



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA**

---

**ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO IN VITRO DE  
OSTEOBLASTOS CULTIVADOS SOBRE SUPERFICIES DE  
IMPLANTES DENTALES**

**Tesis Doctoral**

Rocío Trinidad Velázquez Cayón

Sevilla, 2015





FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de estomatología

C/ Avicena s/n

Sevilla

DOCTOR JOSÉ LUIS GUTIÉRREZ PÉREZ, Doctor en Odontología  
y Profesor Titular del Departamento de Estomatología.

DOCTOR GABRIEL CASTILLO DALÍ, Doctor en Biología.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “Estudio del comportamiento *in vitro* de osteoblastos cultivados sobre superficies de implantes dentales” desarrollado por D<sup>a</sup> Rocío Trinidad Velázquez Cayón, ha sido realizado bajo nuestra dirección, habiendo los que suscriben revisado el mencionado trabajo y estando conformes con su presentación como Tesis Doctoral para ser juzgado por el Tribunal que en su día se designe.

En Sevilla, y para que así conste y a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado a 2 de Marzo de 2015.

## ***AGRADECIMIENTOS***

Agradecer a mis directores Prof. José Luis Gutiérrez Pérez y Dr. Gabriel Castillo Dalí por su compromiso y buen hacer.

A mis colegas del Máster de Cirugía Bucal de Sevilla, por todos estos años de compañerismo y apoyo en los momentos más difíciles. Muy especialmente a Esther Sánchez Cobo y Fátima Marín Conde, ante todo agradecerles su amistad.

Por último, a Dña. M<sup>a</sup> del Valle Cayón Díaz y a D. Fernando Velázquez López, mis padres, por su esfuerzo, sus desvelos, su ilusión, porque sin su ejemplo, sus consejos y su apoyo incondicional jamás hubiera ido superando metas a lo largo de mi vida. No me olvido de mi hermano y compañero de profesión, Fernando, del cual me siento extraordinariamente orgullosa.

*A mi padre.*

# ÍNDICE

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN, 6.**

#### **1.1. Tejido óseo. Composición y funciones, 7.**

1.1.1. Matriz ósea, 7.

1.1.2. Células óseas, 11.

1.1.3. Citoesqueleto, 18.

1.1.4. Remodelación ósea, 25.

#### **1.2. Superficies de las implantes dentales, 31.**

1.2.1. Propiedades fisicoquímicas, microestructurales y mecánicas del titanio, 31.

1.2.2. Superficies de titanio en implantes dentales, 36.

#### **1.3. Osteointegración de las implantes dentales, 45.**

1.3.1. Concepto de osteointegración, 45.

1.3.2. Interacción de los osteoblastos con las superficies de titanio, 48.

1.3.3. Acontecimientos que se producen en el hueso tras la colocación de los implantes, 52.

1.3.4. Correlación entre las señales moleculares y la unión del hueso a la superficie de titanio, 59.

- 
- 1.4. Proteínas morfogenéticas humanas (BMPs), **64**.
  - 1.5. Técnicas de laboratorio para el estudio de la función osteoblástica, **73**.
    - 1.5.1. Cultivos celulares, **73**.
    - 1.5.2. Estudio energético celular: cuantificación del potencial de membrana mitocondrial mediante tinción JC-1 (*5,5',6,6'tetrachloro1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine Iodide*), **75**.
    - 1.5.3. Estudio de apoptosis: tinción fluorescente de núcleos celulares mediante DAPI (*4'.6-diamidino-2-phenylindole*), **79**.
    - 1.5.4. Estudio de movilidad y adhesión: tinción con anticuerpos específicos anti actina humana marcados con rodamina-faloidina (*Rhodamine-Phalloidin*), **81**.
    - 1.5.5. Estudio de productividad ósea: marcador de anticuerpo específico de proteína BMP-2, **83**.
    - 1.5.6. Microscopía confocal de discos con cultivos celulares, **86**.
  2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS, **90**.
  3. MATERIAL Y MÉTODO, **93**.
    - 3.1. Material, **94**.



---

### 3.2. Método, **105**.

- 3.2.1. Cultivos celulares. Cultivo de osteoblastos de humanos normales (NHOST), **106**.
- 3.2.2. Estudio de viabilidad celular: tinción fluorescente de núcleos celulares mediante DAPI (*4'.6-diamidino-2-phenylindole*), **111**.
- 3.2.3. Estudio del citoesqueleto celular: tinción con anticuerpos específicos anti actina humana marcados con rodamina-faloidina (*Rhodamine-Phalloidin*), **114**.
- 3.2.4. Estudio energético celular: cuantificación del potencial de membrana mitocondrial mediante tinción JC-1 (*5,5',6,6'tetrachloro1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine Iodide*), **117**.
- 3.2.5. Estudio de productividad ósea: marcador de anticuerpo específico de proteína BMP-2, **121**.

### 4. RESULTADOS, **123**.

- 4.1. Estudio de viabilidad celular: tinción fluorescente de núcleos celulares mediante DAPI (*4'.6-diamidino-2-phenylindole*), **124**.
- 4.2. Estudio del citoesqueleto celular: tinción con anticuerpos específicos anti actina humana marcados con rodamina-faloidina (*Rhodamine-Phalloidin*), **127**.

- 4.3. Estudio energético celular: cuantificación del potencial de membrana mitocondrial mediante tinción JC-1 (*5,5',6,6'tetrachloro1,1',3,3' tetraethyl-benzimidazolylcarbocyanine Iodide*), **130**.
- 4.4. Estudio de productividad ósea: marcador de anticuerpo específico de proteína BMP-2, **133**.
- 4.5. Diferencias entre resultados de los diferentes grupos, **136**.
5. DISCUSIÓN, **138**.
6. CONCLUSIONES, **169**.
7. BIBLIOGRAFÍA, **172**.

# **INTRODUCCIÓN**

# 1. Introducción.

## 1.1. Tejido óseo. Composición y funciones.

### 1.1.1. Matriz ósea.

La matriz del tejido óseo tiene la peculiaridad que se encuentra mineralizada. Esta matriz es desde un punto de vista metabólico activa y está compuesta por dos fases principales a escala microscópica: por un lado una fase mineral (65%) y otra fase orgánica (35%).

La fase mineral está formada por iones de fosfato cálcico depositados en forma de cristales de hidroxiapatita que se encuentran entre las fibras de colágeno tipo I. En la fase orgánica encontramos fibras de colágeno tipo I orientadas en una dirección preferencial (90% de la proteína total), proteínas no colagénicas, glucoaminoglicanos y lípidos (Tabla 1.1.) (1).

La matriz ósea es la responsable de las propiedades biomecánicas del hueso. Las fibras de colágeno proporcionan flexibilidad y resistencia a la tensión mientras que las sales minerales confieren dureza, rigidez y resistencia a la compresión.

#### a) FASE ORGÁNICA

- *Colágeno*: el colágeno tipo I es la molécula que forma la estructura básica de la red de fibras de la matriz ósea. Se trata de una molécula formada por dos cadenas  $\alpha 1$  estructuralmente iguales pero genéticamente distintas y una

cadena  $\alpha 2$  (2). El colágeno tipo 1 es sintetizado por los osteoblastos, odontoblastos y fibroblastos y es secretado como procolágeno que es la molécula precursora caracterizada por la presencia de extensiones peptídicas amino y carboxiterminales. Antes de que las moléculas de colágeno se unan para formar la triple hélice, las dos regiones terminales sufren una reacción proteolítica provocando su liberación (3).

- *Osteocalcina (bone Gla-protein)*: es una pequeña proteína de 49 aminoácidos, específica del tejido óseo y la dentina, que constituye el 20% de las proteínas no colágenas presentes en la matriz ósea. Se caracteriza por la presencia de un aminoácido derivado de una modificación postraduccional, vitamina K dependiente, del ácido glutámico, llamado ácido carboxiglutámico (*gla*). La biosíntesis de la osteocalcina es dependiente de la vitamina K y es estimulada por la presencia de la vitamina D. En presencia de concentraciones fisiológicas de calcio, los residuos de ácido carboxiglutámico proporcionan un cambio conformacional a la molécula que promueve la unión de la osteocalcina con la hidroxiapatita favoreciéndose la formación ósea y su posterior mineralización (4). La osteocalcina sintetizada se queda mayoritariamente incorporada a la matriz ósea debido a su capacidad de unión al calcio y a la hidroxiapatita, pero una fracción de ésta es liberada a la sangre siendo su determinación bioquímica un buen indicador de índice de formación ósea (5).
- *Osteonectina*: es una glicoproteína con un peso molecular en torno a los 6000 kD, se identifica por la presencia de residuos de carboxiglutamato que tienen afinidad por el calcio y una fuerte avidez por la hidroxiapatita sin cristalizar. Además tiene gran afinidad por el colágeno tipo I. Por todo ello se cree que

interviene en la regulación de la adhesión celular entre la matriz y las células, en el hueso es necesaria para la mineralización normal.

- *Fosfatasa alcalina*: es una enzima que libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos, necesario para la mineralización. Existen varias isoenzimas y, entre ellas la ósea, que se han considerado un buen marcador de la actividad osteoblástica.
- *Proteoglicanos*: es un grupo de macromoléculas asociadas a la superficie celular, compuestas por una proteína central a la que se adhieren cadenas de glucoaminoglicanos. Su función es servir como receptor de membrana y unirse al colágeno de la matriz extracelular.

PROTEÍNAS COLAGÉNICAS	Fibras de colágeno Tipo I (90%) y V (3%)	
PROTEÍNAS NO COLAGÉNICAS	Proteoglicanos	Condroitín sulfato Decorina, Biglicano Hialuronato
	Proteínas con ácido carboxiglutámico	Osteocalcina Proteínas de la matriz con ácido carboxiglutámico
	Glucoproteínas	Osteonectina Fosfatasa alcalina Proteínas con el tripéptido RGD (Fibronectina, trombospondina, osteopontina, vitronectina, sialoproteínas óseas)
	Proteínas del plasma	Albúmina Alfa 2-SH-glicoproteína
	Factores de crecimiento	IGF-I y II ( <i>insulin growth factor I – II</i> ) TGF- $\beta$ ( <i>transforming growth factor – <math>\beta</math></i> ) PDGF ( <i>platelet derived growth factor</i> )

Tabla 1.1. Proteínas de la fase orgánica de la matriz ósea.

## b) FASE INORGÁNICA

La matriz ósea contiene abundantes sales minerales depositadas en forma de cristales de hidroxiapatita o fosfato tricálcico, además de carbonato cálcico en menor cantidad. Todas estas sales se depositan en una redícula formada por las fibras de colágeno que tienen una estructura fibrosa típica cuyo diámetro varía entre 100 y 200  $\mu\text{m}$ . Esta redícula es el sustrato en el que se depositan los minerales. La formación de los cristales de hidroxiapatita está regulada por los osteoblastos. Cuando el hueso va madurando los cristales minerales incrementan en tamaño hasta formar la estructura totalmente rígida que constituye el hueso mineralizado. Es un proceso ordenado, tiempo-dependiente, modulado por las células, se realiza a razón de 1-2  $\mu\text{m}$  / 1 día (6).

### **1.1.2. Células óseas.**

#### a) OSTEOLASTOS

Son células grandes (20-30  $\mu\text{m}$ ) responsables de la formación ósea y del mantenimiento de la arquitectura esquelética. Su función principal es la síntesis y deposición de las proteínas de la matriz osteoide (Figura 1.1.). Los osteoblastos son células con núcleos redondos y citoplasma basófilo, normalmente se encuentran en las superficies óseas (periostio y endostio) formando una única monocapa de células adherentes. En las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica los osteoblastos activos presentan las características de una célula secretora con un prominente complejo de Golgi y una gran cantidad de cisternas de retículo endoplasmático rugoso. Son células polarizadas que presentan el núcleo celular en posición distal respecto la superficie celular, además poseen regiones especializadas de la membrana plasmática modificada para el tráfico y la secreción vesicular y para establecer uniones con los osteoblastos adyacentes (Figura 1.1). Su membrana plasmática se caracteriza por ser rica en fosfatasa alcalina y por poseer receptores para la hormona paratiroidea (PTH), esteroides, estrógenos y 1,25-dihidroxitamina D3 (vitamina D). Los osteoblastos están separados de la matriz ósea mineralizada por una fina capa de matriz no mineralizada (7).



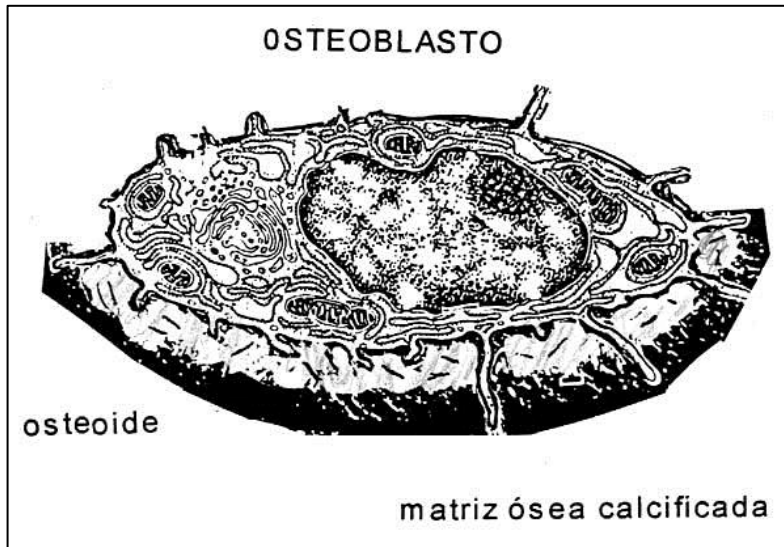


Figura 1.1. Osteoblasto.

Los osteoblastos regulan la diferenciación y actividad de los osteoclastos. De esta manera, los osteoblastos, en conjunto con los osteoclastos, juegan un papel importante en el recambio y remodelado óseo y en la homeostasis del calcio.

Los osteoblastos derivan de células progenitoras de origen mesenquimal localizadas en la superficie del periostio y en el estroma de la médula ósea. Las células mesenquimales progenitoras tienen la posibilidad de diferenciarse a mioblastos, fibroblastos, adipocitos, condrocitos u osteoblastos en función de los factores de crecimiento o diferenciación que intervengan durante su desarrollo (8).

Los osteoblastos son células especializadas que no están diferenciadas terminalmente. Durante el proceso de formación ósea los osteoblastos pueden quedar embebidos en la matriz ósea donde se diferencian hacia un estadio maduro dando

lugar a los osteocitos. Otro posible destino de las células del linaje de los osteoblastos es convertirse en células de revestimiento (células del endostio) las cuales a través de la secreción de factores locales parecen desarrollar un importante papel en el control y remodelado óseo. Por último, la vida media de los osteoblastos humanos es de una a diez semanas, al término de las cuales pueden desaparecer por mecanismos de apoptosis, transformarse en células limitantes o de revestimiento (*bone lining cells*) o en osteocitos (15 %) (9).

La proliferación y diferenciación de los osteoblastos se produce bajo la influencia de un gran número de factores de transcripción, factores de crecimiento y hormonas. El factor de transcripción Cbfa/Runx-2 es específico de osteoblasto y es imprescindible para la diferenciación de los osteoblastos actuando en las fases tempranas (10).

## b) OSTEOCLASTOS

Los osteoclastos son las células encargadas de la resorción ósea. Normalmente se encuentran en las superficies óseas de gran actividad de remodelado.

Los osteoclastos son células grandes, multinucleadas (entre 4-20 núcleos), de citoplasma acidófilo y ricas en anhidrasa carbónica y fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP). Tienen un área de la membrana plasmática especializada conocida como *rubber border* que puede considerarse como un lisosoma extracelular especializado. Esta área está formada por invaginaciones que tienen un íntimo contacto con la superficie ósea. La resorción tiene lugar en la zona que queda sellada entre el borde en cepillo y la superficie ósea llamada *laguna de Howship*. Los enzimas lisosomales (fosfatasa ácida y colagenasa) se secretan a través del borde en cepillo a la *laguna de Howship* donde las bombas de protones presentes en la membrana

---

citoplasmática de las invaginaciones crean un ambiente ácido que disuelve los constituyentes de la matriz ósea.

Los osteoclastos derivan de células hematopoyéticas mononucleares de la médula ósea, concretamente las células formadoras de granulocitos y macrófagos. Los precursores osteoclásticos mononucleares circulan por la sangre y proliferan en la superficie del endostio, se fusionan formando células multinucleares, forman el borde en cepillo y producen la resorción.

El osteoclasto es una célula móvil que después de producir ácidos y enzimas lisosomales en la laguna se desplaza a través de la superficie del hueso para resorber en otro lugar y finalmente desaparece de la zona por un proceso de apoptosis.

En la regulación de la diferenciación y la actividad osteoclástica intervienen un gran número de factores que actúan principalmente a través de los receptores de los osteoclastos. Entre ellos encontramos al receptor activador del factor nuclear kappa B que tiene un papel muy importante en la transducción de la señal de diferenciación y activación de los osteoclastos al unirse a su ligando específico (11).

### c) OSTEOCITOS

Forman el 90% de las células óseas. Los osteocitos derivan de los osteoblastos que permanecen atrapados en la matriz mineralizada que ellos mismos han secretado activamente. Estudios recientes han profundizado en el mecanismo por el cual el osteoblasto da lugar al osteocito, siendo un proceso aún no del todo conocido, aunque sí se ha observado que algunos cambios en las propiedades de motilidad de los osteoblastos pueden ser la llave para la transición de estos a osteocitos y quedan

reflejados en la alteración de la expresión de varias moléculas involucradas en las funciones del citoesqueleto (12). Actualmente se sabe que estas moléculas involucradas están controlados por los genes pertenecientes a la familia *Hedgehog*, además de ser esencial el factor de transcripción CBfa-1 (*core-binding* factor a-1, también llamado Runx2) y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), que constituyen los reguladores más potentes de la diferenciación osteoblástica desde las células mesenquimales pluripotenciales (7).

Autores como Rutishauser y Majno (13) describen dos etapas en la vida del osteocito, una etapa temprana (osteocito joven) en la cual la célula es de pequeño tamaño, residente en la matriz osteoide y no expresaba la fosfatasa alcalina, y otra etapa tardía (osteocito maduro) en la que la célula era ya de mayor tamaño, re-expresaba la fosfatasa alcalina y estaba embebida más profundamente dentro del hueso mineralizado. Esta definición ha sido revisada actualmente para añadir una nueva etapa de diferenciación: dependiendo con su localización espacial y expresión genómica, estas células se dividen en osteoides y osteocitos maduros. Este osteoide, u osteocito joven, se caracteriza por una relativa proximidad al endostio (y posiblemente al periostio). No se sabe exactamente si ambas etapas del osteocito presentan diferentes funciones biológicas o si por el contrario en ambas trabajan como mecanosensores y reguladores esqueléticos (14).

El osteocito maduro degenera dejando una laguna dentro del tejido óseo mineralizado. Las lagunas se comunican unas con otras para el aporte metabólico por medio de conductos calcóforos o canalículos; estos conductos llegan finalmente a la superficie del tejido, donde hay vasos sanguíneos de tipo capilar. En el espesor del tejido no hay vasos sanguíneos; por el interior no circula sangre sino líquido tisular. La unidad básica del hueso compacto es la osteona (Figura 1.2) o *sistema de Havers*, que se compone de cuatro partes:

- Las laminillas son anillos concéntricos de matriz que constan de sales minerales (principalmente calcio y fosfatos) que confieren dureza al hueso, y fibras de colágeno, que proporcionan resistencia.
- Las lagunas son espacios pequeños entre las laminillas donde se alojan células óseas maduras, los osteocitos.
- Desde las lagunas se proyectan los canalículos, redes de diminutos conductos que contiene las prolongaciones de los osteocitos. Los canalículos sirven como ruta para que los nutrientes lleguen a los osteocitos y los desechos se extraigan de dichas células.
- *Conducto de Havers*, el cual contiene vasos sanguíneos y nervios.

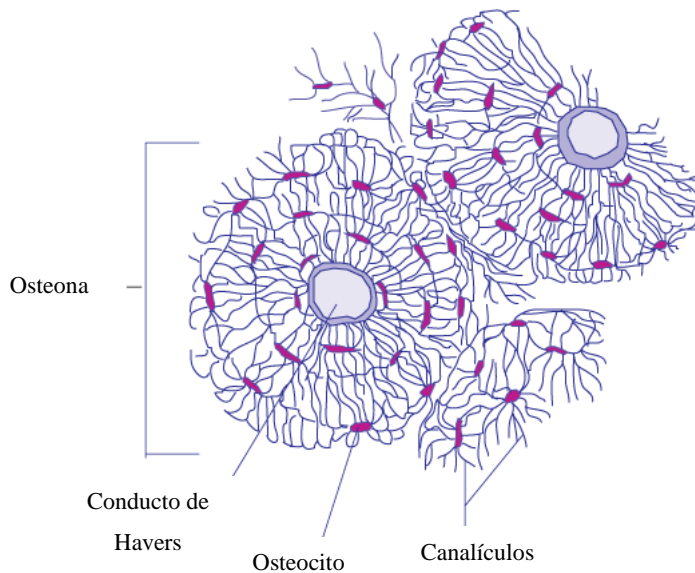


Figura 1.2. Osteona o sistema de Havers.

## d) CÉLULAS OSTEÓGENAS

Son células madre no especializadas que se derivan del mesénquima (de donde derivan todos los tejidos de tipo conectivo). Son las únicas células óseas con capacidad de división, las células hijas resultantes se transforman en osteoblastos. Las células osteógenas se localizan en la porción interna del periostio (vaina resistente de tejido conectivo denso e irregular, que rodea la superficie ósea que no está cubierta por cartílago articular), en el endostio (membrana que contiene células formadoras de hueso y recubre la cavidad medular) y en los conductos internos de los huesos que contienen vasos sanguíneos (15).

