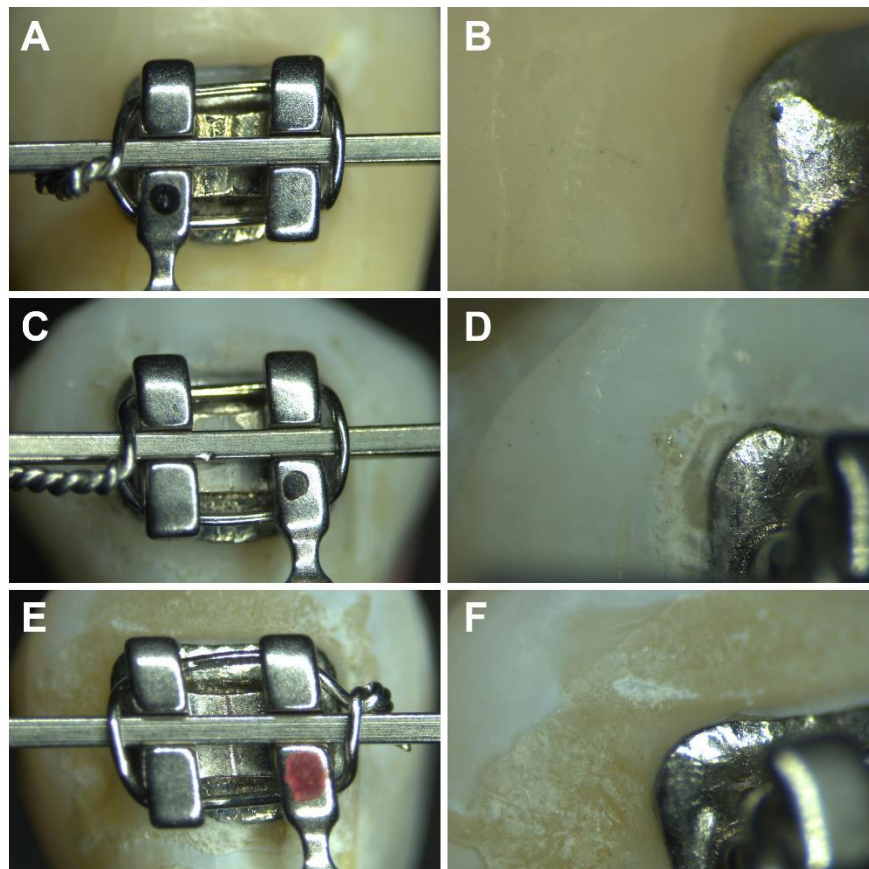
#### Journal Submissions

<b>Name *</b>	ROGELIO J. SCOUGALL-VILCHIS
<b>Email *</b>	<a href="mailto:rogelio_scougall@hotmail.com">rogelio_scougall@hotmail.com</a>
<b>Submission Document *</b>	 <a href="#">manuscript_corrosion_of_orthodontic_appliances_in_cell_culture.docx</a> 35.48 KB -_DOCX
<b>Associated Media *</b>	 <a href="#">associated_media_corrosion_of_orthodontic_appliances_in_cell_culture.docx</a> 3.71 MB -_DOCX
<b>Signed &amp; Scanned Copyright Release Form *</b>	 <a href="#">copyright_release_form.pdf</a> 915.55 KB -_PDF
<b>Signed &amp; Scanned Conflict of Interest Statement *</b>	 <a href="#">conflict_of_interest_statement.pdf</a> 406.64 KB -_PDF

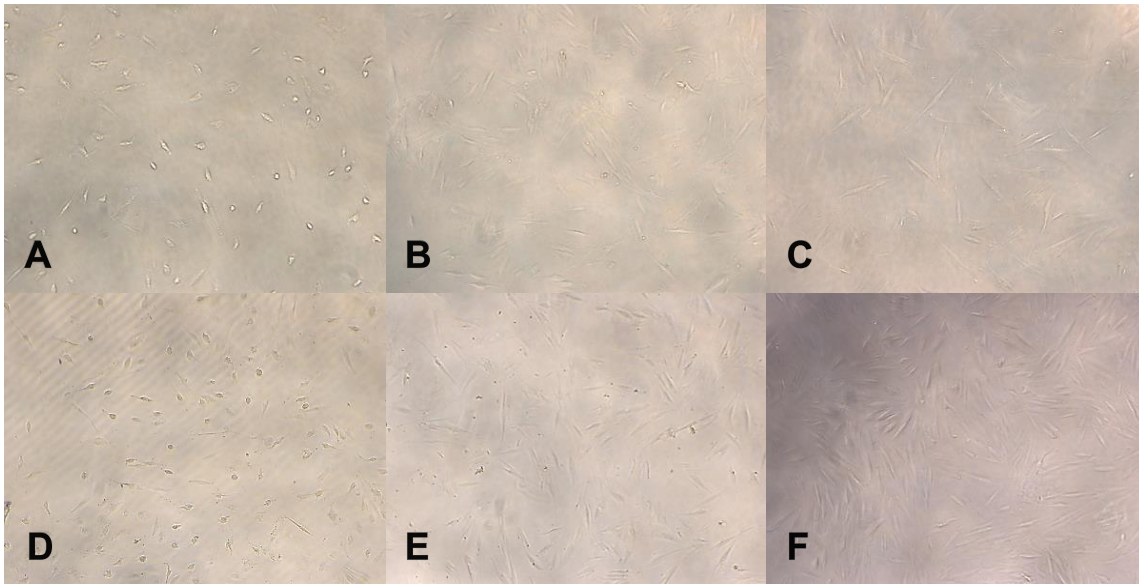
## Resultados adicionales

### Microscopía óptica

A partir de las imágenes obtenidas por microscopía, se observaron cambios en la estructura del esmalte, mostrando un aspecto erosivo y una superficie irregular. En los brackets, alambres NiTi y ligaduras metálicas no se observaron cambios significativos (Figura 14). Sobre los cambios morfológicos sufridos por las células, se observó una degradación de la integridad celular proporcional a la dilución. En el 0% para ambos tipos de células (HGF, HPLF), se observó una forma circunscrita típica de huso en contraste con la forma más cónica e irregular con centro redondeado exhibido por ambas células a una concentración del 100% (Figura 15).