### 1.1.3. Citoesqueleto.

El citoesqueleto se encuentra en las células eucariotas, células complejas que tienen que organizar sus orgánulos, mover vesículas por su citoplasma, incluso moverse ellas mismas. Este tipo de funciones son realizadas gracias a este armazón intermolecular, responsable del mantenimiento de la forma celular, del movimiento de la célula y del mantenimiento de la posición y movimiento de las distintas estructuras celulares. Estas funciones se llevan a cabo mediante tres tipos de filamentos fundamentalmente: microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos (Figura 1.3) (16).

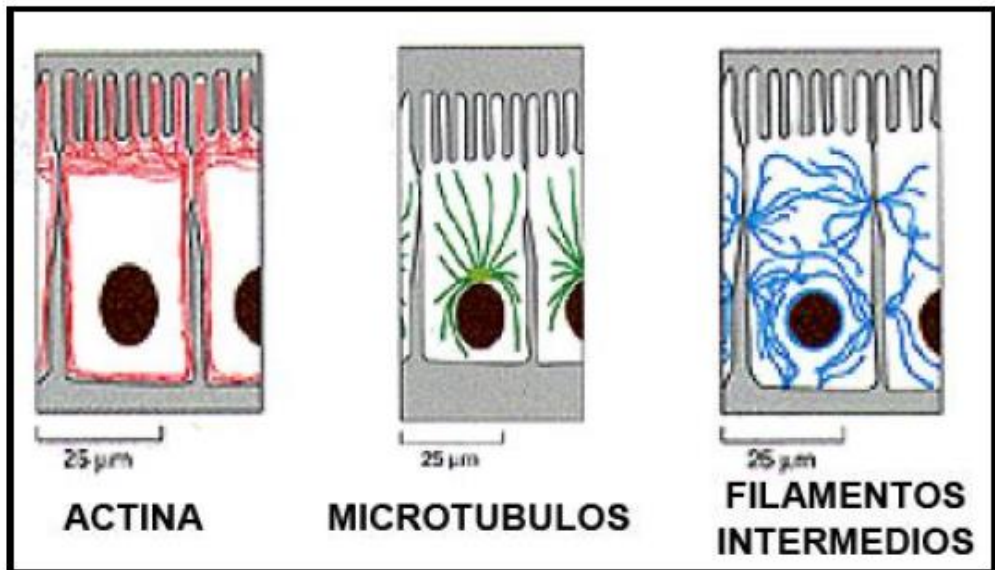


Figura 1.3. Filamentos del citoesqueleto.

Cada tipo de filamento está especializado en distintas funciones pero presentan una serie de características comunes, como son su estructura proteica y su asociación a otras proteínas. Los componentes del citoesqueleto son estructuras muy dinámicas, ya que intervienen en el transporte de estructuras celulares y de las propias células, pero en el caso de los filamentos intermedios no se produce una polimerización y despolimerización como en los microtúbulos y microfilamentos.

Debido al gran número de proteínas accesorias de los filamentos del citoesqueleto que se van descubriendo, el estudio del mismo entraña cierta dificultad.

El citoesqueleto presenta una serie de funciones fundamentales como son:

1. Control de la posición de las estructuras intracelulares: los orgánulos no están libres en el citoplasma, sino que están unidos a los filamentos del citoesqueleto, principalmente a los microtúbulos y proteínas asociadas, aunque aparecen otros filamentos.
2. Control de la forma celular: van a intervenir los tres tipos de filamentos del citoesqueleto, pero los filamentos intermedios van a provocar cierta estabilidad y resistencia mecánica. En la mayoría de las células hay una densidad mayor de filamentos de actina en la periferia celular. Estos filamentos de actina de la capa situada bajo la membrana plasmática determinan el denominado córtex celular. Son los responsables de la forma y el movimiento de la superficie de la célula. Así, dependiendo de su unión entre sí y a la membrana plasmática, las estructuras de actina pueden formar proyecciones de la superficie de la célula extraordinariamente variadas. Éstas incluyen haces puntiaguados como las microvellosidades o filopodios, velos emergentes y alargados llamados lamelipodios que ayudan a las células a



desplazarse sobre sustratos sólidos, y las evaginaciones fagocíticas de los macrófagos.

Si las clasificamos según su dinamismo podemos decir que unas son rígidas, como las microvellosidades, y que otras son dinámicas, como los pseudópodos, filopodios, lamelipodios, fibras de estrés.

3. Control transmembrana de la organización intracelular: ciertas señales extracelulares pueden unirse a receptores de la membrana plasmática y generar en ese punto una señal, que como consecuencia de ella se produzcan cambios en la organización intracelular (variación de la posición de los orgánulos, etc.).
4. Movimientos celulares: en el desarrollo de esta función vital van a intervenir los tres tipos de filamentos del citoesqueleto, en mayor o menor medida. Los tipos de movimientos que la célula desarrolla podemos dividirlos en:
  - a. Movimientos ciliares: este tipo de movimiento está llevado a cabo por los microtúbulos, ya que son este tipo de filamentos los que componen las estructuras de los cilios y de los flagelos, que estructuralmente son iguales, sólo que varía la longitud final y el número de veces que se repite la estructura.
  - b. Movimientos de células en cultivo: las células en cultivo en muchos casos presentan alteraciones en la membrana plasmática o modificaciones en la disposición de los filamentos. Pueden existir fibras de estrés, que son haces de actina que aparecen en la zona de la célula por la que se pega al frasco de cultivo. Así mismo, encontramos acumulación de fibras de actina en el córtex celular, justo debajo de la

membrana plasmática. También encontramos filopodios (estructuras alargadas parecidas a las microvellosidades, aunque más largas, delgadas y dinámicas que éstas), microespículas (parecidas a los filopodios pero más cortas), lamelipodios (estructuras en forma de lámina, formadas por una red octogonal de filamentos de actina entrecruzados, que permiten a la célula extenderse a través de una superficie sólida) y pseudópodos (prolongaciones de forma vesicular).

- c. Movimientos por quimiotaxis: en general, un tactismo es un movimiento de la célula en respuesta a un excitante exterior, en el caso del quimiotactismo, en respuesta a señales químicas. El tactismo es positivo cuando el movimiento se realiza en dirección al excitante, y negativo en el caso contrario.

Ahora nos centraremos en describir cada tipo de los tres tipos de filamentos fundamentales del citoesqueleto por separado, más en profundidad.

El citoesqueleto de actina es una red dinámica de polímeros de actina y gran variedad de proteínas asociadas. La molécula de actina tiene un peso molecular de 41,736 kD y es un único polipéptido de 375 aminoácidos asociado muy íntimamente con una molécula de ATP.

Sus principales funciones fisiológicas están relacionadas con la motilidad celular y los cambios de forma de la célula durante el ciclo celular, mantenimiento de la forma y superficie celular. También participa en la organización del citoplasma para generar fuerzas mecánicas dentro de la célula en respuesta a diversas señales extracelulares, es esencial para algunas actividades contráctiles y controla las interacciones celulares, la adhesión molecular, y el transporte intracelular (17).

Los filamentos intermedios son moléculas polipeptídicas de forma helicoidal con tres porciones que se despliegan. Poseen 310 aminoácidos y miden 48  $\mu\text{m}$  de longitud. Cada molécula se une a otra similar dando lugar a un dímero. La unión antiparalela de dos dímeros forma un tetrámero. El dímero tendría un grosor de 1,5  $\mu\text{m}$  y el tetrámero, el doble. El ensamblaje-desensamblaje de los filamentos intermedios tiene lugar mediante fosforilación. No está clara la existencia de un centro organizador de filamentos intermedios, bien sea común o específico para cada una de las proteínas. Se conoce la existencia de proteínas asociadas a filamentos intermedios (IFAP) que pueden unir unos filamentos con otros entre sí o filamentos intermedios a microtúbulos mediante las proteínas asociadas de estos.

Los filamentos intermedios son muy resistentes y se encargan del mantenimiento de la forma celular, tienen además una función mecánica que actúa también como respuesta al estrés celular.

Actualmente existe una nueva clasificación de filamentos intermedios, que los divide en seis categorías según su homología de secuencia, su estructura génica y sus propiedades de ensamblaje (18):

- TIPO I: Incluye las citoqueratinas ácidas. Son un grupo de proteínas que forman el citoesqueleto de los filamentos intermedios en las células epiteliales de vertebrados, así como de anejos cutáneos (pelo y uñas). Su peso molecular está entre 40-60 kD. Tienen un punto isoeléctrico (pI) menor a 5,7, es ácido. Están incluidas desde la citoqueratina 9 a la 20.

- TIPO II: Incluye las citoqueratinas básicas. Son diferentes a las de tipo I en características de índole bioquímica, inmune, funcional (en cuanto a capacidad de formación de filamentos) y según su homología de secuencia. Su peso molecular es mayor que las de tipo I, entre 50-70 kD. Su pI es superior a 7, es básico. Aquí están englobadas desde la citoqueratina 1 a la 8.
  
- TIPO III: es un grupo bastante heterogéneo, incluyendo a los filamentos de vimentina, de desmina, a los gliofilamentos y a la periferina.
  
- TIPO IV: Engloba los neurofilamentos y la  $\alpha$ -internexina. Esta última se encuentra en el sistema nervioso central y tiene un peso molecular de 57-150 kD.
  
- TIPO V: Aquí se engloban las lamininas nucleares.
  
- TIPO VI: Incluye la proteína nestina. Está implicada en el crecimiento axonal en su grosor. Su peso molecular es de 66 kD. También estarían incluidas otras como la sinemina, la paranemina y la tanabina.

Los microtúbulos son tubos cilíndricos de un diámetro cercano a 25  $\mu\text{m}$ . Actúan como un andamio para determinar la forma de la célula y en una amplia variedad de movimientos de las estructuras intracelulares, tales como el transporte intracelular de organelos y vesículas y la separación de las cromátidas en la mitosis.

Los microtúbulos están contruidos por unidades de proteínas globulares llamadas tubulinas (55 kD). Dos de estas tubulinas se asocian en un dímero:  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina. Son los dímeros de tubulinas los que se unen para formar los microtúbulos. Este proceso se llama polimerización o ensamble. Cada subunidad del dímero posee una molécula de GTP. El sitio que ocupa el GTP en la  $\alpha$ -tubulina está en el centro del dímero y en la  $\beta$ -tubulina se encuentra cerca de la periferia: este GTP es susceptible de poder hidrolizarse, dando GDP y luego ser intercambiado por otro GTP. Este comportamiento de la subunidad  $\beta$  permite que los dímeros puedan añadirse a microtúbulos preexistentes por su extremo  $\beta$  con GTP. Una vez dentro del microtúbulo, ocurre la hidrólisis del GTP en la subunidad  $\beta$ , lo cual debilita la unión con otros dímeros favoreciendo la desorganización del microtúbulo, fenómeno conocido como despolimerización o desensamble. El extremo de adición de dímeros suele llamarse extremo + del microtúbulo. En el extremo - ocurre el desensamble. Así, los microtúbulos tienen un comportamiento llamado inestabilidad dinámica, por el cual alternan ciclos de alargamiento y acortamiento.

#### 1.1.4. Remodelación ósea.

El hueso está sometido a un proceso continuo de renovación que se conoce con el nombre de remodelación ósea. Este proceso se lleva a cabo mediante la destrucción por los osteoclastos de pequeñas unidades microscópicas de tejido denominadas unidades de remodelación ósea (*bone remodeling units*) (19) o unidades básicas multicelulares, que posteriormente serán sustituidas por tejido óseo nuevo formado por los osteoblastos. El proceso comienza con la fase de activación, durante la cual acuden a un determinado foco los precursores de los osteoclastos que al transformarse en osteoclastos maduros comienzan a reabsorber hueso. En ese momento estamos en la fase de resorción, en la que se va labrando una cavidad tuneliforme en el hueso cortical, llamado cono de apertura, o una zona lacunar en el trabecular, denominada *laguna de Howship*. Tras la fase de inversión, periodo de aparente inactividad, los osteoblastos rellenarán esa zona con tejido óseo neoformado. Inicialmente los osteoblastos forman la matriz osteoide, que se mineraliza unos 15 días después, proceso conocido como fase de formación (20).

El proceso de remodelación se lleva a cabo en las superficies óseas, fundamentalmente en la endostal. En condiciones normales, el 75% de las superficies del hueso trabecular y alrededor del 95% del cortical se encuentran en reposo. El balance óseo es la diferencia entre la cantidad de hueso que se destruye y la que se forma en cada una de las unidades de remodelación ósea, siendo su valor igual a cero hasta los 30-40 años, y de aproximadamente -3% a partir de esta edad. La velocidad de renovación ósea, o lo que es lo mismo, el volumen de hueso renovado por unidad de tiempo, se conoce con el término de recambio óseo (*turnover*). Cuando las unidades de remodelación ósea se encuentran en equilibrio negativo, un aumento de su número, y por lo tanto, del recambio, supone un incremento en las pérdidas óseas

totales. Cuando hay una adecuada coordinación temporal y espacial entre la activación de los osteoblastos y los osteoclastos se dice que existe acoplamiento entre ambos (21).

En el ciclo de renovación ósea debemos distinguir cuatro fases: activación, resorción, inversión y formación. La activación comienza con el reclutamiento de los preosteoclastos, los cuales proliferan, se diferencian y se fusionan, para formar las grandes células multinucleadas que constituyen los osteoclastos maduros. El fenómeno de activación es consecuencia de la intervención de una serie de señales todavía no bien conocidas, entre las que deben figurar cambios en las fuerzas mecánicas locales, cambios en la situación endocrinológica general del individuo y cambios en la propia estructura ósea surgidos como consecuencia del envejecimiento o del sufrimiento de un daño.

Antes de que comience la fase de resorción, los osteoclastos deben fijarse al hueso. Para ello, los osteoblastos de revestimiento se retraen dejando huecos a través de los cuales pasan los osteoclastos. Tras establecer contacto con la matriz ósea, las células osteoclásticas se fijan al hueso gracias a la afinidad de una integrina presente en la superficie de determinadas proteínas de la matriz ósea (vitronectina, fibronectina). Tal unión se sigue de la activación en el osteoclasto de la quinasa p60c-src, molécula que interviene en la organización del citoesqueleto del osteoclasto, lo que permite a estas células adoptar la típica configuración que caracteriza al osteoclasto activo, con el borde rugoso, y un anillo rico en filamentos de actina que rodea a la zona rugosa, y que al unirse a la matriz, sella el espacio que queda entre ambas (zona rugosa del osteoclasto y matriz), aislándolo del microambiente óseo.

Tras fijarse a las superficies óseas, los osteoclastos maduros comienzan a resorber hueso. El mecanismo principal de disolución del componente mineral, que

precede al de las fibras colágenas, está mediado por la secreción de hidrogeniones ( $H^+$ ) a la zona sellada a través de un mecanismo de transporte activo ATPasa-dependiente. Los  $H^+$  proceden de la transformación previa de  $CO_2$  y  $H_2O$  en  $CO_3H_2$ , gracias a la acción de la anhidrasa carbónica, enzima presente en los osteoclastos. La secreción de  $H^+$  facilita la disolución del cristal de hidroxapatita y, además, crea las condiciones de pH idóneas (pH 4,5) para que actúen las enzimas lisosomales que disuelven la matriz orgánica. La más importante de ellas es la catepsina K, aunque también colaboran en este proceso otras proteinasas como las metaloproteiniasas 2, 9 y 13 que se encuentran enterradas en la matriz, por lo que también se las conoce con el nombre de matrixinas. Las sustancias liberadas del hueso pasan al interior del osteoclasto, que las procesa. Tras finalizar su actuación, los osteoclastos desaparecen por apoptosis (20,21).

Una vez finalizado el fenómeno de resorción, la superficie ósea queda libre de células, excepto por la presencia de unos pocos fagocitos mononucleares cuya estirpe se ha venido considerando macrofágica, aunque podría ser osteoblástica, y que, además de limpiar la cavidad, tiene la función de formar la línea de cementación sobre la que se depositará el hueso nuevo. Es la fase de inversión durante la cual probablemente se establecen señales que reclutan osteoblastos. Tras este periodo de aparente inactividad van llegando al hueso los precursores de los osteoblastos que proliferan y se diferencian a osteoblastos maduros llenando con nuevo tejido óseo el hueco previamente labrado por los osteoclastos. No se conocen con exactitud los mecanismos íntimos que determinan el acoplamiento entre los osteoblastos y los osteoclastos, aunque se cree que intervienen algunos factores de crecimiento que, enterrados en la matriz ósea al formarse la misma, son liberados desde ella cuando es destruida. Se desarrolla así la cuarta fase o de formación en la que los osteoblastos sintetizan y depositan la matriz osteoide que posteriormente se mineralizará. Se considera que aproximadamente la mitad de los osteoblastos formadores de hueso mueren por apoptosis. La otra mitad, o bien se transforma en osteoblastos de



---

superficie (células de recubrimiento) recubriendo el hueso recién formado, o bien, a medida que forman hueso, quedan enterrados en él, transformándose en osteocitos.

Los osteocitos se mantienen en contacto entre sí y con las células de la superficie ósea mediante una red de prolongaciones citoplasmáticas alojada en un sistema canalicular existente en el seno del tejido óseo.

Tanto los osteoclastos como los osteoblastos se originan en la médula ósea. Los precursores de los osteoclastos son de estirpe hematopoyética, mientras que los de los osteoblastos pertenecen al mesénquima de la médula. Los precursores de los osteoclastos no pueden desarrollarse en ausencia de las células del estroma.

Los factores que regulan el proceso de remodelación ósea sólo se conocen de modo parcial. Probablemente existen factores de naturaleza física, estímulos mecánicos y piezoeléctricos, dado que la inactividad física condiciona una pérdida de masa ósea. Para algunos autores existiría un sistema capaz de regular la cantidad de masa ósea en función, por una parte, de la sobrecarga mecánica detectada, y por otra, de las necesidades de resistencia del momento (22,23).

Sin embargo, los factores reguladores de la remodelación mejor conocidos son los de carácter humoral. Estos, a su vez, pueden ser sistémicos (factores hormonales) o locales (factores paracrinos). Dentro de los primeros se engloban las hormonas calciotropas (24) (parathormona –PTH–, 1,25-(OH) 2-D3 o calcitriol y calcitonina) y otras hormonas que no están relacionadas específicamente con el metabolismo mineral, entre las que se encuentran las hormonas sexuales (estrógenos y andrógenos), la hormona de crecimiento (GH), la hormona tiroidea y los glucocorticoides.

El término mecanostato se refiere al modelo propuesto por Harold Frost (25) para explicar el mecanismo patogénico por el que se regula el crecimiento y la pérdida de hueso en función de estímulos mecánicos que deforman localmente el mismo (fuerza, presión y torsión). Según este modelo, el aumento de la fuerza muscular ejercida sobre el hueso (durante el crecimiento o en respuesta al incremento de la carga) o la disminución de la carga (por inactividad o inmovilización) afectarán a la masa, al tamaño y a la resistencia del mismo de forma positiva o negativa, respectivamente. Así, por estímulos mecánicos se pondría en marcha un sistema de retroalimentación que determinaría cuándo el hueso necesita más resistencia o cuándo no es necesario. Por lo tanto, la teoría del mecanostato explicaría cómo la carga mecánica aplicada sobre el hueso actúa poniendo en marcha un proceso complejo de remodelado óseo, en el que el osteocito juega un papel fundamental como el mecano-sensor que transforma la señal mecánica en química y ésta, a su vez, produce la respuesta de los osteoblastos/osteoclastos. Sin embargo, los huesos son esencialmente biomecánicos. La remodelación ósea está regulada por factores locales y sistémicos, el proceso de adaptación del hueso a la carga no se explica únicamente por un efecto mecánico, sino que depende también de factores genéticos (la mayor parte de la masa ósea de un sujeto depende de su genética) y del estado normal de las células implicadas, de factores neurovasculares loco-regionales, del entorno endocrino-metabólico del organismo y del ambiente local del hueso. Por lo tanto, el mecanismo del remodelado óseo está modulado tanto por factores mecánicos como no mecánicos; entre estos últimos, de los más importantes son los factores locales, autocrinos y paracrinos (26).

Tan sólo desde finales de la década 1990 se conocen los efectores finales de todo este proceso: el ligando del receptor activador del factor nuclear (RANKL), su receptor natural (RANK) y la osteoprotegerina (OPG), todos ellos pertenecientes a la familia de los factores de necrosis tumoral (TNF). Teniendo en cuenta los efectos

antagónicos de las proteínas RANKL y OPG, es fácil entender que la remodelación ósea dependa en última instancia del equilibrio entre ambas, que, a su vez, está influido por los múltiples factores que hemos revisado hasta ahora. Así, la “Teoría de la convergencia” considera que el sistema RANK/RANKL/OPG es el efector final de la mayoría de los factores reguladores del remodelado óseo (27,28).

## **1.2. Superficies de implantes dentales.**

### **1.2.1 Propiedades fisicoquímicas, microestructurales y mecánicas del titanio.**

El descubridor del elemento químico titanio (Ti) de número atómico 22 y peso atómico 47,90 kD fue William Gregor en 1791. Su uso se remonta a tiempos antiguos. En la década de 1930, con el incremento en la tecnología de nuevos metales es cuando se inicia una nueva era de expansión de uso quirúrgico de implantes metálicos (29).

Mientras su comportamiento químico muestra muchas semejanzas con el del silicio y el circonio, como un elemento del primer grupo de transición, la química de la solución acuosa, especialmente de los estados de oxidación más bajos, tiene algunas semejanzas con la del cromo y el vanadio.

El principal estado de valencia es 4+, aunque también se conocen los estados 3+ y 2+, que son menos estables. El elemento arde al aire cuando se calienta para obtener el dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ), y cuando se combina con halógenos. Reduce el vapor de agua para formar el dióxido e hidrógeno, y reacciona de manera parecida con ácidos concentrados calientes, aunque forma el tricloruro con ácido clorhídrico. El metal absorbe hidrógeno para dar composiciones de  $\text{TiH}_2$ , y puede formar nitruro,  $\text{TiN}$ , y el carburo,  $\text{TiC}$ . Se conocen el sulfuro  $\text{TiS}_2$ , así como los óxidos más bajos,  $\text{Ti}_2\text{O}_3$  y  $\text{TiO}$ , y los sulfuros  $\text{Ti}_2\text{S}_3$  y  $\text{TiS}$ . Así mismo, están descritas sales en los tres estados de valencia.

El dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) se encuentra comúnmente en una forma negra o de color castaño conocida como rutilo. Las formas naturales que menos se encuentran en la naturaleza son la anatasita y la brooquita. El óxido básico negro ( $\text{FeTiO}_3$ ) se encuentra en forma natural como el mineral llamado ilmenita, éste es la principal fuente comercial del titanio.

Durante las dos décadas pasadas, y hasta el momento, algunos autores como Brånemark (1985), sostuvieron que los implantes a base de titanio pueden desarrollar tanto osteointegración como fibrointegración (30-32).

En efecto, este tipo de implante tiene un buen comportamiento mecánico, es bien tolerado en el medio biológico y es fácilmente colable. Es más liviano que la mayoría de los metales utilizados, debido a su baja densidad atómica, lo cual es una ventaja en alguna de sus aplicaciones. Su compleja metalurgia tiene como propiedad importante la formación de capas muy delgadas de óxidos. El titanio puro, teóricamente, puede formar varias capas de óxidos. Entre éstas están: el  $\text{TiO}$ ,  $\text{TiO}_2$  y el  $\text{TiO}_3$ . De éstas, el  $\text{TiO}_2$  es el más estable y usado bajo condiciones fisiológicas, su resistencia a la corrosión lo califica como biocompatible.

Otra propiedad física documentada en el pasado por Brånemark, y que es única para el  $\text{TiO}_2$ , es la alta constante dieléctrica, dependiendo de la estructura cristalina. Esta propiedad da como resultado uniones de *Van der Waal's* más fuertes que con otros óxidos, un hecho que puede ser importante para la interfase bioquímica. La naturaleza de la superficie de óxidos en implantes de titanio o cualquier metal depende inicialmente de las condiciones dadas durante la oxidación y el tratamiento subsiguiente del implante.

Existen muchos elementos químicos presentes en la superficie oxidada del titanio que están ausentes en una muestra de  $\text{TiO}_2$  que se toma como referencia. Se observan grandes indicios de carbono, así como pequeños de nitrógeno. Bajas concentraciones de cloro, sulfuro y calcio son detectadas frecuentemente. Sin embargo, el rol de las pequeñas cantidades de contaminantes en la biocompatibilidad de los materiales para implantes no es bien conocido. Igualmente, se debe prestar particular atención a los elementos catalíticamente activos, ya que pueden influenciar profundamente el proceso de la interfase química aún en concentraciones extremadamente bajas. Se ha observado que el titanio en sus diferentes grados de pureza y en aleación puede ser utilizado para diversos fines tanto industriales como médicos (Tabla 1.2). Además de la confección de implantes dentales podemos utilizar el titanio para la confección de prótesis, debido a sus excelentes propiedades físicas, puesto que es resistente a la corrosión y biocompatible. Cubre todos los requerimientos de un material dental y puede ser usado en la fabricación de coronas, prótesis parciales fijas y prótesis parciales removibles, aunque presenta dos grandes problemas: no puede ser revestido con porcelana feldespática convencional y la manipulación de la infraestructura es complicada. A temperaturas por encima de  $800^\circ\text{C}$ , que es la requerida para la fusión de la porcelana convencional, el titanio se oxida rápidamente, produciendo una capa muy delgada de óxido, que resulta en una inadecuada unión metal-cerámica. Además, el coeficiente de expansión térmica es muy diferente entre el titanio y la porcelana (33,34).

PROPIEDAD	Ti grado 1	Ti grado 2	Ti grado 3	Ti grado 4	Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V
Resistencia a la tracción (Mpa)	240	345	450	550	930
Resistencia máxima (Mpa)	170	275	380	485	860
Módulo de elasticidad (Gpa)	103	103	103	103	113
Utilización	Componentes industriales aeroespaciales	Tuberías	Placas de Ti	Implantes dentales	Implantes dentales Ortopedia

Tabla 1.2. Usos industriales y médicos del titanio.

Las tensiones de fractura por corrosión y la fatiga por corrosión son igualmente importantes en un sistema de implante porque pueden llevar al fallo del mismo. Las aleaciones de titanio son únicamente susceptibles a estos fenómenos bajo condiciones fisiológicas. La presencia de aluminio en concentraciones mayores del 6% hace a la aleación susceptible a este problema debido a la formación de compuestos de TiAl<sub>3</sub>. La presencia de vanadio reduce la susceptibilidad a la fractura por corrosión, debido probablemente a la supresión de la formación de compuestos de TiAl<sub>3</sub>. Igualmente, las aleaciones de titanio son extremadamente resistentes a la fatiga por corrosión. Debido a esto se considera el metal de elección cuando esta propiedad es deseada. Sin embargo, en implantología dental no ha sido universalmente aceptada la definición del término de pasividad. Se puede decir que si un metal es oxidado y los óxidos no se rompen bajo condiciones fisiológicas, el metal es pasivo o ha sido pasivado. Bascones (35) afirma que el titanio puro, así como sus aleaciones, es

---

fácilmente pasivado, formando una superficie estable de  $\text{TiO}_2$  que hace al metal resistente a la corrosión.

En el estado pasivo, explica el autor; la proporción de disolución del  $\text{TiO}_2$  es extremadamente baja. Con el tiempo, pueden verse pequeños cambios vistos en la superficie del implante del metal y puede observarse una acumulación de titanio en los tejidos. Vale la pena acotar que el nivel normal de titanio en los tejidos humanos es de 50 p.p.m. mientras que los valores de 100 a 300 p.p.m. son frecuentemente observados en los tejidos blandos alrededor de los implantes de titanio. Con estos niveles, puede observarse la decoloración de los tejidos con pigmentos de titanio. Esta proporción de disolución es una de las más bajas de todos los implantes de metal pasivados y parece ser bien tolerada por el cuerpo. El significado clínico de estos datos está sustentado por más de 20 años de experiencia clínica con el titanio puro y  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ . Al respecto, Wetzel (36) sostiene que cuando el titanio es usado como material de implante no se observa inflamación de los tejidos ni reacción de cuerpo extraño y el tejido conectivo y las células epiteliales se desarrollan rápidamente sobre la superficie.

Kawahara (37) ha demostrado sobre cultivo de tejidos y al microscopio electrónico que el titanio no sólo es estable en el organismo, sino que también es notablemente compatible con los tejidos y células que lo rodean.



### **1.2.2. Superficies de titanio en implantes dentales.**

Para determinar la respuesta tisular ante el titanio se han realizado comúnmente dos tipos de estudio. Por un lado unos más centrados en las propiedades químicas de superficie y por otro lado otros estudios centrados en la topografía de superficie. Ambas características pueden afectar al comportamiento celular y tisular.

Durante los últimos veinte años se ha ido incrementando el uso médico del titanio comercialmente puro (cpTi) y de aleaciones de titanio. El éxito de los implantes dentales de titanio ha generado un gran interés en otros usos dentales tanto para las aleaciones como para el titanio puro, incluyendo prótesis metálicas o estructuras metálicas para prótesis parciales. Se considera al titanio como el metal más biocompatible para prótesis dental.

La aleación más utilizada de titanio, tanto para usos dentales como para otras aplicaciones clínicas es la aleación titanio-aluminio-vanadio ( $Ti_6Al_4V$ ). Aunque esta aleación presenta mayor dureza que el titanio comercialmente puro, algunos autores recomiendan su uso con cautela, puesto que se pueden producir problemas de biocompatibilidad por la lenta liberación tanto de aluminio como de vanadio (38). Dentro del titanio comercialmente puro encontramos cuatro grados que dependen del contenido de impurezas (oxígeno, nitrógeno, carbono, hidrógeno y hierro) que son las que controlan y pueden hacer variar las propiedades mecánicas.

Las características fisicoquímicas tales como la energía de superficie, la carga superficial o la composición de superficie pueden ser manipuladas para conseguir una mejor interacción entre implante y células y tejidos circundantes.

Por otro lado es importante diferenciar las características topográficas de superficie como hemos comentado anteriormente, diferenciando entre las superficies lisas y las superficies rugosas (39).

Las superficies lisas fueron desarrolladas en la década de 1960 por Brånemark (40). Se trataba de una superficie brillante con una mínima rugosidad de superficie (entre 0,5-1  $\mu\text{m}$ ), compuesta por titanio comercialmente puro.

En general su aspecto macroscópico es liso y brillante, pero microscópicamente tienen circunferencias paralelas entre sí y perpendiculares al eje largo de los implantes, que son fundamentales para la viabilidad de la osteointegración. Se denominan lisas, en busca de una descripción didáctica de su aspecto macroscópico. Poseen microsurcos superficiales de patrón regular que resultan del proceso de corte del metal, medidos en algunos estudios entre 4 y 10  $\mu\text{m}$  de diámetro y 2 y 8  $\mu\text{m}$  de profundidad. Podemos observar estos anillos de pulido en la imagen de microscopía electrónica de barrido a baja resolución (23x) (Figura 1.4.) en el cuello pulido de implante GMI (GMI, Global Medical Implants S.L., Ilerimplant Group. Lérida, España) y en el aditamento protésico acoplado al mismo (170x) (Figura 1.5.).

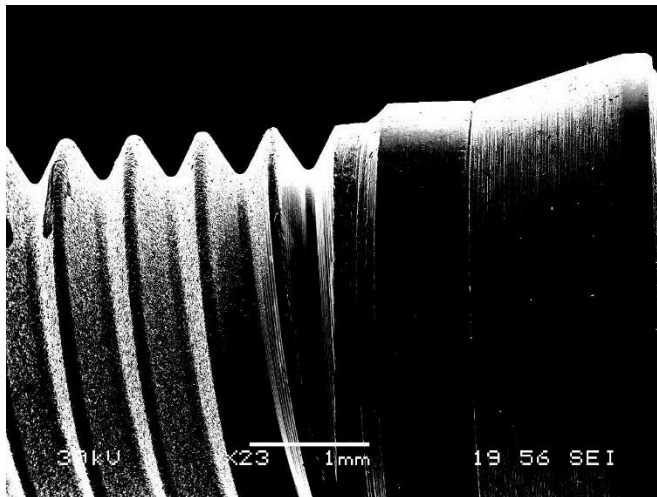


Figura 1.4. Imagen SEM (23x) de cuello pulido implante GMI.

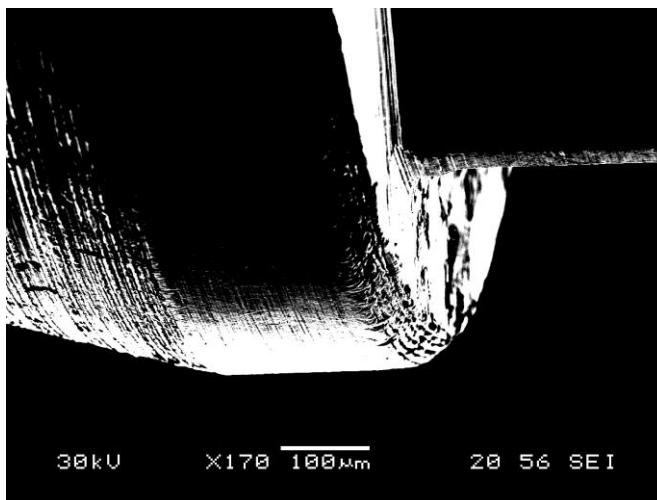


Figura 1.5. Imagen SEM (170x) de aditamento protésico de implante GMI.

Dentro de las superficies lisas podemos diferenciar entre las electropulidas y las maquinadas.

Las superficies electropulidas son superficies tratadas electroquímicamente por inmersión en baño electrolítico por el cual pasa una corriente eléctrica. Esta técnica no es utilizada con frecuencia en clínica, ya que el objetivo es conseguir una superficie con una baja rugosidad que cree un mínimo de microretención (41).

Las superficies maquinadas son aquéllas que se generalizan como lisas. En este caso se desbasta la superficie para desincrustar restos sólidos macroscópicos, quedando expuesta la nueva superficie lisa y pulida. Mediante microscopía electrónica de barrido se observa un mínimo de microrugosidad con líneas de anillo de pulido, como hemos descrito anteriormente en la figura 1.4 y 1.5.

Las superficies actuales denominadas lisas presentan mayor grado de maquinado. Por ejemplo, el cuello pulido de un implante de Biomet 3i con superficie Osseotite® (Biomet 3i, Palm Beach Garden, Florida, EE.UU.) presenta rango de rugosidad de la superficie de  $0,4 \mu\text{m}$  (42).

En contraste con la alta tasa de éxito que presenta el tratamiento con implantes de superficie lisa para diferentes grupos de pacientes, existen artículos que presentan situaciones clínicas en las cuales se observa una tendencia a una mayor tasa de fracasos, como en el caso de la colocación de implantes en zonas de baja calidad ósea (hueso tipo IV), con corticales delgadas, baja densidad trabecular y poca resistencia interna, situación muy común en las zonas posteriores de los maxilares. En una evaluación a cinco años de 1.054 implantes tipo Brånemark (superficie lisa y titanio comercialmente puro), de los cuales un 10% de ellos fueron colocados en hueso tipo IV, se observó un fracaso del 35% para este grupo, mientras que en el resto de los

implantes colocados en huesos tipo I, II y III, el fracaso fue del 3%. La recomendación final que aparece en este trabajo es que se busque la manera de predeterminar la presencia de hueso tipo IV en la evaluación prequirúrgica como método para disminuir la tasa de fracaso en estas localizaciones. Otras posibles recomendaciones son: realizar un menor fresado en el lecho óseo, usar implantes de mayor longitud, colocar un mayor número de implantes en la zona y acortar las prótesis con extensión distal libre (43).

Parece demasiado simple diferenciar entre “liso” y “rugoso”. Es importante una evaluación cuantitativa con el fin de comparar superficies preparadas mediante diferentes métodos. Wennerberg y Albrektsson (44) presentan en su revisión 150 parámetros diferentes para medir la rugosidad de la superficie y caracterizar su topografía superficial. El perfil microtopográfico para superficies rugosas de implantes dentales está definido dentro de un rango entre 1 – 10  $\mu\text{m}$ . De forma ideal se sugiere que la rugosidad debe tener un *pit* hemisférico de 1,5  $\mu\text{m}$  de profundidad y 4  $\mu\text{m}$  de diámetro (45).

Una adecuada morfología superficial permite que las células osteogénicas se adhieran y proliferen sobre la superficie del implante. Se crean así depósitos de mineral que constituyen la base de la formación del nuevo hueso. Por lo tanto, las estrategias que modifican la superficie del implante conducen a implantes con mejor respuesta osteoinductiva y osteoconductiva, y a tasas de deposición de hueso más elevadas que resultan en una osteointegración completa. Comercialmente, existe una amplia variedad de superficies en implantes dentales, muchas de las cuales poseen una comprobada eficiencia clínica.

Según las modificaciones que se pueden llevar a cabo en la superficie de los implantes dentales, se pueden encontrar variaciones en las propiedades mecánicas

(corrosión, dureza, módulo elástico), topográficas (grado de rugosidad), incluso fisicoquímicas (energía superficial, composición química de superficie) (46). Estas modificaciones son producidas mediante los tratamientos de superficie de los implantes dentales, gracias a los cuales podemos variar la topografía superficial, el grado de rugosidad y la orientación de estas irregularidades. Se han desarrollado diferentes tipos de superficies mediante diversas tecnologías empleadas para provocar microcavidades, fisuras, grietas, incrementando de este modo la rugosidad, con el fin de favorecer la unión entre las macromoléculas de la superficie del implante y del hueso. Así se incrementará la integración del implante y una mejor respuesta tisular osteoblástica, resultando en una mayor resistencia a la compresión, tensión y estrés, en definitiva una mejor respuesta biológica y física.

Las superficies rugosas pueden ser obtenidas mediante varios procesos (47-49):

a) Tratamientos de sustracción

- a. Tratamiento ácido de superficie (*acid-etching*): consiste en el desprendimiento de partículas de metal de la superficie de los implantes mediante su inmersión en ácidos fuertes, como el ácido fluorhídrico (HF), ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), ácido nítrico ( $HNO_3$ ) o ácido clorhídrico (HCl). Este tipo de tratamiento produce unos *micropits* en la superficie entre 0,5 y 2  $\mu m$ .
- b. Tratamiento con chorreado de partículas (*grit-blasting*) o arenado (*sand-blasting*): consiste en chorrear la superficie de los implantes maquinados con partículas de diversos materiales. Se puede realizar con óxido de aluminio ( $Al_2O_3$ ), óxido de titanio ( $TiO_2$ ) e

---

hidroxiapatita. Estos elementos poseen una dureza mayor que la del material del implante, colisionan sobre la superficie metálica y forman depresiones irregulares llamadas macroretenciones.

- i. Óxido de aluminio: la rugosidad producida en la superficie variará según la granulometría del material de chorreado. La alúmina al ser un material insoluble en ácido es difícil de eliminar de la superficie del titanio tras el tratamiento, por lo que pueden interferir en la osteointegración de los implantes.
  - ii. Óxido de titanio: las partículas utilizadas suelen ser de unos 25  $\mu\text{m}$ , produciendo una rugosidad aproximadamente de entre 1-2  $\mu\text{m}$ .
  - iii. Fosfatos cálcicos (hidroxiapatita, fosfato beta-tricálcico): son materiales reabsorbibles, fácilmente retirables de la superficie de titanio tras su tratamiento.
- c. Tratamiento con chorro de partículas asociado al tratamiento ácido (*SLA surface: sand-blasted, large grit, acid-etched*): se asocian los dos tratamientos con el objetivo de obtener macroretenciones (2  $\mu\text{m}$ ) con el chorro de partículas y microretenciones (1,3  $\mu\text{m}$ ) mediante un ataque ácido.
- d. Tratamiento láser: crea rugosidades con profundidad, tamaño, dirección y orientación controlados. Además, presenta un índice

---

bajo de contaminación, ya que no existe contacto de las sustancias químicas con los implantes.

b) Tratamientos de adición

- a. *Titanium plasma-spraying (TPS)*: este método consiste en la sinterización de superficies mediante adición de partículas esféricas de titanio a alta temperatura, las cuales se condensan y fusionan formando una capa de 30  $\mu\text{m}$  aproximadamente. Como resultado, la superficie TPS presenta una rugosidad aproximada de 7  $\mu\text{m}$ . Estas superficies, a diferencia de las superficies por sustracción, no presentan flancos puntiagudos, sino poros.
- b. Tratamiento con oxidación anódica (*anodization*): es un método electroquímico que produce superficies micro- o nanoporosas mediante anodización potencioestática, galvanostática u oxidación electrolítica en ácidos fuertes ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HF}$ ) a alta densidad ( $200\text{A}/\text{m}^2$ ) o potencial (100 V). Se conoce como anodizado a la capa de protección artificial que se genera sobre el metal mediante el óxido protector del metal.

c) Nuevos tratamientos

- a. Rugosidad de superficie a escala nanoscópica: el rol biológico exacto de este tipo de superficies aún es desconocido puesto que no existe un protocolo estandarizado que permita reproducir exactamente la topografía a un nivel nanométrico en superficies de este tipo (50).



- 
- b. Recubrimiento de fosfato cálcico biomimético sobre la superficie de titanio de los implantes: inspirado en el proceso natural de biomineralización. En este método biomimético se lleva a cabo mediante la precipitación de cristales de apatita de fosfato cálcico sobre la superficie de titanio mediante fluidos corporales simulados (SBF) a temperatura ambiente.
- c. Superficies bioactivas (51-53). El principio que sigue este procedimiento es modificar la superficie añadiendo una biomolécula que incremente la biocompatibilidad de la superficie y por otro lado la prevenga de posibles complicaciones implantarias tardías. Se ha estudiado la incorporación de recubrimientos que tengan un efecto de estimulación en el tejido óseo, tales como los factores de crecimiento, miembros de la familia *de transforming growth factor* (TGF- $\beta$ ), en particular las proteínas morfogénicas humanas (BMPs), TGF- $\beta$ 1, o *insulin-like growth factors* (IGF-1 and 2). También se ha observado que la adición de capas de fibrogeninas y fibronectina promueve la formación ósea.

---

## **1.3. Osteointegración de los implantes dentales.**

### **1.3.1. Concepto de osteointegración.**

La historia de la implantología dental moderna se remonta a principios de la década de 1960, cuando Brånemark sienta las bases de la osteointegración, y describe los primeros implantes dentales de titanio con forma de tornillo. El concepto de osteointegración fue presentado en la conferencia de Toronto en mayo de 1982, en la cual se describió un estudio en animales *in vivo* y los resultados clínicos obtenidos sobre humanos tratados en Suecia desde 1965.

Para reemplazar los dientes ausentes se han utilizado sistemas de implantes de diferentes tipos entre lo que se incluyen implantes subperiósticos, implantes endoóseos con encapsulado fibroso e implantes endóseos en contacto directo con el hueso (osteointegrados).