**Figura 14.** **A y B.** Controles. Se observa estructura íntegra de la superficie dental y aparatología fija nueva (15X). **C y D.** Muestra de 48 horas. Se muestra esmalte descalcificado próximo al bracket. **E y F.** Muestra de 72 horas. Se aprecia una amplia zona del esmalte erosiva e irregular (15X).



**Figura 15. A, B y C.** Morfología celular de HGF al 100%, 50% y 0% de dilución (15x). **D, E y F.** Morfología celular de HPLF al 100%, 50% y 0% de dilución (15x).

## ICP-MS

Mediante ICP-MS se analizó la liberación de diversos iones metálicos de los aparatos fijos de ortodoncia en las soluciones empleadas durante el proceso de corrosión. La concentración de estos se muestra en la Tabla 3. En general, se observó un notable aumento de todos los elementos detectados en la muestra de 72 horas con respecto a la muestra de 48 horas. En este sentido, resaltan el cromo y el níquel, dados los efectos adversos reportados, que exhibieron una concentración de aproximadamente 32.3 veces y 41.5 veces más alta, respectivamente, a las 72 horas en comparación a la muestra de 48 horas. En el primer grupo, el nivel de cromo y níquel fue de 0.045  $\mu\text{g/L}$  y 0.297  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente, mientras que para los mismos metales fue de 1.457  $\mu\text{g/L}$  y 12.351  $\mu\text{g/L}$  en el grupo de 72 horas.



**Tabla 3.** Concentración de metales traza por ICP-MS ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

<b>Elemento</b>	<b>L.D.</b>	<b>48-h, <math>\mu\text{g/L}</math></b>	<b>72-h, <math>\mu\text{g/L}</math></b>
<b>Cr</b>	0.035	0.045	1.457
<b>Mn</b>	0.036	0.248	6.791
<b>Fe</b>	0.549	0.628	20.515
<b>Co</b>	0.004	<L.D.	0.158
<b>Ni</b>	0.072	0.297	12.351
<b>Zn</b>	0.052	2.655	79.454
<b>Cd</b>	0.004	<L.D.	0.026

## 10. Discusión

Como sabemos, es un período largo en el que los pacientes usan aparatos fijos de ortodoncia y, por lo tanto, una mayor exposición a la liberación de iones metálicos. En este estudio, informamos el daño potencial a las células orales humanas HGF y HPLF por corrosión metálica, siendo de interés dadas las implicaciones clínicamente observadas durante los tratamientos de ortodoncia, y lo que a su vez lleva a establecer estrategias que limiten el daño latente.

De acuerdo con los resultados de este estudio, rechazamos la hipótesis establecida, dado que los productos de corrosión no causaron reducción de la viabilidad celular de HGF y HPLF más allá del 70%, en cambio se observaron distintos niveles de citotoxicidad, siendo más sensibles los segundos al referirnos a la concentración citotóxica media  $CC_{50}$ . Otros estudios también han reportado diferentes respuestas citotóxicas a la corrosión dependiendo de la línea celular evaluada<sup>59</sup>.

El llamado efecto hormesis se observó en muestras de 48 y 72 horas en líneas celulares de HGF y HPLF a ciertas diluciones, siendo comparable al encontrado por Vande Vannet *et al.*<sup>60</sup>, en su estudio sobre la toxicidad de arcos de ortodoncia usados y Taira *et al.*<sup>61</sup>, sobre citotoxicidad de iones de níquel utilizando fibroblastos. Este aumento en la viabilidad celular puede explicarse como una respuesta de defensa propia causada por estimulación de una dosis baja, lo que podría sugerir que la exposición a iones metálicos que causan corrosión, a ciertas dosis, puede ser beneficiosa para promover la proliferación de las células en estudio. Ambos tipos de células en contacto con muestras de 72 horas exhibieron un menor efecto de hormesis, y por lo tanto, se podría deducir que la mayor liberación de iones se produjo después de las 48 horas, lo que sería análogo a lo informado por Mikulewicz<sup>62</sup> en estudios *in vivo*, sin embargo, las condiciones experimentales son diferentes entre sí.

El análisis SEM mostró, en general, una degradación en la superficie de los brackets y alambres después del proceso de corrosión, similar a lo informado por otros

autores.<sup>63,64</sup> En la muestra de brackets después de 72 horas, los pequeños orificios y surcos distribuidos en la superficie se apreciaron más acentuados, lo que puede sugerir que las depresiones son más profundas con una mayor pérdida de material. Comparable a estos, la muestra de alambres NiTi después de 72 horas exhibió varias grietas en su superficie, lo que puede ser indicativo de pérdida de continuidad en la estructura del metal, ya que estuvo expuesta al proceso de corrosión durante más tiempo. Lo anterior podría ser respaldado por el análisis EDS realizado, que apunta a la liberación de iones metálicos durante el proceso de corrosión; sin embargo, sólo en el caso de los brackets se encontró una reducción de algunos elementos, principalmente Ni. Estos resultados concuerdan con los presentados por Ünal *et al.*<sup>47</sup> en su trabajo sobre la influencia de la saliva artificial en los alambres de ortodoncia de NiTi.

Según el análisis Raman, la banda de absorción a  $961\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al calcio sería indicativa de la desmineralización dental, causada por la solución en sí, pero también por los iones liberados después del proceso de corrosión. Sin embargo, en este análisis no se detectó claramente la presencia de iones metálicos, que sí fueron evidentes al evaluar las muestras de las soluciones después del proceso de corrosión mediante ICP-MS, representando una técnica que permite medir concentraciones extremadamente bajas de iones liberados.