La denominación de osteointegración fue propuesta originalmente por Brånemark et al. en 1969, aunque fue definida por Albrektsson et al. en 1981 como “la conexión directa, estructural y funcional, entre el hueso vivo y la superficie de un implante endoóseo cargado funcionalmente”; se produce una unión mecánica directa y estable sin interposición de tejido conectivo, identificable con microscopio óptico, y por tanto no hay movilidad. En 1991 Zarb y Albrektsson (54,55) propusieron una definición que hace referencia a un concepto mucho más clínico que considera la osteointegración como “un proceso en el que una fijación rígida de material aloplástico, clínicamente asintomática, es conseguida y mantenida en hueso durante una carga funcional”.

Schroeder y col. (1976, 1981, 1995) (56) usaron el término anquilosis funcional para describir la fijación rígida del implante en el hueso maxilar y afirmaron que “el hueso nuevo es depositado directamente sobre la superficie del implante, siempre que se sigan las reglas para la instalación atraumática del implante (rotación del instrumento cortante a menos de 800 r.p.m. y enfriamiento con suero fisiológico estéril) y que el mismo exhiba estabilidad primaria”. Por consiguiente, para conseguir las condiciones adecuadas para la osteointegración (o anquilosis funcional) el implante debe exhibir una fijación inicial correcta (estabilidad primaria) después de ser instalado en el sitio receptor. Esta estabilidad inicial o primaria es resultado de la relación de contacto o de fricción que se establece tras la inserción del implante entre el hueso mineralizado (a menudo el hueso cortical) en el sitio receptor y el dispositivo metálico.

El concepto de osteointegración debe ser definido a múltiples niveles; clínico, anatómico, histológico y ultraestructural. Es importante tener en cuenta que el trabajo de Brånemark es considerado como *gold standard* con el que la investigación en esta línea se compara.

La osteointegración se consigue con implantes de material bioinerte como el titanio. La osteointegración no depende sin embargo exclusivamente de la biocompatibilidad del material, también influyen el ajuste correcto del implante al lecho óseo, la técnica quirúrgica empleada, el diseño del implante y la calidad del tejido óseo.

Desde entonces hasta nuestros días la implantología dental ha demostrado ser una técnica eficaz y segura para reponer dientes perdidos. En sus comienzos los implantes fueron empleados tan sólo en pacientes totalmente edéntulos. Tal ha sido el avance que los criterios de éxito han variado desde el logro de la osteointegración,

hasta la incorporación de los implantes dentales en el plan de tratamiento global en el paciente que acude con alguna ausencia dentaria a la consulta odontológica, exigiendo una estética óptima, es decir, que la prótesis implantosoportada se mimetice al máximo con sus dientes naturales.

Son varios los estudios que evalúan la biocompatibilidad de diferentes materiales comúnmente utilizados en la fabricación de implantes dentales. La literatura científica (57) recoge al titanio como *gold standard* para este uso debido a su alta resistencia a la corrosión causada por el ambiente fisiológico y su estabilidad mecánica durante todo el proceso de osteointegración. Se recoge además que el niobio, el tantalio, el circonio, el vanadio, el aluminio y el molibdeno son los materiales más favorables para ser usados en aleaciones de titanio con fines biomédicos (58). Aunque estas aleaciones no son tóxicas y son altamente inertes, muchas de ellas no establecen una fuerte conexión con los tejidos circundantes y pueden llegar a inducir la formación de tejido fibroso en lugar de tejido óseo (59). Para evitar esto, las superficies de los implantes dentales son expuestas a tratamientos superficiales que crean patrones en la superficie metálica del biomaterial en la escala micro y nanométrica. Estos patrones aumentan la retención de moléculas presentes en la interfase hueso-superficie del implante dental que conducen a un aumento de la osteointegración.

### **1.3.2. Interacción de los osteoblastos con las superficies de titanio.**

El éxito en el tratamiento con implantes dentales depende de tres componentes: hueso, tejido conectivo y epitelio, cada uno de los cuales juega un papel fundamental. El hueso actúa como anclaje propiamente dicho gracias a la osteointegración, mientras que el tejido conectivo y epitelio juegan un papel fundamental en el resultado estético asociado a las características de cicatrización de ambos tejidos. Según las características que tenga la superficie del implante así se comportarán los tejidos periimplantarios.

Tras la implantación pueden ocurrir dos fenómenos en la superficie implantaria. Por un lado, que el hueso contacte con la superficie y se produzcan los mecanismos necesarios para que se realice una correcta osteointegración, o por el contrario, que se produzca una encapsulación fibrosa que haga fracasar el tratamiento, involucrando a los tejidos blandos que llegan a recubrir la superficie implantaria. En la encapsulación fibrosa están involucrados los tres tipos de tejidos que presentan diferentes patrones de crecimiento.

Para comprender mejor los mecanismos del éxito primario de los implantes dentales, la osteointegración, debemos conocer aquellos mecanismos que la hacen posible, entre ellos la adhesión celular, en particular la adhesión de los osteoblastos.

La adhesión celular está involucrada en varios fenómenos naturales tales como la embriogénesis, el mantenimiento de la estructura de los tejidos, la cicatrización, la respuesta inmune, la metástasis, así como la integración en los tejidos de los biomateriales. La biocompatibilidad de los materiales está íntimamente relacionada

---

con el comportamiento de las células en contacto con ellos y de las características de la superficie.

El término adhesión recoge varios fenómenos. La fase de acoplamiento ocurre rápidamente y envuelve eventos a corto plazo como son las uniones fisicoquímicas entre las células y el material (fuerzas iónicas, uniones de *Van der Waals*, etc.). Tras ella ocurre la fase de adhesión, en la cual, más a largo plazo, se ven involucradas distintas biomoléculas como las proteínas de membrana celulares, las proteínas del citoesqueleto que interactúan para inducir la señal de transducción y promover así la acción de factores de transcripción.

Esta interacción osteoblasto/material dependerá de la topografía, composición química y energía superficial de éste último, que determinarán el comportamiento biológico.

Las células no interactúan por sí mismas con el material desnudo si no que está condicionado por los componentes de fluidos biológicos, el pH, la composición iónica, la temperatura, las proteínas y substratos, todos ellos son factores que influyen directamente en la adsorción de las proteínas. En el caso de la interacción con el titanio, la adhesión celular está correlacionada con los parámetros de rugosidad y en particular con los parámetros que describen la organización de las superficies rugosas.

Las moléculas de adhesión se caracterizan por su capacidad de interactuar con un ligando específico. Estos ligandos deben estar situados en la membrana de las células vecinas o deben ser proteínas de la matriz extracelular. Las moléculas de adhesión pertenecen a diferentes familias. Hay cuatro principales: selectinas, superfamilia de las inmunoglobulinas, cadherinas e integrinas. Entre ellas las más estudiadas han sido las cadherinas e integrinas.

Las integrinas son las responsables de la unión osteoblasto-substrato y las cadherinas de la unión osteoblasto/osteoblasto. La familia de las integrinas está compuesta por 22 heterodímeros de dos tipos de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (16 subunidades  $\alpha$  y 8 subunidades  $\beta$ ). Esta diversidad de estructuras está asociada a varias posibilidades de uniones con los ligandos. Las integrinas son heterodímeros transmembrana asociados no-covalentemente con subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , cada subunidad está hecha de un gran dominio extracelular, otro transmembrana y uno menos amplio citoplasmático.

Las cadherinas son glucoproteínas que actúan como cateminas que a su vez interactúan con proteínas intracelulares del citoesqueleto de actina. La familia de las cadherinas está compuesta por numerosos tipos de moléculas calcio-dependientes.

Por último describiremos las *gap-junctions*, responsables de la comunicación célula-célula, que ocurre por el intercambio directo de iones por esta vía. Este tipo de canal está constituido por *homohexamus* derivadas de las proteínas de la familia de las conexinas. Cuando la conexión de una célula está en comunicación con una estructura similar de una célula vecina se forma un canal transcelular. Junto a ello, otras uniones adherentes (como los desmosomas) otorgan anclaje alrededor de las células y permiten un intercambio directo de iones o pequeñas moléculas entre ellas (60).

La proliferación celular está influenciada por muchos estímulos; entre ellos tenemos a citoquinas y factores de crecimiento presentes alrededor de las células, las hormonas en la circulación y las tensiones biomecánicas que también pueden promover la proliferación del osteoblasto. Si tenemos como estrategia biológica central la reparación de la herida y proporcionar el mayor número de células posibles para formar un nuevo tejido, podemos utilizar a las citoquinas para promover la proliferación de los osteoblastos como mecanismo de ayuda para controlar la formación ósea. Para que la osteointegración se dé sobre la superficie de los implantes

es necesaria la producción de matriz mineralizada. La célula osteoblástica recién reclutada es incapaz de producir matriz ósea, para ello debe transformarse en un osteoblasto secretor. Dicho cambio puede ser estimulado por proteínas osteoespecíficas de la matriz extracelular. Después del inicio de la síntesis de abundante colágeno, los osteoblastos adquieren la capacidad de sintetizar proteínas específicas de matriz ósea y de dirigir la mineralización. Algunos marcadores del proceso de diferenciación del osteoblasto incluyen proteínas de la matriz con relativa especificidad como la fosfatasa alcalina (ALP), la osteonectina, la osteopontina y la osteocalcina. La diferenciación es un proceso selectivo que termina convirtiendo las células secretoras en células de revestimiento u osteocitos. Todavía no se tiene completa claridad sobre la forma, la presencia de los implantes en el sitio quirúrgico altera el medio ambiente celular e influye en la fisiología del osteoblasto. Aunque la formación ósea puede ocurrir de manera directa sobre una variedad de sustratos metálicos, se ha observado que el material y las modificaciones topográficas pueden alterar la cantidad de hueso formado (61,62).



### **1.3.3. Acontecimientos que se producen en el hueso tras la colocación de los implantes.**

En implantología dental debemos tener en cuenta una regla básica: cuanto menos traumático sea el procedimiento quirúrgico y menor la lesión o daño tisular en el sitio receptor durante la instalación del implante más rápido será el proceso por el cual se forme hueso nuevo depositado sobre la superficie implantaria.

Los diversos pasos usados en el procedimiento de colocación de un implante dental como son la incisión de la mucosa, seguida por el levantamiento de colgajo mucoso y separación del periostio de su relación con las tablas corticales, preparación de un lecho implantario en el hueso cortical y esponjoso del sitio receptor e inserción del implante dental en ese conducto, implican una serie de agresiones mecánicas tanto en la mucosa como en el tejido óseo. El huésped responde a esas lesiones con una reacción inflamatoria cuyo principal objetivo consiste en eliminar las partes dañadas de los tejidos y preparar el sitio para la regeneración o reparación. A la lesión recién descrita del tejido duro debe agregarse el efecto del denominado ajuste a presión. Es decir, cuando el implante insertado es de diámetro levemente superior al del lecho quirúrgico preparado en el hueso del sitio receptor, el tejido óseo mineralizado en la periferia del implante es comprimido, los vasos sanguíneos se colapsan (en particular los de la porción cortical del lecho) y la nutrición de esta porción del hueso se ve comprometida. Los tejidos afectados la mayoría de las veces resultan desvitalizados.

El daño en los tejidos duros y blandos del sitio receptor inicia el proceso de curación de heridas que en definitiva asegura que el implante sea anquilosado en el hueso, es decir, osteointegrado. También se establece una delicada fijación de la

---

mucosa que forma un sellado de tejido blando que protege al hueso de las sustancias de la cavidad bucal.

Por otra parte, la curación del hueso seccionado después de la instalación de un implante es un proceso complejo que aparentemente incluye diferentes acontecimientos en los compartimentos cortical y esponjoso del sitio quirúrgico. En el compartimento de hueso cortical, para que se pueda formar hueso nuevo debe eliminarse el tejido óseo desvitalizado. Por otra parte, en el compartimento de hueso esponjoso del sitio receptor el daño infligido quirúrgicamente (preparación del lecho implantario y colocación del implante) da como resultado una lesión de la médula ósea que al principio se caracteriza por un sangrado localizado y por la formación de un coágulo. El coágulo se reabsorbe gradualmente y entonces el compartimento es copado por vasos sanguíneos y células mesenquimáticas en proliferación: tejido de granulación. Como resultado de la migración continua de células mesenquimáticas provenientes de la médula ósea circundante el tejido de granulación joven es reemplazando por tejido conjuntivo provisional y finalmente por osteoide. En el osteoide se va a producir el depósito de hidroxapatita en torno a la estructuras vasculares neoformadas. Así se forma hueso inmaduro, posteriormente hueso reticular y finalmente la osteointegración, una conexión directa entre el hueso neoformado y el dispositivo implantado.

En resumen, en la fase inicial del proceso que desemboca en la osteointegración, el hueso laminar desvitalizado del compartimento cortical es importante para la fijación inicial del implante. Sin embargo, la osteointegración a menudo se establece primero en áreas ocupadas por hueso esponjoso.

En los procesos de cicatrización de la herida quirúrgica se incluyen una serie coordinada de eventos que intentan restaurar los tejidos a su estado inicial, estos

eventos se dividen en tres fases (Tabla 1.3.): inflamación, proliferación y maduración. Otro aspecto a tener en cuenta en este proceso de cicatrización es la regeneración y reparación tisular, entendiendo que la regeneración se da por tejidos que son estructural y funcionalmente similares a los tejidos dañados y la reparación produce un tejido estructural y funcionalmente diferente al ya existente. Por lo tanto, podemos dividir los tres estadios de la cicatrización ósea (63):

- Fase inflamatoria: durante la preparación quirúrgica del lecho óseo se produce una capa delgada de hueso necrótico en la región periimplantaria. La exposición inicial del implante a los tejidos locales lo pone en contacto con células y líquido extracelular, produciéndose una rápida adsorción de proteínas plasmáticas locales sobre la superficie del implante. Al contacto con superficies sintéticas, las plaquetas se activan y liberan adenosina, serotonina e histamina, produciéndose más agregación plaquetaria y trombosis local. Se activa la cascada de la coagulación (vía intrínseca y extrínseca), se produce vasodilatación por liberación de bradiquininas y se aumenta la permeabilidad endotelial.

Inicialmente se presenta una respuesta celular inflamatoria inespecífica por migración de neutrófilos hacia el área de daño tisular (alcanzando su pico máximo a los 3-4 días), cuyo papel principal es la fagocitosis y eliminación de detritus y tejido dañado. Los eosinófilos acompañan a los neutrófilos en la fagocitosis, completándose así la primera línea de defensa celular. Al final de la primera semana se da una respuesta inflamatoria más específica apareciendo los linfocitos T, linfocitos B y los macrófagos. Su función es localizar antígenos extraños introducidos durante el procedimiento quirúrgico, tales como bacterias y detritus de placa, para su identificación y eliminación. La reacción del macrófago a la exposición de

materiales extraños depende de la naturaleza fisicoquímica del material. Unos cuantos macrófagos localizados sobre la superficie de los implantes son normales, sin estar asociados con una respuesta inflamatoria exagerada. Sin embargo, la aparición de un gran número de células gigantes durante un tiempo prolongado puede considerarse un problema y sugiere la presencia de una reacción inflamatoria crónica y probablemente el fracaso de la osteointegración del implante.

- Fase proliferativa: posteriormente se inicia el proceso de neovascularización, acompañado de diferenciación, proliferación y activación celular que da como resultado la producción de una matriz de tejido conectivo inmaduro que es posteriormente remodelado. Esta fase de reparación ósea comienza estando aún activa la fase inflamatoria, aproximadamente al tercer día. La angiogénesis se produce como resultado a la hipoxia inicial ocasionada por todo este proceso inflamatorio. La llegada del oxígeno y los nutrientes necesarios permite la diferenciación de células mediadoras en fibroblastos, condroblastos y osteoblastos que depositan matriz extracelular de colágeno, glicosaminoglicanos, glicoproteínas y glicolípidos. Se forma un callo fibrocartilaginoso que se transforma en callo óseo por medio de una osificación endocondral (6-8 semanas).
- Fase de maduración: el hueso necrótico que se produce en los espacios de la interfase con el implante es reemplazado por hueso vital por aposición. Este hueso inmaduro, acompañado por un proceso de formación de hueso lamelar, termina proporcionando continuidad con el hueso basal vecino.
- Interfase implante-hueso: el tipo de interfase que se desarrolla depende de muchas variables. Materiales como el cobre son encapsulados por tejido

conectivo fibroso, con alta predictibilidad, cuando se implanta en hueso, mientras que otros tipos de materiales cicatrizan con contacto óseo directo a la superficie del implante. La micromovilidad causada por carga prematura puede ser otro factor que lleva a la encapsulación por tejido fibroso. En general, la interfase implante-hueso está compuesta por hueso calcificado, matriz osteoide no mineralizada y tejido conectivo.

El material del implante en cuestión es el factor más importante que determina la naturaleza química de esta interfase.

<b>FASE</b>	<b>TIEMPO</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>
Inflamatoria	1 – 10 días	Adsorción de proteínas plasmáticas Agregación plaquetaria Activación de la cascada de coagulación Liberación de citoquinas Respuesta celular inflamatoria inespecífica Respuesta celular inflamatoria específica Inflamación mediada por macrófagos
Proliferativa	3 – 42 días	Neovascularización Diferenciación, proliferación y activación de células Producción de matriz de tejido conectivo inmaduro
Maduración	Después del día 28	Remodelado de la matriz ósea inmadura Proceso de formación/reabsorción ósea Remodelado ante la carga del implante Reabsorción ósea fisiológica

Tabla 1.3. Fases de cicatrización de la herida quirúrgica.

La formación de hueso nuevo en el reborde alveolar después de la colocación de los implantes dentales ha sido estudiada en experimentos con diversos modelos animales. En modelo animal, Berglundh et al. (64) y a Abrahamson et al. (65)

describieron los pasos en la formación de hueso y la osteointegración de implantes dentales (se utilizaron implantes fabricados especialmente con forma de tornillo sólido de titanio comercialmente puro (cpTi) y configurados con topografía de superficie rugosa (SLA®; Straumann®, Basilea, Suiza).

- A las dos horas de la implantación: las zonas periféricas del roscado están en contacto con las invaginaciones de la vía preparada por el corte en el hueso cortical. Las cámaras de curación están ocupadas por un coágulo de sangre en el cual contiene eritrocitos, neutrófilos y monocitos/macrófagos alojados en una red de fibrina. Los leucocitos están ocupados aparentemente en el proceso de limpieza de la herida.
- A los cuatro días (Fibroplasia): el coágulo ha sido reemplazado en parte por tejido de granulación con numerosas células mesenquimáticas, componentes de la matriz y estructuras vasculares neoformadas (angiogénesis). De este modo queda establecido un tejido conjuntivo provisional.
- Después de una semana (Modelado óseo): las cámaras de curación están ocupadas por un tejido conjuntivo provisional rico en estructuras vasculares y que contiene numerosas células mesenquimatosas. El número de células inflamatorias remanentes es relativamente bajo. En grandes compartimentos de la cámara se ve hueso inmaduro rico en células (hueso reticular) dentro de tejidos mesenquimatosos que rodeaban a los vasos sanguíneos. Esas áreas de formación de hueso reticular aparecen en el centro de la cámara y también en otras localizaciones que aparentemente están en contacto directo con la superficie del implante de titanio. Esto fue considerado representativo del comienzo de la primera fase de la osteointegración: contacto entre la superficie del implante y el hueso reticular neoformado.

- 
- Después de dos semanas: la formación de hueso reticular se acentúa en todos los compartimentos y rodea al implante tanto en la parte apical como en la lateral. En las regiones de médula ósea (la parte apical del implante) se encuentran grandes áreas de hueso reticular neoformado que aparentemente se extienden desde el hueso viejo original hasta el tejido conjuntivo provisional y en muchas partes llegan hasta la superficie del dispositivo de titanio. En este intervalo la mayor parte de la superficie implantaria está ocupada por hueso neoformado y se ha establecido una osteointegración más integral y madura. En las áreas roscadas hay signos de formación en curso de hueso nuevo. De este modo, después de dos semanas de curación las áreas del sitio receptor ubicadas en posición lateral respecto del implante, que se hallan en contacto directo con el hueso huésped inmediatamente después de la cirugía de instalación y que suministran fijación inicial al implante, han experimentado resorción tisular y formación de hueso nuevo.
  
  - Después de cuatro semanas: el hueso neoformado mineralizado se extiende desde la superficie ósea manipulada hasta la cámara y una capa continua de hueso reticular rico en células cubre la mayor parte de la pared de titanio de la cámara. La porción central de la cámara está llena de esponjosa primaria rica en estructuras vasculares y en células mesenquimatosas.
  
  - Después de 6-12 semanas (Remodelado): la mayor parte de las cámaras de curación están llenas de hueso mineralizado. En el tejido neoformado y en el hueso mineralizado que entra en contacto con la superficie del implante puede verse tejido óseo que incluye osteonas primarias y secundarias. Las trabéculas de hueso mineralizado están rodeadas por médula ósea con vasos sanguíneos, adipocitos y células mesenquimatosas.

### **1.3.4. Correlación entre las señales moleculares y la unión del hueso a la superficie de titanio.**

Con el fin de conocer más en profundidad las moléculas y las variables bioquímicas relacionadas más íntimamente con la osteointegración, Monjo et al. (66) presentan un análisis regresivo múltiple utilizando discos de titanio colocados en modelo animal (hueso cortical de conejos blancos neo-zelandeses), los cuales son explantados a las cuatro y ocho semanas de cicatrización para su evaluación.