Es bien sabido que, cuando un bracket y un arco de alambre se combinan con una ligadura de metal, puede producirse corrosión por grietas o galvánica en la cavidad oral, lo que conduce a la liberación preferencial de iones metálicos de la aleación anódica<sup>44,65</sup>, fenómeno que estaría ocurriendo de manera continua durante el uso de estos dispositivos en los tratamientos de ortodoncia. Este estudio *in vitro* contribuye a aclarar el comportamiento corrosivo de la sinergia de estos tres materiales comúnmente utilizados, ya que la mayoría de los estudios previos sobre citotoxicidad metálica se han centrado en el comportamiento corrosivo de los arcos de alambre metálico y no en la combinación de brackets, arcos y ligaduras. Sin embargo, encontramos algunas limitaciones, siendo la más notable que las

condiciones controladas de laboratorio no reflejan exactamente los fenómenos que ocurren en el entorno oral, y así mismo, que sólo evaluamos el comportamiento de tres materiales y marcas específicos, y hoy existe una amplia gama de ellos disponibles, por lo que se pueden establecer diversas combinaciones y dar lugar a diferentes respuestas. Algunas opciones libres de metal, como los brackets cerámicos, los módulos elásticos y los alineadores plásticos, se han venido utilizando en el campo de la ortodoncia como respuesta a la mayor demanda de estética y el menor contacto con metales, sin embargo, es una realidad que a la fecha es imprescindible el uso de materiales como el níquel titanio durante las fases de alineación y nivelación y que los brackets que más se siguen utilizando, son aquellos hechos de metal, incluyendo los convencionales, los de autoligado y los linguales. Aunque el uso de metales en boca puede resultar más vistoso, también aporta ventajas desde diversas perspectivas, entre ellas, una mayor eficacia del movimiento dental debido a la menor fricción que se genera, una menor retención de placa dentobacteriana, ausencia de pigmentación y sujeción firme y ajustada entre el arco de alambre y la ranura del bracket cuando se usan ligaduras metálicas en lugar de módulos elásticos, y así mismo, un menor coste respecto a las contrapartes estéticas.

A pesar de que nuestros resultados sugieren el uso seguro de estos materiales metálicos en términos de citotoxicidad, la perspectiva a futuro deberá incluir un análisis más exhaustivo en estudios *in vivo* que reflejen de manera más fiel las condiciones del medio oral al que están sujetos los tratamientos de ortodoncia con aparatología fija. Además, de acuerdo con los datos que se tienen hasta ahora, es muy probable que distintos metales se sigan utilizando durante largo tiempo, debido a la indiscutible eficacia y ventajas que siguen aportando. Sin embargo, también se debe estar consciente que el enfoque actual no debe basarse en el uso exclusivo de uno u otro material, sino más bien en el empleo simultáneo de distintos materiales, técnicas y auxiliares, que en fin último cumplan con los objetivos planteados y las expectativas del paciente.

El impacto de la corrosión durante los tratamientos de ortodoncia y la salud de nuestros pacientes aún no está esclarecida del todo; según la evidencia actual, no parece ser un proceso que deba preocupar, incluso hay indicios de que el tratamiento de ortodoncia puede mejorar la tolerancia del sistema inmunitario al níquel en personas sensibles<sup>46</sup>, siguiendo el concepto de hormesis. El trabajo futuro, tanto *in vitro* como en situaciones clínicamente relevantes, conducirá a una mejor comprensión de los efectos clínicos de la corrosión.

## 11. Conclusiones

La seguridad y la salud de los pacientes bajo tratamiento de ortodoncia debe ser una de las preocupaciones constantes de los odontólogos, evitando el riesgo de exponerlos a efectos tóxicos adversos por los aparatos fijos de ortodoncia. Siguiendo esta línea, se recomienda realizar estudios *in vitro* e *in vivo* adicionales que ayuden a comprender de una manera más clara los efectos a largo plazo de estos materiales.

Según los datos obtenidos, los brackets, arcos y ligadura metálicos, bajo las condiciones experimentales, liberaron iones metálicos en la solución desmineralizante y los productos de corrosión obtenidos de ella causaron efectos citotóxicos de leves a moderados al evaluar la viabilidad celular de los fibroblastos gingivales humanos (HGF) y fibroblastos de ligamento periodontal humano (HPLF). HPLF tuvo una respuesta más sensible en comparación con HGF y exhibió un mayor fenómeno de hormesis en la curva dosis-respuesta. Además, los aparatos fijos de ortodoncia mostraron una degradación topográfica proporcional al tiempo de corrosión y cambios menores en la composición química de los brackets.

Podemos concluir que el uso clínico de la combinación de estos materiales es seguro; sin embargo, en casos de alergia, para reducir el riesgo de daño potencial, se recomienda el empleo de alguna otra terapia ortodóncica libre de metal, como los alineadores plásticos, actualmente en auge, o brackets estéticos, como los cerámicos o de zafiro.

## 12. Referencias

1. Machibya FM, Bao X, Zhao L, Hu M. Treatment time, outcome, and anchorage loss comparisons of self-ligating and conventional brackets. *Angle Orthod.* 2013;83(2):280–5.
2. Skidmore KJ, Brook KJ, Thomson WM, Harding WJ. Factors influencing treatment time in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2006;129(2):230–8.
3. Johansson K, Lundström F. Orthodontic treatment efficiency with self-ligating and conventional edgewise twin brackets A prospective randomized clinical trial. *Angle Orthod.* 2012;82(5):929–34.
4. Fleming PS, DiBiase AT, Lee RT. Randomized clinical trial of orthodontic treatment efficiency with self-ligating and conventional fixed orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2010;137(6):738–42. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajodo.2009.06.023>.
5. Narmada IB, Anbar Baya R, Hamid T. Nickel and Chromium Ions Release from Stainless Steel Bracket Immersed in Fluoridated Mouthwash. *J Int Dent Med Res.* 2018;11(1):294–8.
6. Ziębowicz a, Walke W, Barucha-kępka A, Kiel M. Corrosion behaviour of metallic biomaterials used as orthodontic wires. *J Achiev Mater Manuf Eng.* 2008;27(2):151–4.
7. International Organization for Standardization. *ISO 10993-5: Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests For In Vitro Cytotoxicity.*; 2009.
8. Angle EH. Original Communications; The Latest and Best in Orthodontic Mechanism. *Dent Cosm.* 1928;70(12):1143–58.
9. Lewis PD. Space closure in extraction cases. *Am J Orthod.* 1950;36(3):172–91.
10. Swain B. Clinical demonstration of the Bull technique. In: *Charles H. Tweed Foundation meeting* Chicago; 1952.

11. Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surface. *J Dent Res.* 1955;34(6):849–53.
12. Newman G V. Epoxy adhesives for orthodontic attachments: Progress report. *Am J Orthod.* 1965;51(12):901–12.
13. Matasa C. Direct bonding metallic brackets: where are they heading. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1992;102:552–60.
14. Zinelis S, Sifakakis I, Katsaros C, Eliades T. Microstructural and mechanical characterization of contemporary lingual orthodontic brackets. *Eur J Orthod.* 2014;36(4):389–93.
15. Eliades T, Zinelis S, Bourauel C, Eliades G. Manufacturing of Orthodontic Brackets : A Review of Metallurgical Perspectives and Applications. *Recent Patents Mater Sci.* 2008;1:135–9.
16. Eliades T, Zinelis S, Eliades G, Athanasiou AE. Characterization of as-received, retrieved, and recycled stainless steel brackets. *J Orofac Orthop.* 2003;64(2):80–7.
17. Oh KT, Choo SU, Kim KM, Kim KN. A stainless steel bracket for orthodontic application. *Eur J Orthod.* 2005;27(3):237–44.
18. Faccioni F, Franceschetti P, Cerpelloni M, Fracasso ME. In vivo study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2003;124(6):687–93.
19. Kusy RP. Clinical response to allergies in patients. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2004;125(5):544–7.
20. Menezes LM, Campos LC, Quintão CC, Bolognese AM. Hypersensitivity to metals in orthodontics. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2004;126(1):58–64.
21. Platt JA, Guzman A, Zuccari A, et al. Corrosion behavior of 2205 duplex stainless steel. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 1997;112(1):69–79.
22. Berge M, Gjerdet NR, Erichsen ES. Corrosion of silver soldered orthodontic wires. *Acta Odontol Scand.* 1982;40(2):75–9.



23. Maijer R, Smith DC. Corrosion of orthodontic bracket bases. *Am J Orthod* 1982;81(1):43–8.
24. Zinelis S, Annousaki O, Eliades T, Makaou M. Elemental Composition of Brazing Alloys in Metallic Orthodontic Brackets. *Angle Orthod*. 2004;74:394–9.
25. John GA. Corrosion of resin-bonded orthodontic brackets. *Am J Orthod*. 1982;82(6):441–6.
26. Bishara S, Barrett R, Selim M. Biodegradation of orthodontic appliances. Part II. Changes in the blood level of nickel. *Am J Orthod*. 1993:23–5. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889540605817603>.
27. Siargos B, Bradley TG, Darabara M, Papadimitriou G, Zinelis S. Galvanic corrosion of metal injection molded (MIM) and conventional brackets with nickel-titanium and copper-nickel-titanium archwires. *Angle Orthod*. 2007;77(2):355–60.
28. Zinelis S, Annousaki O, Makou M, Eliades T. Metallurgical characterization of orthodontic brackets produced by Metal Injection Molding (MIM). *Angle Orthod*. 2005;75(6):1024–31.
29. Zinelis S, Al Jabbari YS, Gaintantzopoulou M, Eliades G, Eliades T. Mechanical properties of orthodontic wires derived by instrumented indentation testing (IIT) according to ISO 14577. *Prog Orthod*. 2015;16(1):4–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s40510-015-0091-z>.
30. Williams IR. Fibroblasts. *Encycl Immunol*. 1998:905–9.
31. Lo DD, Hu MS, Zimmermann AS, Longaker MT, Peter Lorenz H. *Differences in Foetal, Adult Skin and Mucosal Repair*. Elsevier Inc.; 2014. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397157-9.00055-2>.
32. Kreisler M, Christoffers AB, Al-Haj H, Willershausen B, D'Hoedt B. Low level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med*. 2002;30(5):365–9.
33. Daghigh F, Borghaei RC, Thornton RD, Bee JH. Human Gingival Fibroblasts

Produce Nitric Oxide in Response to Proinflammatory Cytokines. *J Periodontol.* 2002;73(4):18–20.

34. Giannopoulou C, Cimasoni G. Functional characteristics of gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Dent Res.* 1996;75(3):895–902.

35. Mariotti AJ, Cochran DL. Characterization of fibroblasts derived from human periodontal ligament and gingiva. *J Periodontol.* 1990;61(2):103–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2313526>.

36. Zhang X. Microstructure and Corrosion Properties of Orthodontic Brackets by Laser Treatment. *Int J Electrochem Sci.* 2017;12:32–9. Available at: <http://www.electrochemsci.org/abstracts/vol12/120100032.pdf>.

37. Schiff N, Boinet M, Morgon L, Lissac M, Dalard F, Grosogeat B. Galvanic corrosion between orthodontic wires and brackets in fluoride mouthwashes. *Eur J Orthod.* 2006;28(3):298–304.

38. Freitas MPM, Oshima HMS, Menezes LM, Machado DC, Viezzer C. Cytotoxicity of silver solder employed in orthodontics. *Angle Orthod.* 2009;79(5):939–44.

39. Huang GY, Jiang HB, Cha JY, Kim KM, Hwang CJ. The effect of fluoride-containing oral rinses on the corrosion resistance of titanium alloy (Ti-6Al-4V). *Korean J Orthod.* 2017;47(5):306–12.

40. Widu F, Drescher D, Junker R, Bourauel C. Corrosion and biocompatibility of orthodontic wires. *J Mater Sci Mater Med.* 1999;10(5):275–81.

41. Von Fraunhofer JA. Corrosion of orthodontic devices. *Semin Orthod* 1997;3:198–205.

42. Heravi F, Mokhber N, Shayan E. Galvanic Corrosion among Different Combination of Orthodontic Archwires and Stainless Steel Brackets. *J Dent Mater Tech.* 2014;3(3):118–22.

43. Halițchi L, Darabă O, Merlușcă I, Chirap I, Burlui V. On the Cytotoxicity of

Orthodontic Arches in Human Fibroblast Cultures. *Int J Med Dent*. 2015;5(4):277–83.

44. Oh K-T, Hwang C-J, Park Y-S, Kim K-N. Corrosion of Orthodontic Wires According to Heat Treatment Conditions. *Mater Trans*. 2002;43(12):3078–82.

45. Saporeti MP, Mazzeiro ET, Sales WF. In vitro corrosion of metallic orthodontic brackets: influence of artificial saliva with and without fluorides. *Dental Press J Orthod*. 2012;17(6):24e1–7. Available at: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2176-94512012000600009&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-94512012000600009&lng=en&nrm=iso&tlng=en).

46. House K, Sernetz F, Dymock D, Sandy JR, Ireland AJ. Corrosion of orthodontic appliances-should we care? *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2008;133(4):584–92.

47. Ünal I, Zor S, Atapek H. Influence of artificial saliva on NiTi orthodontic wires: A study on the surface characterization. *Mater Sci*. 2012;47(6):830–7.

48. Martín-Cameán A, Puerto M, Jos Á, et al. Preliminary study of genotoxicity evaluation of orthodontic miniscrews on mucosa oral cells by the alkaline comet assay. *Toxicol Mech Methods*. 2015;25(6):487–93.

49. Castro SM, Ponces MJ, Lopes JD, Vasconcelos M, Pollmann MCF. Orthodontic wires and its corrosion - The specific case of stainless steel and beta-titanium. *J Dent Sci*. 2015;10(1):1–7.

50. Hillmann G, Steinkamp-zucht A, Geurtsen W, Gross G, Hoffmann A. Culture of primary human gingival fibroblasts on biodegradable membranes. *Biomaterials*. 2002;23:1461–9.

51. Kartsogiannis V, Ng KW. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;228(1–2):79–102.

52. Ogata Y, Niisato N, Sakurai T, Furuyama S, Sugiya H. Comparison of the Characteristics of Human Gingival Fibroblasts and Periodontal Ligament Cells. *J Periodontol*. 1995;66(12):1025–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8683414> <http://www.joonline.org/doi/10>

.1902/jop.1995.66.12.1025.

53. Scougall-Vilchis R, Sakagami H, Garcia-Contreras R, Contreras-Bulnes R, Morales-Luckie R, Nakajima H. A comparative in vitro efficacy of conventional rotatory and chemomechanical caries removal: Influence on cariogenic flora, microhardness, and residual composition. *J Conserv Dent*. 2014;17(6):536. Available at: <http://www.jcd.org.in/text.asp?2014/17/6/536/144588>.

54. Ahrari F, Tavakkol Afshari J, Poosti M, Brook A. Cytotoxicity of orthodontic bonding adhesive resins on human oral fibroblasts. *Eur J Orthod*. 2010;32(6):688–92.

55. World Medical Association [Internet]. Ferney-Voltaire, France [actualizado 2020 Ene 5; citado 2020 May 12]. WMA Declaration of Helsinki 2013; [3 pantallas aproximadamente]. Disponible en: <https://www.wma.net/what-we-do/medical-ethics/declaration-of-helsinki/>

56. World Medical Association [Internet]. Ferney-Voltaire, France [actualizado 2018 Jul 9; citado 2020 May 12]. WMA Declaration of Helsinki 2013; [30 pantallas aproximadamente]. Disponible en: <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>

57. Gobierno de México [Internet]. México: Normatividad Nacional [actualizado 2019 Jun 11; citado 2020 May 12]. Comisión Nacional de Bioética; [2 pantallas aproximadamente]. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/conbioetica/articulos/normatividad-nacional-164543>

58. Gobierno de México [Internet]. México: Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud [actualizado 2014 Abr 2; citado 2020 May 12]. Comisión Nacional de Bioética; [62 pantallas aproximadamente]. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/281701/Reg\\_LGS\\_MIS.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/281701/Reg_LGS_MIS.pdf)

59. Jacoby LS, Rodrigues Junior V da S, Campos MM, Macedo de Menezes L. Cytotoxic outcomes of orthodontic bands with and without silver solder in different cell lineages. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2017;151(5):957–63.

60. Vande Vannet B, Mohebbian N, Wehrbein H. Toxicity of used orthodontic archwires assessed by three-dimensional cell culture. *Eur J Orthod.* 2006;28(5):426–32.
61. Taira M, Toguchi MS, Hamada Y, et al. Studies on cytotoxicity of nickel ions using C3H10T1/2 fibroblast cells. *J Oral Rehabil.* 2010;27(12):1068–72.
62. Mikulewicz M, Chojnacka K. Trace Metal release from orthodontic appliances by in vivo studies: A systematic literature review. *Biol Trace Elem Res.* 2010;137(2):127–38.
63. Kobayashi S, Ohgoe Y, Ozeki K, et al. Diamond-like carbon coatings on orthodontic archwires. *Diam Relat Mater.* 2005;14(3–7):1094–7.
64. Gravina MA, Canavarro C, Elias CN, Chaves M das GAM, Brunharo IHVP, Quintão CCA. Mechanical properties of NiTi and CuNiTi wires used in orthodontic treatment. Part 2: Microscopic surface appraisal and metallurgical characteristics. *Dental Press J Orthod.* 2014;19(1):69–76. Available at: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2176-94512014000100069&lng=en&tling=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-94512014000100069&lng=en&tling=en).
65. Chaturvedi TP. Corrosion behaviour of orthodontic alloys-a review. *Fac Dent Sci Inst Med Sci Banaras Hindu Univ. Varanasi-221005, UP.* 2008:27p.