Se procedió a evaluar las correlaciones entre las muestras extraídas y diversos marcadores de tejidos presentes en el fluido tisular (actividad de la fosfatasa alcalina, ALP, lactato deshidrogenasa, LDH; y el contenido total de proteínas) y los componentes del hueso periimplantario (osteoblastos, osteoclastos y marcadores de la inflamación), por su importancia en la cicatrización ósea y la osteointegración. Observaron que las fuerzas de extracción de los discos eran mayores a las ocho semanas que a las cuatro semanas. Relacionaron la retirada con diversos aspectos:

- Correlación entre la retirada del disco con la composición tisular del hueso periimplantario: se observan niveles altos de ARN y ADN específicos que reflejan una etapa proliferativa. El hueso maduro presenta menos contenido en proteínas y más contenido mineral.
- Correlación entre la retirada del disco con el contenido total de proteínas, actividad de ALP (enzima hidrolasa responsable de eliminar grupos fosfatos de varios tipos de moléculas como nucleótidos, proteínas y alcaloides) y LDH (enzima catalizadora correspondiente a la categoría de las oxidoreductasas, dado que cataliza una reacción redox, en la que el piruvato es reducido a



lactato gracias a la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup> en el fluido tisular): el fluido tisular recogido de los discos fue utilizado para analizar la actividad de la ALP y de LDH (67). El análisis de LDH es un marcador sensible al daño tisular y la necrosis, mientras que el análisis de ALP nos da información sobre los procesos de mineralización alrededor de los implantes dentales. Tras cuatro y ocho semanas de mineralización no se observó ninguna variación estadísticamente significativa de ninguna de las variables analizadas.

- Correlación entre la retirada del disco con la expresión genética de marcadores óseos en el hueso periimplantario: se analizaron los niveles de expresión de diferentes genes relacionados con la formación y resorción de hueso e inflamación en el tejido óseo periimplantario. Se analizó la correlación entre la fuerza de retirada del disco y los niveles de ARNm de los genes relacionados con la formación ósea: runx2, colágeno 1, osteocalcina y IGF-I. Se encontró que todos estos genes de formación de hueso estudiados mostraban una correlación significativa con el test de tensión de retirada del disco después de cuatro y ocho semanas de cicatrización. La correlación entre la expresión de ARNm de citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10) y la fuerza de retirada del disco también fue investigada, se observó una correlación negativa no significativa entre los niveles de expresión de ARNm y la fuerza de retirada, tanto a las cuatro como a las ocho semanas; al igual que en otros tipos de citoquinas.

Este estudio muestra que una mejor osteointegración se asocia con una disminución de los constituyentes orgánicos del hueso alrededor del implante. Por otra parte, también demostró la regulación positiva de genes esenciales para la formación/reabsorción de hueso. Entre todos los genes analizados en el estudio, tanto la osteocalcina como el colágeno 1 se observó que eran los marcadores predictivos

más fiables para la osteointegración después de cuatro y ocho semanas de cicatrización respectivamente. Estos resultados sugieren que la evaluación de estos marcadores podría ser relevante para el estudio de nuevas superficies de implantes dentales para conseguir una cicatrización del hueso más rápida y una mejor osteointegración.

Dado que las reacciones *in vivo* son manejadas por mediadores moleculares, se podría suponer que tales mediadores juegan un papel importante en las reacciones de la interfase hueso-implante. Cuando un implante se coloca en el lecho óseo, uno de los primeros sucesos es la adsorción de proteínas sobre el sustrato, lo que ocurre en los primeros 10-60 segundos. El grupo de proteínas adsorbidas parece depender de las propiedades físicas y electroquímicas de la superficie dada. Diferentes superficies tienen distintas propiedades de adsorción, las cuales están estrechamente relacionadas con aspectos químicos que determinan el grado de biocompatibilidad del material. Las biomoléculas con más alta especificidad para la superficie del implante forman la primera capa monoatómica sobre la cual se asientan otras capas moleculares. A mayor distancia se ubican complejos biológicos más organizados y estructuras celulares. Se puede pensar que el grupo de proteínas adsorbidas determina la clase de células que interactúan con la superficie del implante. Si a la superficie del material no pueden unirse las macromoléculas que conllevan la estimulación de la función del osteoblasto, el material probablemente no es adecuado para ser utilizado como implante en tejido óseo. Tales moléculas incluyen proteínas de adhesión y factores de crecimiento. El hueso neoformado está asociado con el factor transformante de crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, los cuales han sido presentados como mitógenos para las células óseas. El TGF- $\beta$  se encuentra en hueso, aumenta la síntesis de fibronectina y se ha relacionado con remodelado óseo. Se podría pensar que las superficies de materiales que sean capaces de interactuar con dichos péptidos reguladores y de crecimiento hacia la óseo-morfogénesis serían, probablemente,

---

integrados biológicamente. Las citoquinas son un conjunto de proteínas de pequeño peso molecular sintetizadas por multitud de células especialmente las células del sistema inmune. Su función es inmunorreguladora siendo fundamentales en la comunicación y en las interacciones que establecen las células del sistema inmune entre sí y con otras células. Las citoquinas dirigen la respuesta inmune innata y la respuesta inmune específica e intervienen en la inflamación y en la hematopoyesis. Para ello activan a macrófagos, eosinófilos, células NK y neutrófilos, inducen la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno por parte de los macrófagos y participan en los procesos hematopoyéticos. Participan en procesos tan importantes como la inflamación, la regulación de la expresión del MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de clase I y de clase II, las respuestas inmunosupresoras, la regulación del cambio de isotipo de inmunoglobulinas, la quimiotaxis y la función efectora, normalmente citotoxicidad.

En la siguiente tabla recogemos las localizaciones primarias y las funciones de las citoquinas relacionadas con los implantes. Las citoquinas tienen diversas actividades y están asociadas con una gran variedad de tipos de tejidos (Tabla 1.4.) (68-71).

<b>FACTOR</b>	<b>LOCALIZACIÓN</b>	<b>FUNCIÓN</b>
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	Plaquetas, células endoteliales, macrófagos	Remodelación ósea, cicatrización de la herida
Factor de crecimiento de insulina (IGF-I, IGF-II)	Plasma, hígado, hueso/cartilago	Cicatrización de la herida, formación ósea
Factor de crecimiento transformante $\beta$ (TGF- $\beta$ )	Plaquetas, hueso	Cicatrización de la herida, homeostasis ósea, reacciones inmunes
Proteína ósea morfogenética (BMP)	Hueso	Inducción ósea
Factor de crecimiento del fibroblasto ácido (FGFa) o básico (FGFb)	Cerebro, hueso	Proliferación de células endoteliales, remodelado óseo
Factor de crecimiento transformante $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )	Macrófagos, células epiteliales	Crecimiento y diferenciación celular
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	Glándulas submaxilares, plaquetas	Diferenciación celular, crecimiento epidérmico y queratinización, cicatrización de heridas
Interleuquinas (IL)	Origen hematopoyético	Reacciones inflamatorias e inmunes, regulación ósea, hematopoyesis
Factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha,\beta$ )	Origen hematopoyético	Activación del osteoclasto, reacciones inflamatorias e inmunes
Factores estimuladores de colonias (CSFs)	Origen hematopoyético	Reacciones inmunes, regulación de células procedentes del hueso medular
Interferón (INF- $\gamma$ )	Origen hematopoyético	Reacciones inflamatorias e inmunes
Osteopontina (OPN)	Tejidos mineralizados, linfocito T activados	Resistencia del huésped, homeostasis mineral

Tabla 1.4. Citoquinas: actividades y asociación con tejidos.

## 1.4. Proteínas morfogenéticas humanas (BMPs).

El propósito de un tratamiento dental es ofrecer al paciente el restablecimiento de la forma, estructura y funcionamiento de los tejidos perdidos. La forma ideal o *gold standard* para ello es proveerle del mismo tejido perdido, por ejemplo una estructura ósea nueva, saludable, con las mismas características del tejido original. Esto se denomina regeneración, y se hace gracias a la biología molecular y la bioquímica, que han revolucionado la ingeniería de tejidos. Las tres formas en la que la ingeniería tisular puede actuar con este fin son:

- por medio de la conducción, técnica en la cual se utilizan biomateriales en una forma pasiva, para facilitar el crecimiento de hueso sobre ellos, basándose en la capacidad regenerativa del tejido existente;
- la inducción es la segunda estrategia, en la cual se activan células en la proximidad del defecto, por medio de una señalización biológica específica (está basada, en el caso de regeneración de tejido óseo, en la utilización de las proteínas morfogenéticas humanas);
- el trasplante de células, el cual consiste en tomar células progenitoras del paciente y cultivarlas *in vitro* y cuando ya hay cantidad suficiente reimplantarlas en los tejidos por regenerar. Esto es importante sobre todo, cuando se ha demostrado que las células progenitoras de hueso disminuyen con la edad y para un sitio donante, lo cual es un inconveniente para los injertos de tejido óseo en los pacientes de mayor edad, que con frecuencia son los más necesitados de rehabilitación.

Las tres técnicas tienen en común el uso de materiales con base de polímeros para favorecer el proceso. Específicamente, se ha demostrado que hay relación estrecha

entre la actividad de las proteínas morfogenéticas y la estabilidad que le provee estar unida a una matriz, como ocurre naturalmente en el organismo, unidas por proteoglicanos de la matriz extracelular. Si no hay estabilidad no habrá diferenciación de células mesenquimales, por lo tanto es indispensable un vehículo adecuado para transportarlas y mantenerlas en el sitio por regenerar. Estos acarreadores son útiles también para llevar vectores virales con información sobre proteínas morfogenéticas hasta el defecto, deben ser capaces de mantener una concentración aceptable en el lugar donde se necesitan y por un periodo de tiempo adecuado para la regeneración del nuevo tejido. Además, deben reabsorberse a medida que el nuevo tejido se va formando.

Las proteínas morfogenéticas humanas (BMPs) son un subtipo dentro de las superfamilia de factores de crecimiento transformante -  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Esta superfamilia incluye activadores e inhibidores, BMPs, TGF- $\beta$ , factores de crecimiento y diferenciación (GDFs), sustancia inhibidora mulleriana, *Drosophila dpp* y *Xenopus Vgl*, entre otros (72).

Se conoce su participación en multitud de procesos. Aunque compartan algunas similitudes fundamentales con la familia TGF- $\beta$ , un rasgo distintivo de las BMPs es su alto grado de promiscuidad en la interacción de ligandos con sus receptores y reguladores, los cuales son igualmente compartidos con otros miembros de la familia TGF- $\beta$ . De ahí que el resultado de la transducción de señal de las BMPs dependa en gran medida de las circunstancias espaciotemporales en adición con las propiedades endocrinológicas del individuo (73).

Las BMPs fueron identificadas por primera vez por Urist en 1965, al observar que la matriz ósea desmineralizada implantada en zonas ectópicas en ratas inducía la

formación ósea. De las nueve BMPs recogidas en la literatura, siete de ellas están relacionadas entre sí (de las BMP-2 a la BMP-9).

Al principio de la década de 1960 muchos investigadores estaban estudiando el proceso de calcificación. En esta línea, Urist et al. (74) en una serie de experimentos diseñados para probar su teoría de la calcificación descubrieron que las muestras de control de hueso descalcificado no tratado e implantado en los músculos de conejos y ratas daban como resultado la formación de nuevo cartílago y hueso. Esto se interpretó como que una célula inductora (un histocito) actuaba como una célula inducida (un histocito reparado o una célula joven perivascular del tejido conectivo), causando su diferenciación en una célula osteoprogenitora o condroprogenitora. Así Urist descubrió en 1965 extractos de proteínas provenientes de hueso que podían inducir la formación de cartílago y hueso cuando eran implantados en tejidos no óseos. Llamó osteoinducción al principio fundamental de la regeneración ósea liderada por la acción de las proteínas morfogenéticas. Con el desarrollo de las técnicas de Biología molecular y tecnología del ADN recombinante y genética para investigación, se logró obtener la primera rhBMP (proteína de hueso recombinante) en 1988 (75).

Entre las BMPs, las BMP-2 son las más estudiadas hasta la actualidad como regulador de la inducción de la osteogénesis, en el mantenimiento y reparación ósea. Durante la embriogénesis regulan la formación de patrones, diferenciación de osteoblastos, adipocitos y condrocitos, apoptosis celular, diferenciación de células neurales, interacciones epitelio-mesenquimales durante la organogénesis, influye en la reparación de huesos largos, paladar hendido, fusión de espina bífida, etc. Han sido analizadas en la curación de las fracturas, en defectos óseos y en varios modelos de fusión espinal. Su expresión está correlacionada con la diferenciación de condroblastos u osteoblastos desde células mesenquimales pluripotenciales

sugiriéndonos que es un inductor en la formación de hueso y en la condrogénesis (76,77).

Además de la BMP-2 y dentro de la superfamilia TGF- $\beta$ , existen otras proteínas con capacidad osteoinductiva como BMP-6 y BMP-7. El uso de BMP tanto para investigación como para aplicaciones clínicas necesita de un medio de vehiculización, que suelen ser sustancias con capacidad para componer un andamiaje para la formación de nuevo hueso. Los más utilizados son componentes de colágeno reabsorbible, matriz de fosfato cálcico o matriz resistente a la compresión entre otros.

Las BMP-2 (Tabla 1.5., Figura 1.6.) fueron identificadas inicialmente usando secuencias de aminoácidos provenientes de la purificación de la matriz ósea bovina. Este proceso incluía la remoción de los componentes minerales del hueso mediante la utilización de ácidos y la extracción del componente activo de la matriz orgánica remanente usando agentes caotrópico y pasos de cromatología múltiple en columna. Esta matriz contenía proteínas, las cuales eran clonadas. Se utilizaban técnicas de biología molecular e información de secuencia para obtener homólogos humanos de cada secuencia codificada de BMP. La secuencia de ADN era colocada en un vector con un marcador selectivo. Mediante este proceso se producían células con BMP-2 expresadas. Entonces se purificaba rhBMP-2 de ellas (78,79).



<b>Proteína morfogenética humana 2</b>	
Símbolo oficial	BMP2
Nombre completo oficial	bone morphogenetic protein 2
Fuente primaria	HGNC:1069
Tipo de gen	Codificación de proteína
Organismo	Homo Sapiens
<b>Lineage</b>	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo
También conocida como	BDA2; BMP2A

Tabla 1.5. Características de BMP-2.

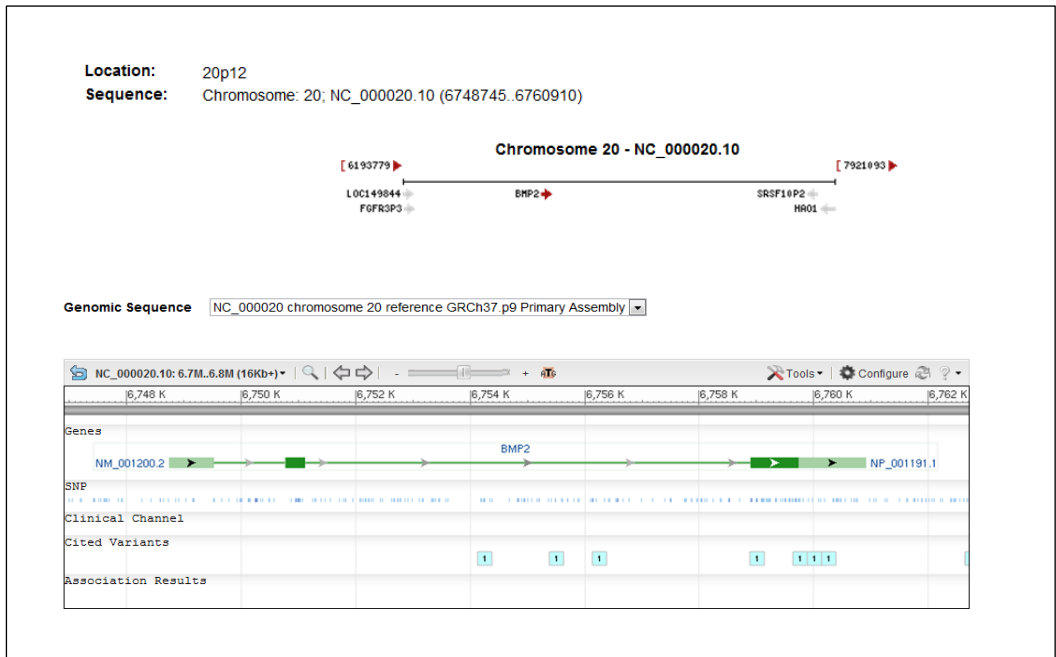


Figura 1.6. Secuencia genómica y localización rhBMP-2

Por primera vez en 1992, Rutherford et al. (80) usaron BMP bovina purificada combinada con matriz ósea colágena con el fin de promover la osteointegración de implantes dentales de una forma más rápida y exitosa. Concluyeron que este tipo de proteínas pueden inducir la formación de hueso (función osteoinductora) durante tres semanas.

Cinco años más tarde Sigurdsson et al. (81) evaluaron la regeneración ósea y la osteointegración inducida por BMP-2 humana recombinante (rhBMP-2) en defectos periimplantarios supraalveolares creados quirúrgicamente en áreas premolares mandibulares de cinco perros de raza Beagle. Los resultados sugerían que existe un gran potencial en rhBMP-2 induciendo la regeneración ósea y osteointegración en defectos quirúrgicos periimplantarios.

En 2001 Sykaras (82) et al. investigaron el uso de rhBMP-2 utilizando también modelo animal, a los cuales se le implantaron cilindros de titanio con cámaras huecas en el extremo apical, la mitad de las cuales fueron llenadas con 20 µg de rhBMP-2 en un vehículo de colágeno bovino, otra mitad fue control. Tras sacrificar a los animales y extraer las muestras se observó que en los sitios confinados alrededor de los cilindros de titanio la rhBMP-2 inducía regeneración ósea en una posición íntima con el implante y la cantidad de hueso formada era tres veces mayor que el lado control.

Jung et al., en 2003 (83) presentaron un estudio clínico prospectivo controlado, randomizado, a doble ciego, con el propósito de estudiar si la adición de rhBMP-2 a sustitutivo óseo mineral bovino puede aumentar el éxito de la regeneración ósea guiada, combinando el efecto osteoinductivo de la BMP-2 con el efecto osteoconductor (guiar el crecimiento de reparación del hueso natural) del biomaterial, cuantificándolo en términos de volumen óseo, densidad y maduración. Para ello se

utilizó 1 ml de rhBMP-2 (0,5 mg/ml) + Bio-Oss® (0,5 g, hueso esponjoso granulado, 0,25-1mm) (Geistilch Ag, Wolhausen, Suiza) en el grupo experimental y 1 ml de ácido trifluoroacético 0,01% + Bio-Oss® (0,5 g, hueso esponjoso granulado, 0,25-1mm) en el grupo control. En todos los parámetros histomorfométricos fue superior la formación de hueso en los lugares en los que el Bio-Oss® fue suplementado con rhBMP-2.

Boyne et al., en 2005 (84), llevaron a cabo un estudio de segunda fase (tras estudio piloto previo en el que se observó la eficacia y seguridad de rhBMP-2, 0,43 mg/ml) para la creación de hueso *de novo* en elevaciones de seno maxilar realizadas mediante abordaje de ventana lateral, con el fin de evaluar la eficacia y seguridad de dos concentraciones diferentes de rhBMP-2 (Wyeth Genetics Institute, Cambridge, MA, EE.UU.) en elevación de seno maxilar, utilizando como vía de aplicación esponja reabsorbible de colágeno. Se eligieron 24 pacientes aleatorizados en dos grupos (ratio 2:1). Los dos grupos experimentales recibieron uno 0,75 mg/ml de rhBMP-2 y el otro 1,5 mg/ml de rhBMP-2. El seguimiento fue de 52 meses. Los métodos para la evaluación de la eficacia fueron la inducción de formación ósea (medido mediante tomografía computerizada), histología (estudio anatomopatológico de las muestras recogidas mediante biopsia), pérdida ósea crestral del hueso adyacente a los implantes (radiografía intraoral). Los métodos para la evaluación de la seguridad fueron el examen oral, radiografía, efectos adversos y respuesta inmune. Concluyeron en que ambas concentraciones son seguras e inducen la misma cantidad y calidad ósea pero que el grupo con mayor cantidad de rhBMP-2 lo hace más rápidamente.

En 2005, Fiorellini et al. (85) nos presentan un estudio similar al publicado por Boyne et al. pero en esta ocasión utilizando los alveolos postextracción como modelo. La eficacia fue estudiada en términos de cantidad de inducción de formación ósea y en la necesidad de un aumento secundario a la hora de colocar el implante. No

se encontraron diferencias en las estructuras nativas óseas, aunque se observa un aumento de predictibilidad y beneficios clínicos para el paciente.

Jung et al. (86), publicaron en 2009 un ensayo clínico controlado y aleatorizado para la evaluación clínica y radiológica de implantes colocados en zonas que han sido tratadas previamente para aumento óseo mediante xenoinjerto y membrana con o sin adición de rhBMP-2 (0,18 mg). La metodología fue examen durante el seguimiento (a los tres y cinco años tras la colocación de la prótesis), cuestionario personal y evaluación clínica.

En esta línea, De Freitas et al. (87) llevaron a cabo una revisión sistemática, publicada en 2013, en la que buscan evaluar la efectividad clínica y la seguridad de rhBMP-2, utilizando como vehiculización esponjas de colágeno reabsorbibles (ACS), para la elevación del seno maxilar y el aumento de reborde óseo. La búsqueda incluyó artículos desde 1980 a 2012, arrojando que la combinación rhBMP-2/ACS parece ser una combinación prometedora en estas técnicas de cirugía bucal.

De estos estudios se recogen la aportación en la regeneración ósea guiada de la adición de rhBMP-2 a biomateriales en distintas técnicas, pero también encontramos recogidos en la literatura estudios como Kao et al. (88), 2012, en el cual hablan por primera vez de las desventajas del uso de rhBMP-2, reconociendo y comprobando en su estudio que hay una mayor formación ósea *de novo*, un uso fácil de utilización quirúrgica y sin límites en cantidad, pero que hay que tener en cuenta su alto coste económico y la falta de rigidez en el mantenimiento del volumen óseo obtenido.