## 13. Anexos

### Anexo 1. Consentimiento informado

<b>Consentimiento informado</b>	
<b>Título</b>	“Corrosión de aparatología fija en cultivo celular humano: citotoxicidad, evaluación química y microestructural”
<b>Investigador principal</b>	E. en Ort. David Bautista Martínez
<b>Coinvestigadores</b>	Dr. en C.S. René García Contreras, Dr. en O. Rogelio J. Scougall Vilchis
<b>Lugar</b>	Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad León; Universidad Nacional Autónoma de México. Dirección: Boulevard UNAM No. 2011, Col. Predio el Saucillo y El Potrero CP36969, León, Gto.
<b>Introducción</b>	Antes de aceptar la participación en este estudio de investigación, es importante que usted lea y entienda la siguiente información sobre el mismo. Este documento de consentimiento describe el propósito, procedimientos, beneficios, riesgos, inconformidades y precauciones del estudio.
<b>Propósito</b>	Los tejidos que le serán extraídos podrán ser donados para la realización de un proyecto de investigación de la Escuela Nacional de Estudios Superiores, UNAM, Unidad León.
<b>De los participantes</b>	<p>Para participar en esta investigación usted tendrá que cubrir los siguientes requisitos:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Ser un paciente sano de acuerdo con su historia clínica.</li><li>• Tener entre 18 y 30 años, y acudir a la clínica de cirugía bucal de la ENES, UNAM.</li><li>• Estar libre de infecciones.</li><li>• No padecer enfermedades sistémicas.</li><li>• No presentar toxicomanías.</li><li>• Firmar el presente informe de consentimiento.</li></ul> <p>No será permitida su participación si usted:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Presenta alguna enfermedad de tejido óseo.</li><li>• Consume inmunomoduladores, esteroides o bifosfonatos.</li><li>• Padece cáncer.</li></ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es alérgico a la penicilina.</li> <li>• Tiene alguna enfermedad cardiovascular diagnosticada.</li> <li>• Presenta alguna enfermedad sistémica diagnosticada.</li> <li>• Está embarazada o se encuentra bajo lactancia.</li> </ul> <p>Si usted califica, será uno de los participantes que colaborará en este estudio.</p>
<b>Procedimientos (aproximadamente 20 minutos)</b>	<p>A usted se le requerirá:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Leer y firmar este formulario de informe de consentimiento.</li> <li>• Contestar preguntas para determinar si usted califica para participar en este estudio.</li> <li>• Contestar preguntas acerca de su estado actual de salud.</li> <li>• Participar en la toma de muestra de tejido gingival durante el tratamiento de odontectomía quirúrgica de terceros molares inferiores. Se administrará anestesia local, se realizará tratamiento de odontectomía quirúrgica de terceros molares inferiores donde se retirará el tejido gingival como parte del procedimiento y se conservará en Phosphate-buffered saline (PBS).</li> </ul>
<b>Riesgos e Inconformidades</b>	Se le informa que la toma de muestra de tejido gingival que se retira durante el tratamiento de odontectomías de terceros molares es considerada una técnica invasiva con riesgo mínimo.
<b>Costos</b>	No hay costo por participar en este estudio, más que su tiempo.
<b>Confidencialidad</b>	El presente estudio tiene consideraciones de confidencialidad basado en la ley orgánica de protección de datos personales 15/1999, dónde sólo se accederá al historial clínico por los monitores del estudio, los miembros del comité de bioética y las autoridades sanitarias.
<b>Participación Voluntaria</b>	Su decisión de participar en este estudio es voluntaria.
<b>Consentimiento</b>	He leído y entendido la información en este documento de informe de consentimiento. Así mismo, he tenido la oportunidad de hacer preguntas, mismas que han sido respondidas satisfactoriamente. Yo voluntariamente acepto participar en este estudio.
<b>Nombre y firma del Paciente</b>	





## Anexo 3. Presentación en foros académicos



### EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD POR CORROSIÓN DE APARATOLOGÍA FIJA EN CULTIVO CELULAR HUMANO



<sup>1</sup>Bautista Martínez David\*, <sup>2</sup>García Contreras René, <sup>3</sup>Scougall Vilchis Rogelio J., <sup>4</sup>García Garduño Rigoberto, <sup>5</sup>Hernández Padrón Genoveva.

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología (CIEAO), Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Estado de México (UAEMex).

<sup>2</sup>Laboratorio de Nanoestructuras y Biomateriales, Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES), Unidad León, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

<sup>3</sup>Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

#### INTRODUCCIÓN

En ortodoncia, diversas aleaciones metálicas son utilizadas para la fabricación de brackets, arcos, bandas y tubos, entre otros. Estas aleaciones están hechas principalmente de acero inoxidable, níquel, titanio, cromo y cobalto. La influencia de estos metales sobre la proliferación celular y viabilidad ha sido objeto de estudio para determinar su toxicidad *in vitro*. El ambiente oral es particularmente ideal para la degradación de metales, facilitando el proceso de corrosión de brackets y otros materiales metálicos usados en ortodoncia.

#### OBJETIVO

Evaluar la citotoxicidad causada por los productos de corrosión de brackets metálicos en fibroblastos gingivales humanos (HGF) y fibroblastos del ligamento periodontal humanos (HPLF) en un modelo *in vitro*.

#### METODOLOGÍA

Tipo de estudio: experimental *in vitro*, prospectivo y comparativo.

##### I. Cementación

##### II. Corrosión

- Solución desmineralizante (1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.9 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM KCl y 0.1 mM CH<sub>3</sub>COONa), 24 horas a 37°C en agitación (250 rpm), pH 5.
- NaOH, 12 horas en agitación, pH 7. HCl, 12 horas en agitación, pH 5.
- Obtención de muestras de 48 y 72 horas.

##### III. Espectroscopia Raman

– Las muestras de solución de 48 y 72 horas de los productos de corrosión se analizaron mediante Raman.

##### IV. SEM

– La microestructura de la aparatología fija se evaluó antes y después del proceso de corrosión mediante microscopía electrónica de barrido a 1000, 1500 y 3000X.

##### V. Ensayo de citotoxicidad

– Inoculación en platos de 96 pocillos a densidades de 4x10<sup>3</sup> células/ml. Incubación 24 horas a 37°C en una atmósfera húmeda del 95% y 5% de CO<sub>2</sub>.

- Centrifugación, adición de medio de cultivo e inoculación de muestras (48 y 72 h) en cultivo celular, 200 µl; Diluciones del 0-100%, 24 horas en condiciones de cultivo estándar.

- Colocación de 100 µl de MTT e incubación durante 7 horas a 37°C. La absorbancia se determinó a 570 nm de longitud de onda.

##### IV. Análisis microscópico

– fotografías (magnificación 15X).

##### V. Análisis estadístico

– pruebas de normalidad de t-Student pareada y t-Student de medias con una significancia de  $p < 0.05$ .

#### DISCUSIÓN

El llamado efecto de hormesis se observó en muestras de 48 horas para líneas celulares tanto de HGF como de HPLF, siendo comparable al encontrado por Vande Vannet *et al.* en su estudio sobre la toxicidad de los arcos de alambre ortodóncicos usados y Taira *et al.* sobre citotoxicidad de iones de níquel utilizando fibroblastos.

El impacto de la corrosión en el tratamiento de ortodoncia y la salud de nuestros pacientes aún no se conoce bien. El trabajo futuro en situaciones más clínicamente relevantes conducirá a una mejor comprensión de los efectos clínicos de la corrosión.

#### CONCLUSIONES

Los productos de corrosión de aparatología fija ortodóncica metálica en contacto con las líneas celulares HGF y HPLF causan efectos citotóxicos de leves a moderados, mostrando un efecto de hormesis en la curva de dosis-respuesta para muestras de 48h.

#### REFERENCIAS

- I. Vande Vannet B, Mohebbian N, Wehrbein H. Toxicity of used orthodontic archwires assessed by three-dimensional cell culture. *Eur. J. Orthod.* 2006;28(5):426–32.
- II. Taira M, Toguchi MS, Hamada Y, et al. Studies on cytotoxicity of nickel ions using C3H10T1/2 fibroblast cells. *J. Oral Rehabil.* 2010;27(12):1068–72.

#### RESULTADOS

El análisis SEM mostró diferencias visuales entre las muestras de control, 48 y 72 horas, tanto para los brackets como para los arcos NITI. Las bandas de absorción de Raman confirmaron la presencia de iones Ni y Ti en la solución. Las muestras de 48 horas en contacto con HGF y el HPLF mostraron efectos citotóxicos con diferencia estadística al alcanzar aproximadamente el 75% de la viabilidad celular. Las muestras de 72 horas mostraron una disminución en la viabilidad celular proporcional al porcentaje de dilución para ambas líneas celulares. CC<sub>50</sub> para HGF a las 48 horas, se registró al 97.6% de la dilución.

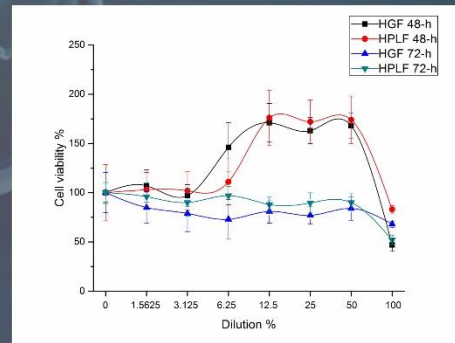


Figura 1. Curvas de viabilidad celular a distintas diluciones.

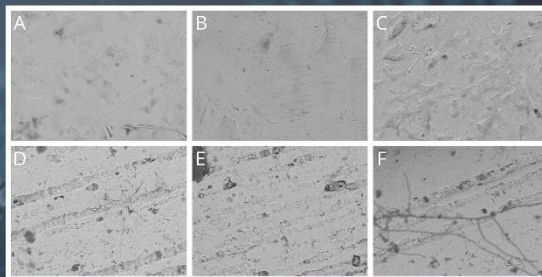


Figura 2. A, B y C, Micrografías electrónicas de barrido de los brackets (1500X). Control, 48 y 72h. D, E, F, Alambres NITI (1500X). Control, 48 y 72h. Los controles y las muestras de 48 horas mostraron una superficie similar más lisa en contraste con las muestras de 72 horas, que exhibieron una superficie más irregular y hendiduras más acentuadas.





# CORROSIÓN DE APARATOLOGÍA FIJA EN CULTIVO CELULAR HUMANO: CITOTOXICIDAD, EVALUACIÓN QUÍMICA Y MICROESTRUCTURAL



Escuela Nacional de Estudios Superiores  
Unidad León

<sup>1</sup>Bautista Martínez David\*, <sup>2</sup>García Contreras René, <sup>3</sup>Scougal Vilchis Rogelio J., <sup>1</sup>García Garduño Rigoberto, <sup>3</sup>Hernández Padrón Geneveva.

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología (CIEAO), Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Estado de México (UAEMex).