Se han demostrado diversas aplicaciones clínicas para las rhBMP, la mayoría en modelos animales, aún muy pocos en seres humanos. Las proteínas morfogenéticas humanas se han convertido en una probable opción de tratamiento, dada su acción en

regeneración y remodelación de las lesiones óseas, al aumentar la respuesta del hueso alrededor de materiales aloplásticas, y es factible que en un futuro cercano sustituyan los injertos autólogo y alogénico.

---

## **1.5. Técnicas de laboratorio para el estudio de la función osteoblástica.**

### **1.5.1. Cultivos celulares.**

El cultivo celular supone una disgregación celular ya sea por medios enzimáticos o mecánicos. La suspensión celular se puede cultivar como una monocapa adherente o en suspensión en el medio de cultivo. Este tipo de cultivo permite su propagación, aumentando notablemente la masa celular del cultivo a lo largo de las generaciones.

Peck et al. (89) en sus primeros trabajos mostraron la posibilidad de aislar y cultivar células óseas. Desde ese momento se han descrito diferentes técnicas, tales como digestión enzimática con colagenasa, clonación, aislamiento mecánico, y se han aplicado sobre diferentes fuentes tales como calota de fetos de roedores, embriones de pollo, calota y huesos largos de conejo, hueso humano, etc.

En la actualidad podemos obtener células óseas principalmente mediante tres métodos: cultivos de calota fetal, cultivo de hueso humano normal y líneas celulares establecidas procedentes de sarcomas. Cada procedimiento tiene sus ventajas e inconvenientes (mezcla de poblaciones celulares, cambios del funcionamiento celular, potencial de crecimiento variable, etc.).

Nos centraremos en las células utilizadas en el experimento de la presente tesis, los osteoblastos humanos normales, cuyas siglas son NHOST. Los cultivos de osteoblastos humanos obtenidos de explantes óseos son un buen modelo de estudio de

la funcionalidad osteoblástica. Existe una elevada correlación entre la actividad celular que presentan los osteoblastos *in vitro* e *in vivo* (biopsias óseas).

Mills et al. en 1979 (90) fueron los primeros en describir el aislamiento de células humanas derivadas de hueso y posteriormente otros grupos describieron los métodos para el aislamiento de células óseas humanas con fenotipo osteoblástico específico. Robey y Termine en 1985 (91,92), presentaron un método de aislamiento celular basado en un pretratamiento con colagenasa de explantes óseos humanos para eliminar todas las células, menos las situadas de forma adyacente al hueso, con este método se pretendía obtener líneas osteoblásticas más puras.

Las células de un cultivo crecen hasta que alcanzan la fase de confluencia en la cual dejan de dividirse ya sea por inhibición por contacto si el cultivo es en monocapa o por consumo del medio, si es el caso de cultivo en suspensión.

### **1.5.2. Estudio energético celular: cuantificación del potencial de membrana mitocondrial mediante tinción JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine Iodide).**

Las mitocondrias son organelos citoplasmáticos de aspecto filiforme, con un diámetro comprendido entre 0,5 y 1  $\mu\text{m}$ , con funciones que engloban desde el abastecimiento energético (en forma de ATP) a la célula, hasta la regulación citoplasmática de los niveles de ión  $\text{Ca}^{2+}$  o las especies reactivas del oxígeno. Las mitocondrias presentan una estructura con dos compartimentos bien definidos, matriz y espacio intermembrana, delimitados por dos membranas, interna y externa, con características morfológicas y funcionales muy diferentes.

En la matriz mitocondrial tienen lugar diversas rutas metabólicas, por ejemplo la oxidación del ácido pirúvico en el ciclo de Krebs o la beta-oxidación de los ácidos grasos. Del mismo modo, sus membranas ofrecen también diferencias significativas. La membrana interna se caracteriza morfológicamente por presentar unas invaginaciones (crestas), con multitud de complejos enzimáticos (los componentes de la cadena transportadora de electrones, la ATP sintetasa) y proteínas que regulan el paso de metabolitos, como el traslocador de nucleótidos de adenina. La membrana mitocondrial interna resulta especialmente impermeable a iones gracias a su alto contenido en el fosfolípido cardiolipina, característica esencial que le permite soportar un gradiente electroquímico necesario para el desempeño de la función energética. Por el contrario, la membrana externa carece de crestas mitocondriales y, en condiciones fisiológicas, es permeable al paso de iones y de metabolitos con pesos moleculares



inferiores a 6.000 Da debido a la presencia de la proteína porina, conocida en la actualidad como canal aniónico dependiente de voltaje.

Eugene Kennedy y Albert Lehninger descubren en 1948 que la mitocondria en las células eucariotas es el lugar donde se realiza la fosforilación oxidativa, lo que marca el inicio de la fase moderna de los estudios sobre las transducciones de energía biológica. En las mitocondrias se desarrollan distintas reacciones bioquímicas catabólicas que liberan importantes cantidades de energía, la cual se almacena en forma de ATP y es usada para mantener la actividad celular. En los organismos aeróbicos más del 90% del ATP proviene de las mitocondrias, el resto se forma en la glicólisis anaeróbica. El ATP es una molécula relativamente simple, formada por una ribosa, una adenina y tres fosfatos. La unión entre los fosfatos se conoce como unión pirofosfato. Cuando el ATP se hidroliza a ADP y fosfato, se liberan aproximadamente 7.500 calorías por mol (93,94).

La energía que se obtiene a través de la transferencia de electrones a lo largo de la cadena transportadora es usada para bombear protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, creando un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna ( $\Delta\Psi_m$ : potencial de membrana mitocondrial). Este gradiente de protones permite a la ATPsintasa utilizar el flujo de  $H^+$  generados para producir ATP partir de adenosina difosfato (ADP) y fosfato inorgánico. De esta manera, la membrana mitocondrial interna separa dos compartimientos de diferente concentración de  $H^+$ , lo que produce diferencias en la concentración química ( $\Delta pH$ ) y en la distribución de la carga ( $\Delta\Psi_m$ ) a través de la membrana. El resultado neto es la fuerza protón motriz ( $\Delta G$ ) (93).

Durante décadas el potencial de membrana mitocondrial se ha estimado mediante pruebas de microscopía y citometría fluorescente, proporcionando indicadores del estado funcional celular (95,96).

La tinción fluorescente mediante JC-1 (Tabla 1.6.) permite estimar el potencial de membrana mitocondrial, excitándose con una única longitud de onda (480 nm) y emitiendo fluorescencia a dos longitudes de onda diferentes (595 nm y 529 nm).

<b>Información sobre producto</b> (© Merck KGaA, Darmstadt, Alemania, customer.service(at)merckgroup.com, 2014)	
Forma	Sólido rojo-anaranjado
Masa molar	652.2 g/mol
Protección de la luz	Sí
Empaquetado bajo gas inerte	Sí
Pureza	≥95% by HPLC
Solubilidad en agua	DMF o DMSO
Fórmula química	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> Cl <sub>4</sub> N <sub>4</sub>
Categoría de Almacenamiento	-20°C

Tabla 1.6. Información sobre producto (JC-1) de fabricante.

La tinción JC-1 forma J-agregados espectrométricamente distinguibles de los monómeros de tinción a altas concentraciones alcanzadas en mitocondrias celulares energéticas de células expuestas a este tipo de tinción. Dichos monómeros atraviesan la membrana interna mitocondrial hacia la matriz en función del potencial de membrana. En condiciones normales, el colorante se acumula en la matriz mitocondrial formando J-agregados (Figura 1.7.) que emiten a 590 nm (rojo). En cambio si el potencial de membrana disminuye el colorante fluorescente permanece

disperso en el citoplasma, emitiendo fluorescencia a 529 nm (verde). Esta ratio de fluorescencia “verde” a “rojo”, emisión de fluorescencia 595/520 nm, nos indica el grado de polarización de las mitocondrias en un cultivo celular, indicando una depolarización mitocondrial mediante la reducción de la ratio verde/rojo de intensidad fluorescente.

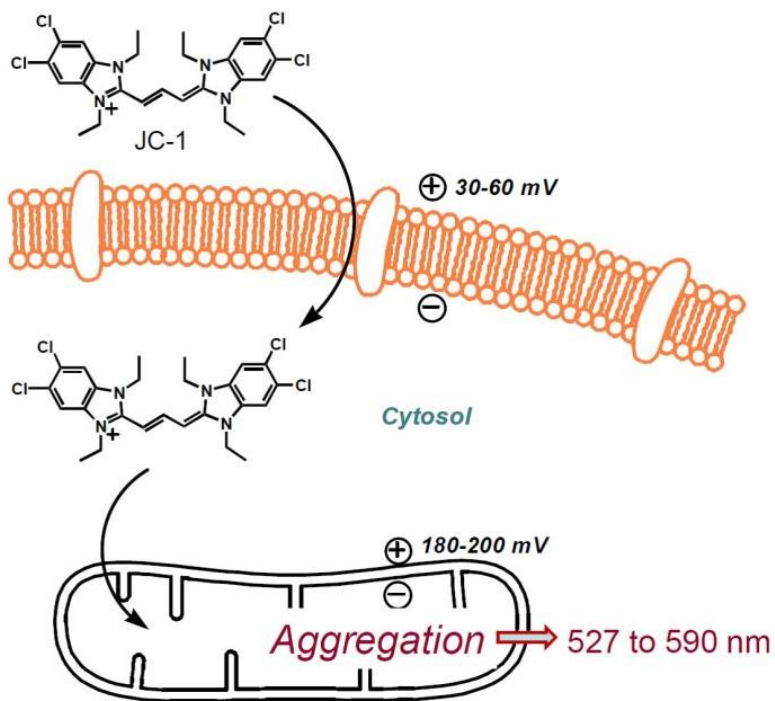


Figura .1.7. Formación de J-agregados de colorante se acumulado en la matriz mitocondrial.

### 1.5.3. Estudio de apoptosis: tinción fluorescente de núcleos celulares mediante DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).

La apoptosis o muerte celular programada es un término funcional que se usa para definir la muerte celular como parte normal de la vida de los organismos multicelulares. La apoptosis es una forma de muerte celular cuyo objetivo es el de eliminar las células del huésped que ya no son necesarias a través de la activación de una serie coordinada y programada de acontecimientos internos.

El proceso de apoptosis puede darse en diferentes contextos: en el desarrollo embrionario, mecanismo homeostático para el mantenimiento de las poblaciones celulares en los tejidos, en las reacciones inmunitarias, cuando las células presentan alteraciones importantes, durante el proceso de envejecimiento, etc.

Desde la década de 1970 se ha utilizado la tinción DAPI (Tabla 1.7.) en estudios de histología, citología analítica y bioquímica. El diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) es un colorante fluorescente que pertenece al grupo de los colorantes de indol. DAPI se usa para la tinción de ADN, para tinción nuclear, para la tinción de células vivas y para la contratinción en tinciones inmunofluorescentes de material humano y botánico, y en citometría de flujo (97,98).

<b>Información sobre producto</b> (© Merck KGaA, Darmstadt, Alemania, customer.service(at)merckgroup.com, 2014)	
Masa molar	350.25 g/mol
Protección de la luz	Sí
Fórmula química	$C_{16}H_{15}N_5 \cdot 2HCl$
Categoría de Almacenamiento	+5°C a +30°C.

Tabla 1.7. Información sobre producto (DAPI) de fabricante.

El espectro de absorción para DAPI tiene tres máximos (222, 259, 340 nm), pero tan solo la longitud de onda 340 nm es importante para los estudios citofluorométricos. DAPI (Figura 1.8.) por sí mismo no es ópticamente activo, pero el complejo formado con los ácidos nucleicos inducen un efecto *Cotton* positivo extrínseco que puede ser captado. Este efecto puede ser observado como un espectro circular discrómico, con un pico máximo emisión de 330 nm de ambos complejos fluorescente y no-fluorescente de la tinción de los ácidos nucleicos. La posición del máximo de longitud de onda de este espectro circular discrómico depende de la composición del ácido nucleico y de la ratio tinción/ácido nucleico.

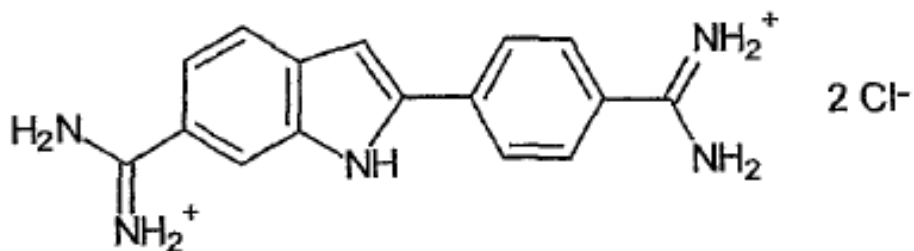


Figura 1.8. DAPI. Fórmula química.

### **1.5.4 Estudio de movilidad y adhesión: tinción con anticuerpos específicos anti actina humana marcados con rodamina-faloidina (*Rhodamina-Phalloidina*).**

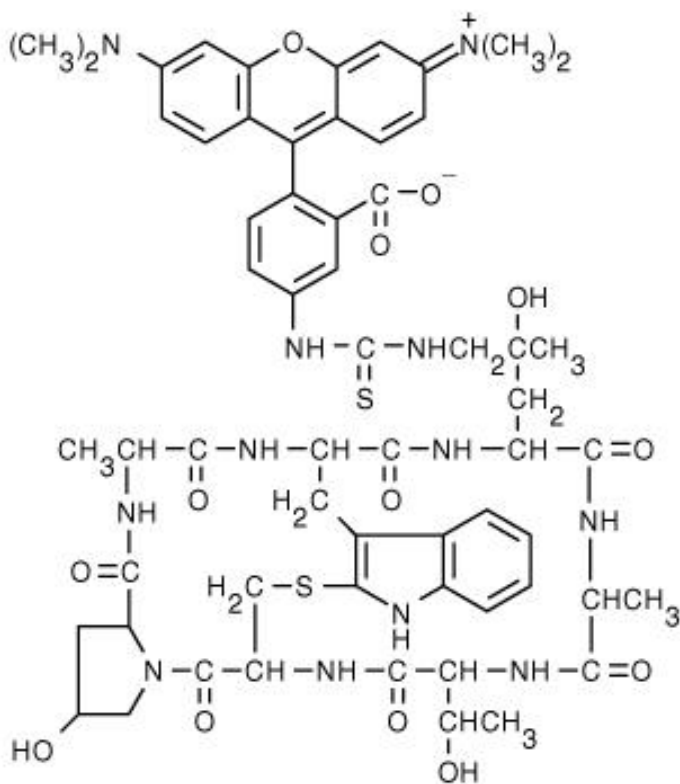
Como hemos expuesto anteriormente en esta introducción, el citoesqueleto de actina es una red dinámica de polímeros de actina y gran variedad de proteínas asociadas. Sus principales funciones fisiológicas están relacionadas con la motilidad celular, los cambios de forma de la célula durante el ciclo celular y el mantenimiento de la forma y superficie celular.

La tinción con rodamina-faloidina (Tabla 1.8.) es una prueba de alta afinidad por la F-actina en conjunción con tinción rojo-anaranjada fluorescente, tetrametilrodamina (TRITC).

La faloidina es un péptido bicíclico (Figura 1.9.) perteneciente a la familia de las toxinas aisladas del hongo *Amanita Phalloides*. Su uso más común es en tinción selectiva de F-actina de diferentes especies ya sean animales o plantas. La faloidina otorga una alta selectividad por la F-actina mientras que TRITC proporciona la fluorescencia rojo-anaranjada del brillo disparalelo y la fotoestabilidad. La tinción con rodamina-faloidina permite una tinción de alto- contraste y discriminación ante actina, además de ser uno de los conjugados más utilizados en la literatura, con más de 1500 citaciones en la evidencia actual.

Puede ser utilizado para visualizar y cuantificar F-actina en secciones de tejido, cultivos celulares o preparaciones de células libres. Es compatible con otro tipo de tinciones fluorescentes usadas en el análisis fluorescente de proteínas (99).

Información sobre producto (© 2014 Thermo Fisher Scientific Inc.)	
Protección de la luz	Sí
Fórmula química	-
Categoría de Almacenamiento	-5 to -30°C

Tabla 1.8. Información sobre producto (*Rhodamine-Phalloidin*) de fabricante.Figura 1.9. *Rhodamine-Phalloidin*. Fórmula química.

### **1.5.5. Estudio de productividad ósea: marcador de anticuerpo específico anti proteína BMP-2 humana.**

La BMP-2 se sintetiza como un precursor de 396 aminoácidos que consta de un péptido señal, un dominio y la secuencia correspondiente a la proteína madura, que se encuentra en el extremo c-terminal del precursor. En el proceso de maduración, el precursor sufre diferentes modificaciones post-traduccionales (glicosilaciones, proteólisis y dimerización) hasta alcanzar finalmente la estructura homodimérica activa que es secretada fuera de la célula. En la figura 1.10. podemos ver un esquema de la producción y maduración de BMP-2 en un sistema de expresión de célula eucariota. En primer lugar, el precursor sintetizado (pre-pro-BMP-2) es digerido perdiendo el péptido señal y en una etapa posterior se produce la dimerización de los monómeros de pro-BMP-2. Ambas modificaciones se producen en el retículo endoplasmático. El dímero de pro-BMP-2 es transportado al aparato de Golgi donde, de nuevo, es digerido obteniéndose la proteína dimérica BMP-2 madura. Finalmente el dímero maduro se secreta al medio extracelular (Figura 1.10.) (100-101). De los cuatro sitios N-glicosilados presente en el precursor, sólo se mantiene uno en la cadena polipeptídica de la BMP-2 madura, no obstante, para que la proteína presente actividad no precisa de esta glicosilación.



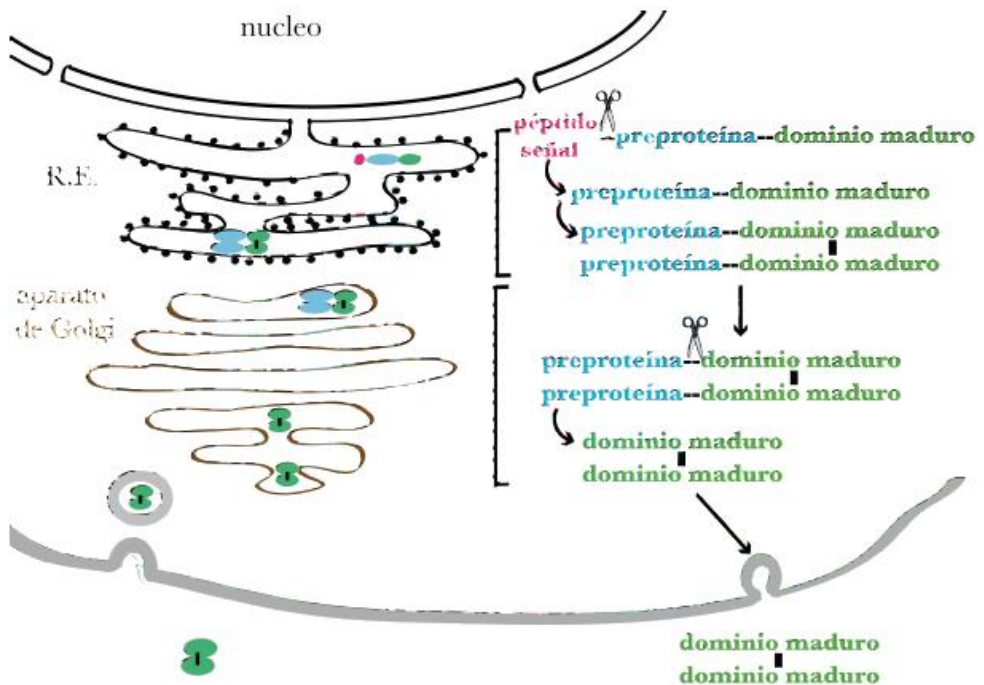


Figura 1.10. Esquema de producción y maduración de BMP-2.

Las tinciones con anticuerpos específicos frente a las proteínas de interés pueden realizarse con anticuerpos marcados directamente con fluoróforos, con anticuerpos no marcados que son revelados de manera específica con anticuerpos secundarios acoplados a un fluoróforo y con anticuerpos biotinilados que son marcados utilizando estreptavidina acoplada a fluoróforos (102).

En condiciones normales las tinciones se realizan incubando entre  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  células con la concentración adecuada de cada anticuerpo en un volumen de 50-100  $\mu$ l durante 20-30 minutos a  $4^\circ\text{C}$  y en oscuridad. Tras el marcaje las células se lavan, eliminando el excedente de anticuerpo no unido.

Cuando todos los anticuerpos utilizados en la tinción están acoplados de forma directa a un fluorocromo, las células se incuban con todos los anticuerpos simultáneamente. Cuando se utiliza un anticuerpo no marcado, éste se incuba en primer lugar de forma independiente. Tras el lavado del anticuerpo no unido, se revela utilizando anticuerpos secundarios marcados con un fluorocromo dirigido contra el anticuerpo específico no marcado. El siguiente paso, imprescindible, es bloquear los sitios libres del anticuerpo secundario unido a la célula incubando con suero preinmune o anticuerpo purificado no marcado de la misma especie que el anticuerpo primario no marcado. Este paso se realiza para evitar el reconocimiento inespecífico de los anticuerpos directos que van a ser añadidos posteriormente.

### **1.5.6. Microscopía confocal de discos con cultivos celulares.**

La microscopía de fluorescencia fue descubierta por Köhler y Siedentopf en 1908 (103). Se basa en que una sustancia natural en las células o un colorante fluorescente aplicado al corte es estimulado por un haz de luz, emitiendo parte de la energía absorbida como haces luminosos.