<sup>2</sup>Laboratorio de Nanoestructuras y Biomateriales, Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES), Unidad León, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

<sup>3</sup>Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

## INTRODUCCIÓN

En ortodoncia, diversas aleaciones metálicas son utilizadas para la fabricación de brackets, arcos, bandas y tubos, entre otros. Estas aleaciones están hechas principalmente de acero inoxidable, níquel, titanio, cromo y cobalto. La influencia de estos metales sobre la proliferación celular y viabilidad ha sido objeto de estudio para determinar su toxicidad *in vitro*. El ambiente oral es particularmente ideal para la degradación de metales, facilitando el proceso de corrosión de brackets y otros materiales metálicos usados en ortodoncia.

## OBJETIVO

Evaluar la citotoxicidad causada por los productos de corrosión de brackets metálicos en fibroblastos gingivales humanos (HGF) y fibroblastos del ligamento periodontal humanos (HPLF) en un modelo *in vitro*.

## METODOLOGÍA

Tipo de estudio: experimental *in vitro*, prospectivo y comparativo.

### I. Cementación

### II. Corrosión

- Solución **desmineralizante** (1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.9 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM KCl y 0.1 mM CH<sub>3</sub>COONa), 24 horas a 37° C en agitación (250 rpm), pH 5.
- NaOH, 12 horas en agitación, pH 7. HCl, 12 horas en agitación, pH 5.
- Obtención de **muestras** de 48 y 72 horas.

### III. Espectroscopia Raman

Las muestras de solución de 48 y 72 horas de los productos de corrosión se analizaron mediante Raman.

### IV. SEM/EDS

La **microestructura** de la aparatología fija se evaluó antes y después del proceso de corrosión mediante microscopía electrónica de barrido a 1000, 1500 y 3000X. Así mismo la **composición química** de la aparatología.

### V. Ensayo de citotoxicidad

Inoculación en platos de 96 pocillos a densidades de 4x10<sup>5</sup> células/ml.

- Centrifugación**, adición de medio de cultivo e inoculación de muestras (48 y 72 h) en cultivo celular, 200 µl; **Diluciones** del 0-100%, 24 horas en condiciones de cultivo estándar.
- Colocación de 100 µl de **MTT** e incubación durante 7 horas a 37° C. La absorbancia se determinó a 570 nm de longitud de onda.

### IV. Análisis microscópico

fotografías (magnificación 15X).

### V. Análisis estadístico

pruebas de normalidad de Shapiro-Wilks, t-Student pareada y t-Student de medias con una significancia de p<0.05.

## DISCUSIÓN

El llamado efecto de hormesis se observó en muestras de 48 horas para líneas celulares tanto de HGF como de HPLF, siendo comparable al encontrado por Vande Vannet *et al.* en su estudio sobre la toxicidad de los arcos de alambre ortodóncicos usados y Taira *et al.* sobre citotoxicidad de iones de níquel utilizando fibroblastos.

El impacto de la corrosión en el tratamiento de ortodoncia y la salud de nuestros pacientes aún no se conoce bien. El trabajo futuro en situaciones más clínicamente relevantes conducirá a una mejor comprensión de los efectos clínicos de la corrosión.

## CONCLUSIONES

Los productos de corrosión de aparatología fija ortodóncica metálica en contacto con las líneas celulares HGF y HPLF causan efectos citotóxicos de leves a moderados, mostrando un efecto de hormesis en la curva de dosis-respuesta para muestras de 48h.

## REFERENCIAS

- Vande Vannet B, Mehelbian N, Wehbein H. Toxicity of used orthodontic archwires assessed by three-dimensional cell culture. *Eur. J. Orthod.* 2008;28(5):426-32.
- Taira M, Toghiani MS, Hamada Y, et al. Studies on cytotoxicity of nickel ions using C3H10T1/2 fibroblast cells. *J. Oral Rehabil.* 2010;27(12):168-72.

## RESULTADOS

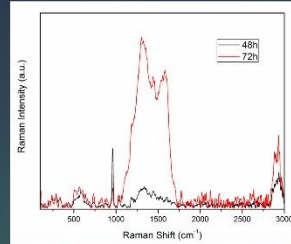


Figura 1. Bandas de absorción RAMAN.

Tabla 1. Composición química de los brackets ortodóncicos y arcos (peso%) medida por EDS

Alloy	Sample	Al	Si	P	Ca	Ti	Cr	Fe	Ni	Total
SS Bracket	Control	4.8	3.6	2.6	5	3.9	13.2	55.1	11.8	100
	48-h	1	3.4	0.8	1.7	0.7	17.9	69.8	4.7	100
	72-h	5.9	0.9	1.2	0	1.5	15.7	69.2	5.6	100
NiTi wire	Control	2.4	0.7	0.7	0.1	37.1	2.1	8.3	48.6	100
	48-h	2.4	0.5	0.6	0.8	36.9	2.8	8.7	47.3	100
	72-h	2.9	3.3	2.1	3.9	29.2	3.8	12.6	42	100

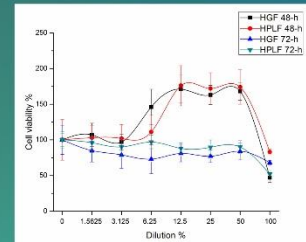


Figura 2. Curvas de viabilidad celular a distintas diluciones.

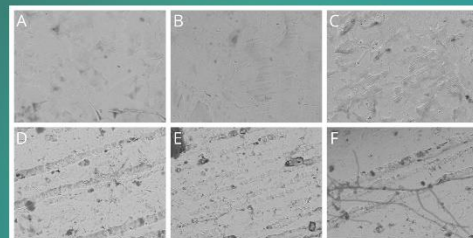


Figura 3. A, B y C, Micrografías electrónicas de barrido de los brackets (1500X). Control, 48 y 72h. D, E, F, Alambres NiTi (1500X). Control, 48 y 72h. Los controles y las muestras de 48 horas mostraron una superficie similar más lisa en contraste con las muestras de 72 horas, que exhibieron una superficie más irregular y hendiduras más acentuadas.