La luminiscencia es el fenómeno mediante el cual los electrones que se encuentran en un estado excitado se desactivan emitiendo luz. Dependiendo de la naturaleza del estado excitado podemos hablar de fluorescencia o fosforescencia. La fluorescencia es la emisión de luz desde un estado excitado hasta el estado fundamental en el que la relajación se produce sin cambio de multiplicidad del electrón; mientras que, en la fosforescencia sí implica un cambio en la multiplicidad del electrón. La lentitud del proceso hace que otros fenómenos de desactivación compitan con la fosforescencia y por ello no se suele observar (104).

La microscopía confocal es una tecnología que permite observaciones a una resolución mayor que la que se puede lograr con la microscopía óptica convencional. En ella se emplea un sistema láser que aplica el haz de luz en forma de barrido, en una pequeña parte del espécimen. El láser aplicado a una longitud de onda determinada en la muestra, hace que moléculas excitadas de la misma, emitan fluorescencia a una longitud de onda mayor a la aplicada. La fluorescencia en una muestra puede ser debida a moléculas que se encuentran de forma natural (autofluorescencia como en el caso de la clorofila, aunque son escasas) o puede ser producida por moléculas aplicadas artificialmente a la muestra llamadas fluorocromos (fluorescencia agregada, como en la detección de antígenos o anticuerpos) (105,106).

Hay una gran cantidad de fluorocromos específicos usados para diferentes estructuras celulares y para diferente emisión de fluorescencia. El uso de varias combinaciones de láser capaces de detectar y producir fluorescencia a diferentes longitudes de onda, permite un escaneo de la muestra en un amplio rango del espectro de luz, permitiendo la observación de estructuras teñidas con tal detalle cómo no se puede lograr con técnicas convencionales. Debido a que penetra fácilmente la muestra, el microscopio confocal logra imágenes en diferentes planos focales que ligados a un programa de procesamiento de la imagen, puede reproducir una imagen tridimensional del material observado. La microscopía confocal presenta una serie de ventajas por lo que su uso en investigación biomédica se ha extendido en los últimos años, como son:

1. Alta sensibilidad en la observación.
2. Especificidad en la emisión de la fluorescencia.
3. Mayor Resolución.
4. Tridimensionalidad de las imágenes.

Los fluoróforos son moléculas o partes de moléculas que emiten fluorescencia después de ser excitadas con luz. Cuando un fotón excita a un fluoróforo, sus niveles de energía electrónica y vibracional se elevan. Cuando el fluoróforo se relaja a su estado cero, el fluoróforo libera energía en forma de un fotón. La energía se pierde durante el proceso, así el fotón emitido por el fluoróforo es de menor energía (por ejemplo, mayor longitud de onda) que es absorbida (conocido como *cambio Stokes* o *ley de Stokes*). La intensidad y longitud de onda de la luz emitida dependerá tanto del fluoróforo como de su ambiente químico.

Existen varios fluoróforos comercialmente disponibles para obtener imágenes microscópicas, los cuales difieren en sus características de excitación y emisión. Los fluoróforos se pueden describir también en términos de eficiencia del proceso fluorescente por ejemplo su rendimiento cuántico (el cociente del número de fotones emitidos entre el número de fotones absorbidos) y su tiempo de vida fluorescente (el tiempo que la molécula se mantiene en su estado de excitación antes de emitir un fotón). Los fluoróforos pueden ser dirigidos hacia estructuras específicas para la obtención de imágenes por transfección, por inmuno-objetivos, o por interacción de grupos químicos específicos con grupos objetivos en el espécimen (por ejemplo, el DAPI se une al ADN, y el grupo de isotiociano en fluorescencia isotiociano se une a los grupos amino en las proteínas).

El microscopio confocal está compuesto principalmente de las siguientes partes (Figura 1.11.) (107-109):

- Fuente luminosa (lámpara de mercurio o halógena): debe emitir la mayor cantidad de luz ultravioleta en el límite del espectro visible, que atraviesan el material de la preparación de la misma forma en que lo hace un microscopio óptico común.
- Objetivos: suelen ser de cuarzo ya que el vidrio absorbe la radiación ultravioleta.
- Filtros: retienen la radiación ultra-violeta, peligrosa para el ojo humano, dejando pasar solamente la radiación visible, que no es peligrosa. Existen un gran número de juegos de filtros de excitación y de emisión para los diferentes fluorocromos:

- El de excitación: ubicado entre la fuente de luz y el preparado. Permite el paso de luz con longitud de onda en el rango azul con el fin que el preparado sea alcanzado exclusivamente por la luz azul y produzca emisión de luz fluorescente.
- El de barrera: ubicado antes del ocular para prevenir daños retinianos que podrían ser causados por rayos ultravioleta que escapan el espejo dicroico. Corta completamente la luz de excitación no deseada, es decir, selecciona la longitud de onda de emisión del fluorocromo.
- Espejo Dicroico: permite la separación de la luz de excitación y la fluorescencia.



Figura 1.11. Microscopio confocal.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## 2. Hipótesis y objetivos

En el estudio de la implantología oral se insiste en la importancia de la consecución de superficies de implantes que interaccionen de una forma óptima con los tejidos tanto blandos como duros, con especial importancia estos últimos. De este modo sigue siendo uno de los criterios indiscutibles de éxito en la terapia con implantes dentales conseguir la máxima osteointegración de los mismos. Este estudio se basa en la necesidad de conocer el comportamiento de los osteoblastos, como principal tipo celular implicado en la osteointegración, respecto a tales superficies utilizadas en implantología dental.

1. **Objetivo general:** analizar el comportamiento de osteoblastos sobre superficies de titanio rugosa, tratada mediante doble ataque ácido (Osseotite®, Biomet 3i, Palm Beach Garden, Florida, EE.UU.) vs. superficie de titanio lisa (maquinada).
  
2. **Objetivos específicos:**
  - 2.1. Estudiar el grado de apoptosis de osteoblastos cultivados sobre superficies de titanio rugosa, tratada mediante doble ataque ácido (Osseotite®, Biomet 3i, Palm Beach Garden, Florida, EE.UU.) vs. superficie de titanio lisa (maquinada).
  
  - 2.2. Estudiar la longitud axial del citoesqueleto de osteoblastos cultivados sobre superficies de titanio rugosa, tratada mediante doble ataque ácido



(Osseotite®, Biomet 3i, Palm Beach Garden, Florida, EE.UU.) vs. superficie de titanio lisa (maquinada).

2.3. Estudiar el balance energético celular de osteoblastos cultivados sobre superficies de titanio rugosa, tratada mediante doble ataque ácido (Osseotite®, Biomet 3i, Palm Beach Garden, Florida, EE.UU.) vs. superficie de titanio lisa (maquinada).

2.4. Estudiar la producción de BMP-2 por parte de osteoblastos cultivados sobre superficies de titanio rugosa, tratada mediante doble ataque ácido (Osseotite®, Biomet 3i, Palm Beach Garden, Florida, EE.UU.) vs. superficie de titanio lisa (maquinada).

# **MATERIAL Y MÉTODO**

### 3. Material y método.

#### 3.1 Material.

Para el estudio del rendimiento global de células formadoras de hueso (osteoblastos) en distintas superficies utilizadas en implantología hemos utilizado varios tipos de discos de titanio con superficie lisa o maquinada (Figura 3.1.) y varios discos de titanio con superficie tratada mediante doble grabado con ácido nítrico y fluorhídrico (*dual acid etched, DAE*, Osseotite®, Biomet 3i, Palm Beach Garden, Florida, EE.UU.) (Figura 3.2.). Ambos tipos de discos fueron suministrados por Biomet 3i (Palm Beach Garden, Florida, EE.UU.). Así mismo hemos utilizado placas Petri de metacrilato de 25 mm como control en el experimento.

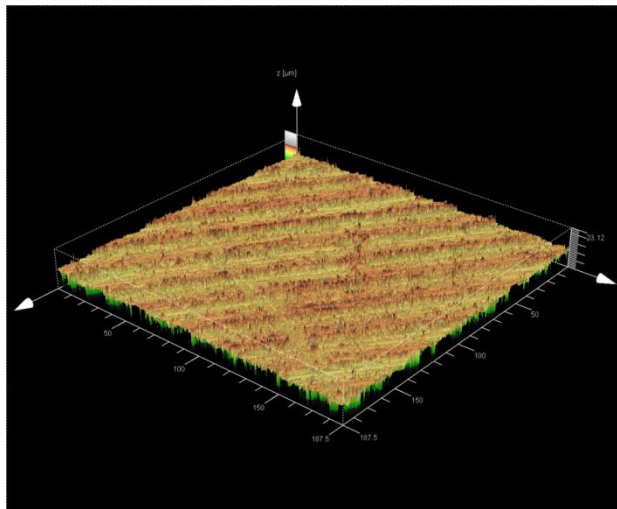


Figura 3.1. Mapa 3D realizados con microscopio confocal en modo reflexión sobre discos con superficie maquinada.

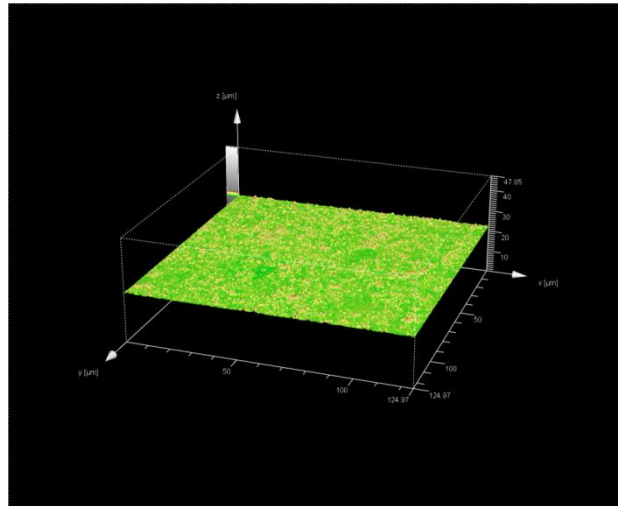


Figura 3.2. Mapa 3D realizados con microscopio confocal en modo reflexión sobre discos con superficie Osseotite®.

De forma preliminar se llevó a cabo visualización de discos de titanio con superficie maquinada (Biomet 3i, Palm Beach Garden, Florida, EE.UU.) observando las líneas de maquinado concéntricas a 1000x, 5000x y 10000x. (Figura 3.3. – 3.5.). La visualización de los discos se llevó a cabo en el Centro de Investigación Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (C.I.T.I.U.S.). Para la caracterización estructural y microestructural de los discos de titanio se ha utilizado microscopía electrónica de barrido.

Se han visualizado los discos de titanio maquinado y con superficie tratada sin cultivo de células mediante microscopio electrónico de barrido Philips XL30-II (*Amsterdam, The Netherlands*) en alto vacío, sin necesidad de *sputtering*. Midiendo en el caso de los discos maquinados la distancia entre líneas de maquinado y en el caso de las superficies tratadas el tamaño del poro de la superficie en algunos puntos.

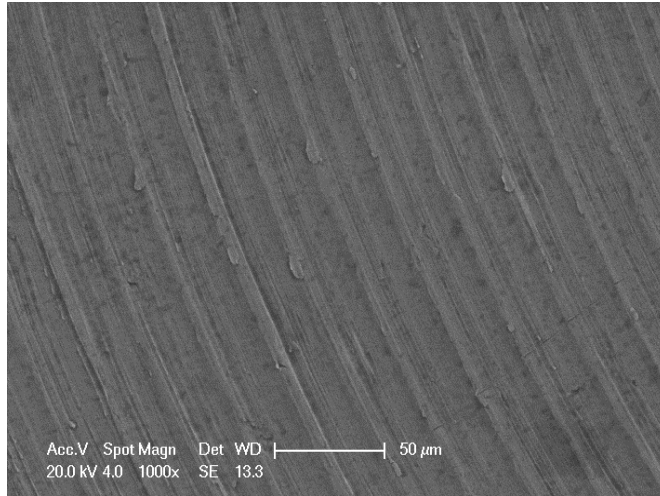


Figura 3.3. Imagen SEM (1000x) de superficie de titanio maquinada.

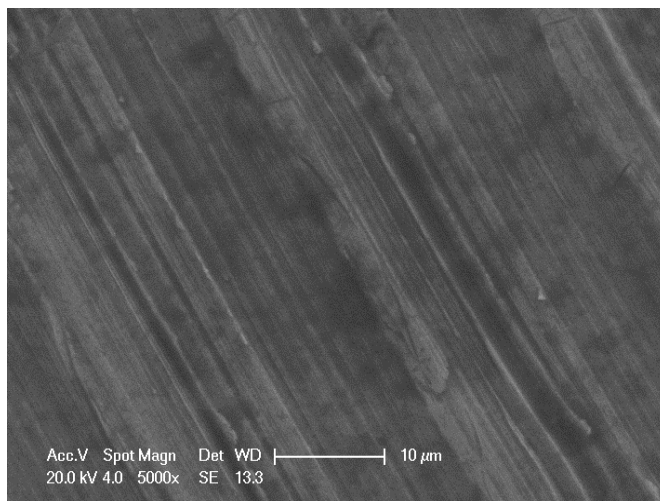


Figura 3.4. Imagen SEM (5000x) de superficie de titanio maquinada.

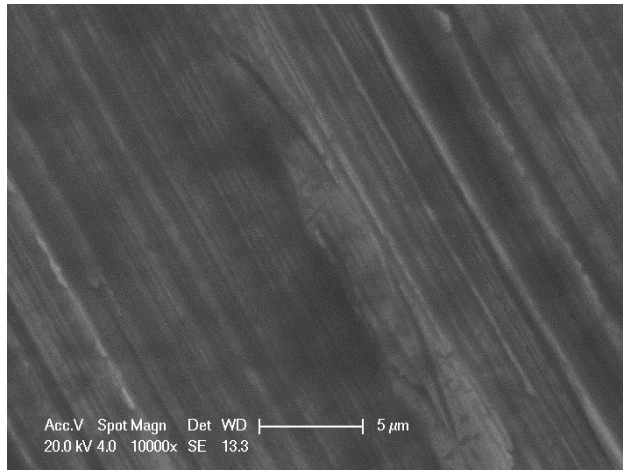


Figura 3.5. Imagen SEM (1000x) de superficie de titanio maquinada.

Se llevaron a cabo mediciones orientativas entre líneas de maquinado a fin de caracterizar más en profundidad la microestructura superficial del disco (Figura 3.6).

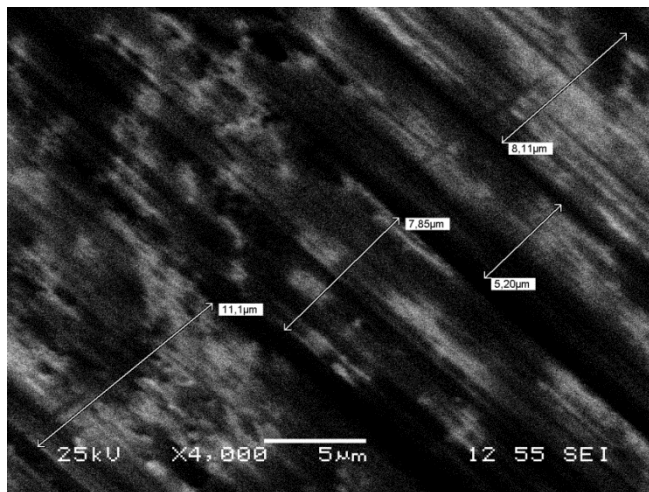


Figura 3.6. Imagen SEM (4000x) de superficie de titanio maquinada.

En el caso de los discos de titanio con superficie tratada mediante doble grabado con ácido nítrico y fluorhídrico (*dual acid etch, DAE*), Osseotite® (Biomet 3i, Palm Beach Garden, Florida, EE.UU.) se llevó a cabo la visualización a 1000x, 10000x y 20000x, con idea de observar el poro de superficie con mayor detalle (Figura 3.7. – 3.9.)

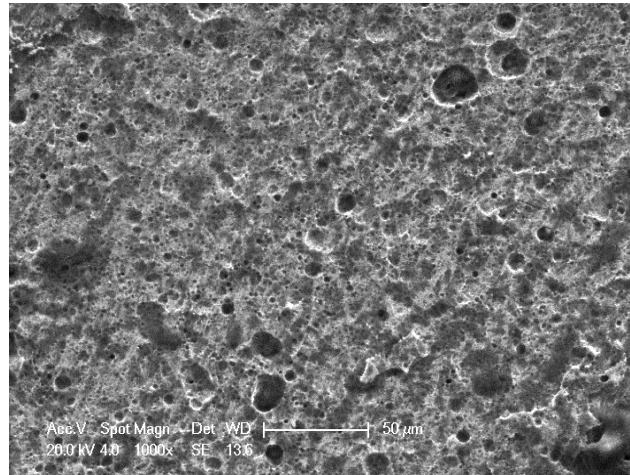


Figura 3.7. Imagen SEM (1000x) de superficie de titanio rugosa (Osseotite®).

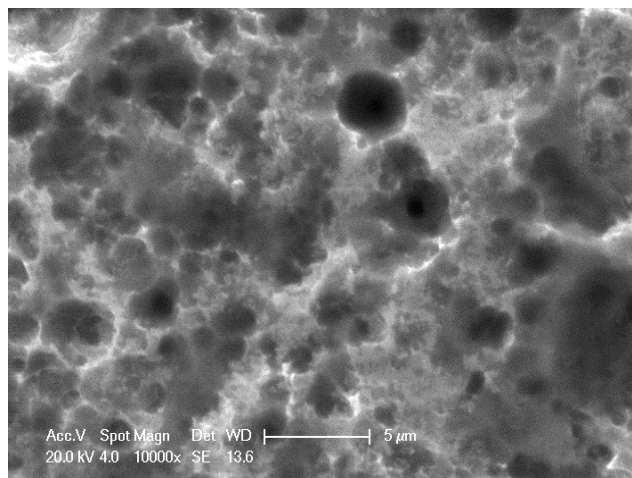


Figura 3.8. Imagen SEM (10000x) de superficie de titanio rugosa (Osseotite®).

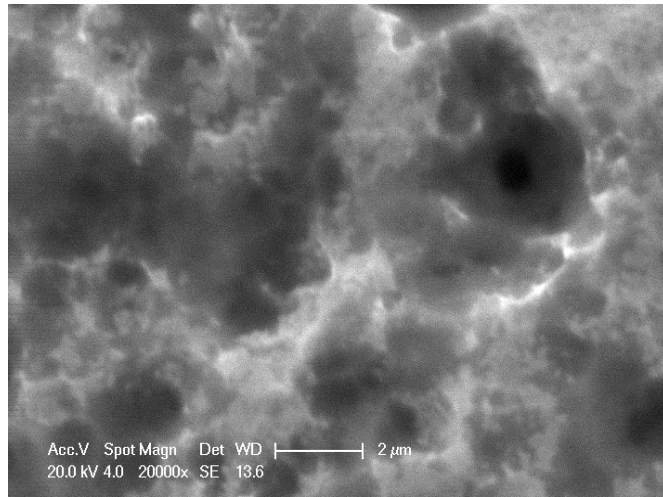


Figura 3.9. Imagen SEM (20000x) de superficie de titanio rugosa (Osseotite®).

Se llevaron a cabo mediciones orientativas del tamaño del poro a fin de caracterizar en más profundidad la microestructura superficial del disco (Figura 3.10.).

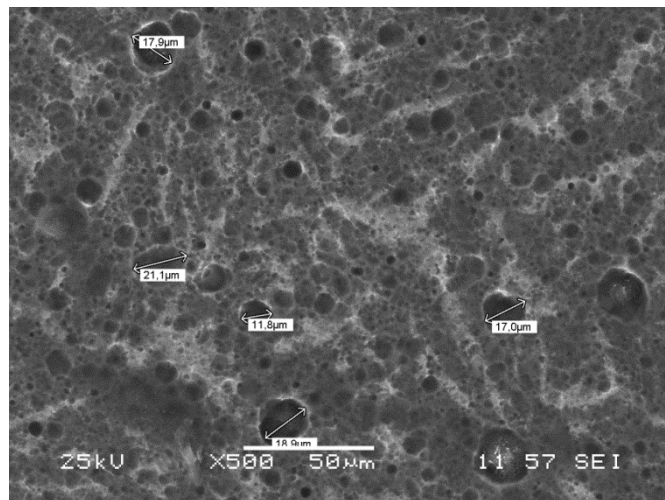


Figura 3.10. Imagen SEM (5000x) de superficie de titanio rugosa (Osseotite®).



Tanto en las placas como en los discos se sembraron células óseas humanas de fémur, *NHOst*, proporcionados por el laboratorio farmacéutico Lonza Biologics (O Porriño, Pontevedra, España) distribuido por Cultek SLU (Cerdanyola del Vallès, Barcelona, España). Así mismo hemos utilizado, en el laboratorio de cultivos celulares del Centro de Investigación Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (C.I.T.I.U.S.), una cabina de flujo laminar Modelo LHC-4A (Esco Micro Pte. Ltd, Singapur) de forma tridimensional, con una única cara libre que es la frontal de acceso. Este espacio está libre de partículas y bacterias hasta 0,1  $\mu\text{m}$  que pueden llegar a contaminar la zona de trabajo. La cabina de flujo laminar está compuesta por una cabina y un ventilador que permite el paso del aire ambiente por medio de un filtro que tiene como función proporcionar aire limpio al área de trabajo de manera uniforme creando alta presión.

Para el cultivo celular hemos utilizado un medio de cultivo (Figura 3.11.) compuesto por medio cultivo base (exclusivo para osteoblastos) DMEM (L-glutamina / piruvato de sodio) 500 ml (4,5 g/l) (PAA Cell Culture Company, BioPath Stores, Cambridge, Reino Unido), L – glutamina (5 ml), suero fetal bovino (FBS) (50 ml) (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, EE.UU.) antifúngico y antibiótico (penicilina, anfotericina B, estreptomicina) (5ml).



Figura 3.11. Medio de cultivo.

Para la separación gravimétrica de células y componentes celulares hemos utilizado la centrífuga refrigerada Sigma (SciQuip Ltd, Newtown, Wem, Shropshire, Reino Unido) modelo 3K-30 (Figura 3.12.) para tubos Falcon de 15 ml, que tiene 15.000 r.p.m. como máximo, y un cabezal angular para alojar diez tubos Falcon de 15 ml.



Figura 3.12. Centrífuga refrigerada.

Los tubos Falcon han sido proporcionados por el laboratorio Inilab S.L. (Madrid, España). Son tubos de fondo cónico, en polipropileno transparente, indicados para pruebas con centrifugación en laboratorios de inmunología, microbiología, etc.



Figura 3.13 Tubos Falcon.

Para mantener y hacer crecer cultivos celulares se ha utilizado una estufa biológica o incubadora (Sanyo Electric Biomedical Co., Osaka, Japón). La incubadora mantiene la temperatura, la humedad y otras condiciones en grado óptimo, tales como el contenido de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y de oxígeno en su atmósfera interior. Las incubadoras son esenciales para una gran cantidad de trabajos experimentales en biología celular, microbiología y biología molecular y se utilizan para cultivos celulares, tanto bacterianos como de células eucariotas. Las células fueron introducidas utilizando botellas de cultivo proporcionados por el laboratorio Inilab S.L. (Madrid, España), diseñadas y tratadas para promover la adherencia y crecimiento celular (Figura 3.14)

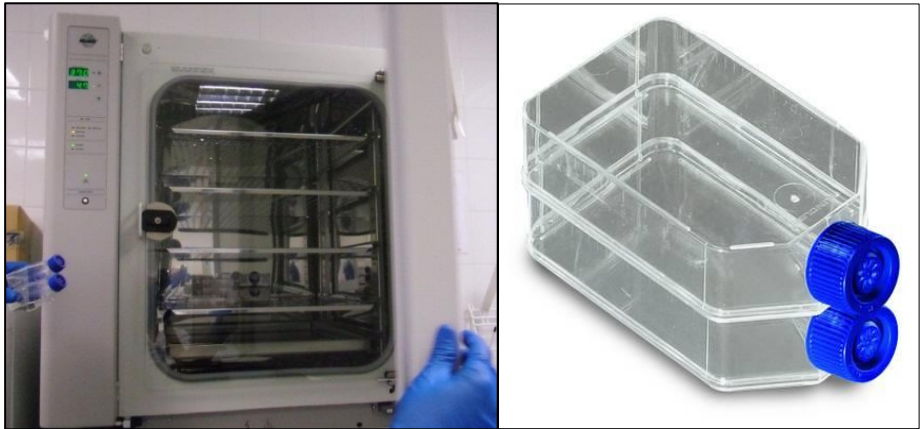


Figura 3.14. Estufa biológica, botellas de cultivo.

Por otro lado, también ha sido necesario el uso de cámara de Neubauer (Celeromics, Grenoble, Francia) (Figura 3.15.). Este dispositivo es utilizado en biología para el recuento de células en un medio líquido, que puede ser un cultivo celular, sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, etc. o como el caso del presente estudio medio de cultivo líquido. Esta cámara de conteo está adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos que tiene dos zonas ligeramente deprimidas y que en el fondo de las cuales se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula.



Figura 3.15. Cámara de Neubauer.

Para la visualización de las muestras se han utilizado una serie de microscopios incluidos en el Servicio de Microscopía del Centro de Investigación Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (C.I.T.I.U.S.):

- Microscopio óptico Olympus CKX41 (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokio, Japón).
- Microscopio óptico de fluorescencia Olympus BX61® (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokio, Japón) y cámara Axio Scope® (Carl Zeiss®, OPM, Pico Dental, Alemania).
- Microscopio confocal (Carl Zeiss®, OPM, Pico Dental, Alemania).
- Microscopio confocal espectral de barrido láser LEICA TCS-SP2 (Leica microsystems, Wetzlar, Alemania).
- Software Leica Lite (Leica microsystems, Wetzlar, Alemania).

### **3.2. Método.**

Hemos llevado a cabo un estudio *in vitro* con células óseas humanas de fémur (NHOst) sobre dos tipos diferentes de superficies de titanio.

Para ello hemos distribuido la muestra entre tres grupos de estudio:

1. Grupo Control: Osteoblastos de humanos normales (NHOst) cultivados en placa Petri de metacrilato de 25mm.
2. Grupo Maquinado: NHOst cultivados en discos de titanio con superficie maquinada (Biomet 3i, Palm Beach Garden, Florida, EE.UU.).
3. Grupo Osseotite: NHOst cultivados en discos de titanio con superficie tratada mediante doble grabado con ácido nítrico y fluorhídrico (*dual acid etch, DAE*), Osseotite® (Biomet 3i, Palm Beach Garden, Florida, EE.UU.).

Para analizar y comparar la función osteoblástica se cultivaron células osteoblásticas humanas normales (NHOst), las cuales fueron utilizadas para llevar a cabo los siguientes experimentos:

### 3.2.1. Cultivos celulares. Cultivo de osteoblastos humanos normales (NHOST).

En un primer momento hemos llevado el cultivo de osteoblastos de humanos normales (NHOST) conservados en nitrógeno líquido (Figura 3.16.) siguiendo el siguiente protocolo:



Figura 3.16. Contenedor de nitrógeno líquido

Se ha procedido al descongelado del vial de células en cabina de flujo laminar. Para ello hay que tener en cuenta unas consideraciones previas importantes: la campana debe estar limpia y desinfectada, se debe irradiar con luz UV durante 15 minutos con el objetivo de esterilizarla y debemos tener muy presente que todo lo que entre y salga de la campana durante el experimento, debe estar desinfectado con alcohol al 70%. Las células se encuentran originalmente a  $-196^{\circ}\text{C}$  dentro de un tanque de  $\text{N}_2$  líquido. Una vez fuera del tanque de  $\text{N}_2$ , los criotubos se introducen rápidamente

en un contenedor de agua a 37° C hasta que las células se descongelen. Posteriormente, en un tubo Falcon de 15 ml, se agregan las células ya descongeladas junto con 10 ml de medio de cultivo (Figura 3.5.). Posteriormente se centrifuga a 300 rpm durante 10 minutos para eliminar el glicerol anticongelante, el sobrenadante se descarta. Se deja en reposo en estufa biológica durante 48h a condiciones fisiológicas de cultivo (temperatura 37°C, 95% humedad, y 5% CO<sub>2</sub>), con medio de cultivo organismo genéticamente modificado (OGM) atemperado enriquecido con 10% suero fetal bovino (FBS), y suplementado con glicina y antibióticos (estreptomicina y penicilina).

Utilizamos una pipeta de 2 ml para introducir las células en una botella de cultivo. Una vez introducidas (0,5 ml) con densidad aproximada de 500.000 células/ml, añadimos gota a gota el sustrato (7 ml) con un movimiento de abanico, con el fin de no alterar las células tras la descongelación (Figura 3.17.).



Figura 3.17. Subcultivo de NHOST en botella de cultivo.



Llevamos a cabo controles diarios al microscopio óptico Olympus CKX41 (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokio, Japón), para ir constatando la proliferación y controlando las posibles contaminaciones.

Cuando la confluencia (cantidad de área de superficie de la placa de cultivo de tejido que está cubierto con células expresadas como un porcentaje) alcanza el 90%, se procede al subcultivado con el fin de renovar el stock de células para conservar la línea celular para nuevos experimentos. Posteriormente procedemos a la siembra en las superficies de titanio elegidas para el estudio (previamente esterilizadas con etanol 70°C). Se añadió 26  $\mu$ l de suspensión celular (710400 células/ml y viabilidad 96%) + 2ml de medio de cultivo lentamente a cada placa de cultivo, y se incubaron durante 48h a condiciones fisiológicas en incubador, momento en que se comenzó su procesado con marcaje con fluorocromos y anticuerpos específicos para cada variable de estudio y la posterior captura de imágenes.

Se llevó a cabo el control del crecimiento celular mediante microscopía óptica utilizando el microscopio óptico Olympus CKX41 (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokio, Japón) (Figura 3.18. – 3.20.),

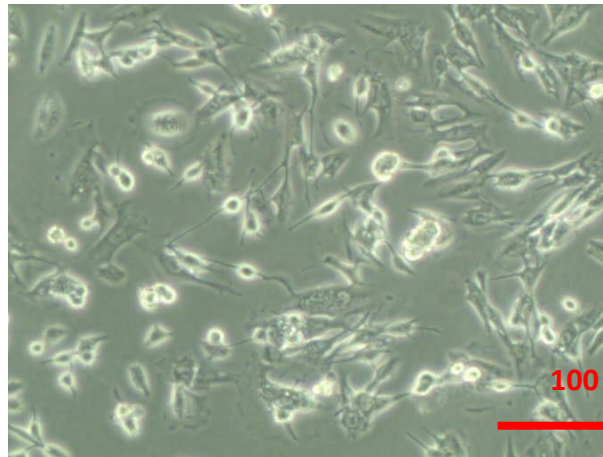


Figura 3.18. Imagen de crecimiento celular en grupo control. Imagen obtenida mediante utilización de microscopio óptico.

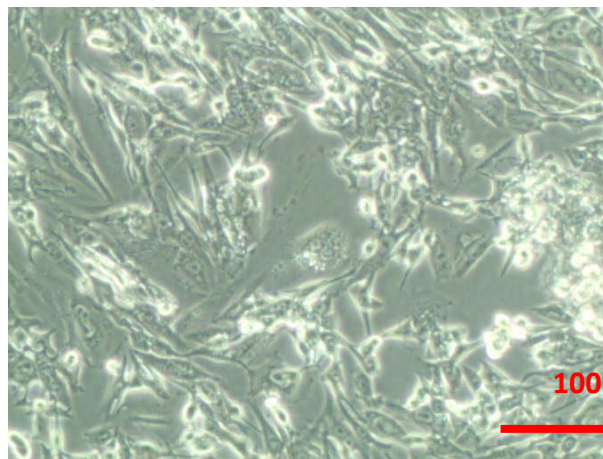


Figura 3.19. Imagen de crecimiento celular osteoblastos cultivados sobre sobre superficie maquinada. Imagen obtenida mediante utilización de microscopio óptico.

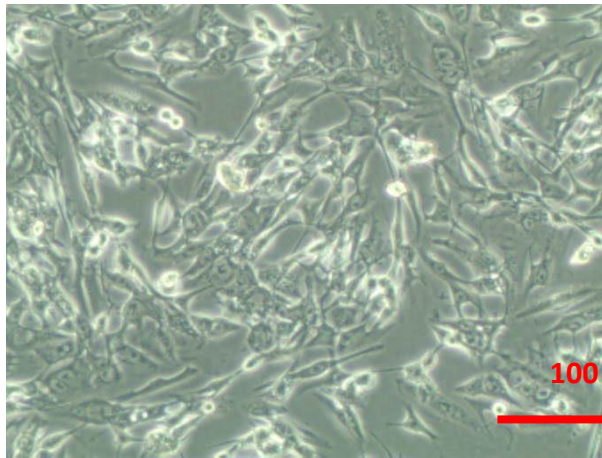


Figura 3.20. Imagen de crecimiento celular osteoblastos cultivados sobre sobre superficie Osseotite®.  
Imagen obtenida mediante utilización de microscopio óptico.

### **3.2.2. Estudio de viabilidad celular: tinción fluorescente de núcleos celulares mediante DAPI (4'.6-diamidino-2-phenylindole).**

Dividimos el proceso en dos partes, una primera de preparación y una segunda de tinción propiamente dicha.

Comenzamos la preparación con solución primaria de 20 mg de 4'.6-diamidino-2-phenylindole DAPI (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y 100 ml de agua desmineralizada.

- a. Solución primaria A: 0,1 M ácido cítrico (disolver 19,21 g de ácido cítrico anhidro por 1000 ml de agua destilada o 21,01 g de ácido cítrico monohidrato por 1000 ml de agua destilada.)
- b. Solución primaria B: 0,2 M hidrogenofosfato disódico (disolver 35,6 g de tampón fosfato salino ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , PBS) x 2  $\text{H}_2\text{O}$  por 1000 ml de agua destilada o 71,63 g tampón fosfato salino ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , PBS) x 12  $\text{H}_2\text{O}$  por 1000 ml agua destilada).

El tampón de McIlvaine (LabChem Inc., Zelenople, PA, EE.UU.) pH 7,0 se hace con dos partes de la solución primaria A y ocho partes de la solución primaria B que son mezcladas para producir el tampón con un valor pH de 7,0.

Preparamos además la solución de tinción DAPI (10 $\mu$ l Solución primaria / 10 ml tampón de McIlvaine pH 7,0).

Tras la preparación procedemos a la tinción siguiendo el siguiente protocolo: mantenemos las células en agua desmineralizada durante tres minutos. Tras ello las mantenemos en tampón de McIlvaine pH 7,0 durante 5 minutos para tinción DAPI e incubar las células en oscuridad durante 15 minutos. Los frascos deben mantenerse siempre bien cerrados. A continuación escurrimos bien y secamos el portaobjetos con una torunda. Montamos con medio acuoso de montaje Aquatex® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Las imágenes son capturadas con microscopio óptico de fluorescencia Olympus BX61® (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokio, Japón) y cámara Axio Scope® (Carl Zeiss®, OPM, Pico Dental, Alemania) a objetivo de 20x. Se aplicó un zoom x2.3 y se adquirieron las imágenes mediante un barrido en Z de diez planos y cuatro segundos cada uno respectivamente para localizar el mejor plano de enfoque. Una vez adquiridas las imágenes, se marcan las regiones de interés (ROI) de cada zona, se toman de cada muestra cinco campos o zonas de contaje (noreste, noroeste, centro, sureste y suroeste), por duplicado al haber dos réplicas de discos de cada tipo. Posteriormente se procede al recuento manual del número de células por campo y el de viables frente a apoptóticas, calculando el número medio de células viables o apoptóticas por campo en cada tipo de superficie.

Los núcleos teñidos con DAPI (máximo de absorción a 359 nm) muestran color azul a una longitud de onda de 461 nm. Mediante esta técnica podremos cuantificar células por células viables por campo y células apoptóticas por campo. Las células viables (no apoptóticas) se muestran azul intenso uniforme, mientras que las apoptóticas en azul granulado, polilobulado o fragmentado.

Una vez llegados a este punto se procede a un análisis estadístico entre grupos para observar su significancia. Se realizará la confirmación de normalidad mediante Kolmogorov-Smirnov y comparación entre grupos mediante ANOVA y test de Bonferroni.

### **3.2.3. Estudio del citoesqueleto celular: tinción con anticuerpos específicos anti actina humana marcados con rodamina-faloidina (*Rhodamine-Phalloidin*).**

Mediante esta técnica podremos cuantificar la longitud de las fibras del citoesqueleto (longitud axial).

Para la fijación de la faloidina con rodamina es necesario que la F-actina tenga una estructura proteica cercana a la nativa. Las células en fase de movilidad se muestran con formas triangulares alargadas, es decir, con su esqueleto longitudinal axial (el que abarca de extremo a extremo de la célula) expandido.

Preparamos 10% paraformaldehído stock como el siguiente: 1g paraformaldehído en 10 ml de H<sub>2</sub>O calentada a ~60°C añadir una gota de 1M NaOH y continuar calentando hasta que la mayor parte esté disuelto. Después lo filtramos con un filtro de 0,2 µm, y a continuación lo diluimos al 4% en tampón fosfato salino (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, PBS) para la fijación celular del ensayo.

En un primer paso se lavan las células con tampón fosfato salino (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, PBS) cuidadosamente para retirar los restos de medio de cultivo. Fijamos las células en 1,5 % paraformaldehído en tampón fosfato salino (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, PBS) durante 15 minutos a temperatura ambiente. El tiempo de fijación puede variar, dependiendo del grosor del espécimen (tiempo que tarda el fijador para difundir en la muestra) y como de sensible sea el anticuerpo al fijador.

Retiramos el exceso de aldehído con 0,5ml de tampón fosfato salino (PBS) durante 5 minutos, tras lo cual procedemos a la permeabilización de las células en 0.1% Triton-X100 en PBS durante 1 minuto. Incubamos las células en rodamina-

faloidina en metanol (Molecular Probes®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE.UU.) diluidas 1:100 en PBS durante 15 minutos. Llevamos a cabo tres lavados con tampón fosfato salino ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , PBS), cinco minutos cada lavado, antes de preparar las muestras para la observación.

Para preparar las muestras para microscopía usamos medio de montaje y preservador de la fluorescencia Vectashield® (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, EE.UU.) o glicerol al 10%. Espectro de absorción-emisión max. 540/565 nm. (Figura 3.21.).

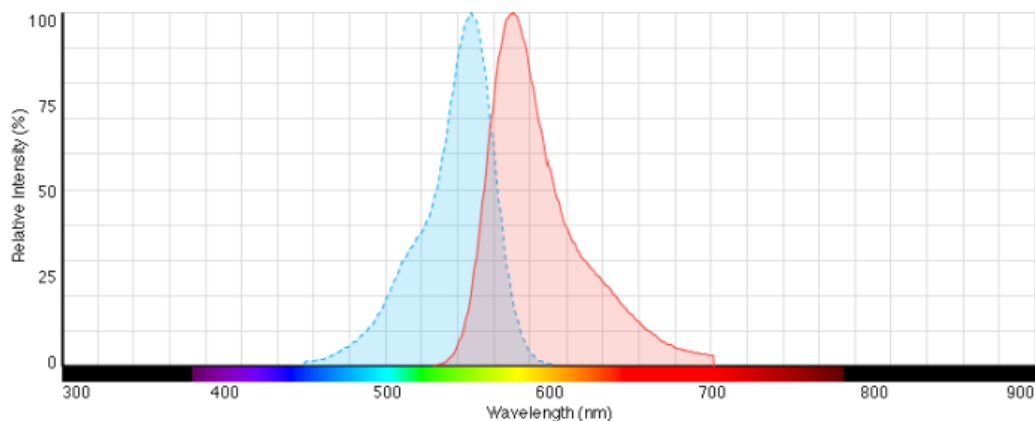


Figura 3.21. Espectro fluorescente 540/565 nm.

Para cuantificarlo se procede de la siguiente manera, tras el montaje de los discos y captura de imágenes con microscopio de fluorescencia (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokio, Japón) y cámara Axio Scope® (Carl Zeiss®, OPM, Pico Dental, Alemania) utilizando en detector de lámpara de mercurio TRITC, a objetivo de 20x, de manera similar a los casos anteriores, se miden manualmente formando una recta ROI mediante programa IMAGE-J Plus la longitud de dicho citoesqueleto (en



µm) para cada célula de cada zona de estudio y se hace la media de las mediciones de cada grupo de estudio.

Una vez llegados a este punto se procede a un análisis estadístico de los entre grupos para observar su significancia. Se procede a la confirmación de la normalidad mediante Kolmogorov-Smirnov y comparación entre grupos mediante ANOVA y test de Bonferroni.

### 3.2.4. Estudio energético celular: cuantificación del potencial de membrana mitocondrial mediante tinción JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine Iodide).

El JC-1 es un colorante monomérico lipofílico de color verde que permanece en ese estado en la cara del citosol. Cuando el potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ) aumenta (más activo) debido a la alta densidad de proteínas intermembrana generadoras de gradiente electroquímico en las membranas mitocondriales, facilitan el paso de estos monómeros verdes desde el citosol a la matriz mitocondrial donde se acumulan y forman los agregados en forma de dímeros de color rojo (Figura 3.22.). La presencia de los dos colores con predominancia del rojo es indicador de células sanas, no apoptóticas, con mitocondrias más activas (alto potencial de membrana), y por lo tanto células más viables en cuanto a movilidad, proliferación, capacidad de diferenciación y actividad celular se refiere.

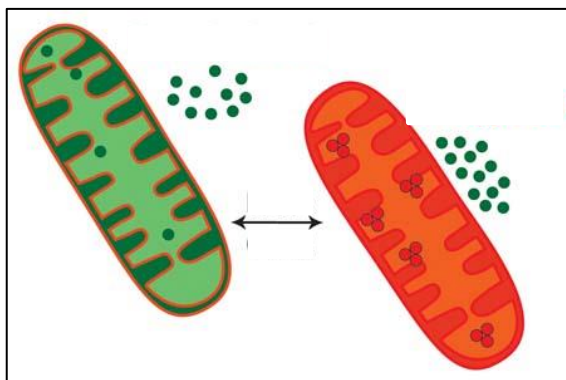


Figura 3.22. Color verde: mitocondrias menos activas. Color rojo: mitocondrias más activas.

Preparamos 5 mg/ml de solución stock de JC-1 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en dimetilsulfuro (DMSO ~7,7 mM) (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, EE.UU.), evitando exponer a la luz intensa directamente, llevando a cabo los procedimientos de tinción bajo luz tenue y la incubación bajo papel de plata. Debemos evitar repetir la congelación/descongelación de la solución stock de JC-1. Se deben hacer pequeñas alícuotas tras la primera descongelación y mantenerlas almacenadas a -20°C. Cuando tengamos las células cultivadas se procede a calentar el medio de cultivo fresco a 37°C y descongelar una alícuota de solución stock de JC-1 a temperatura ambiente. Debemos asegurarnos que la solución de JC-1 está completamente descongelada y atemperada a temperatura ambiente antes de diluirla en el medio de cultivo. Preparamos el reactivo mediante disolución de la solución de tinción JC-1 en el medio de cultivo pre-calentado. Para las células adherentes, JC-1 se diluyen el medio hasta una concentración final de aproximadamente 5 µg/ml (agitamos durante la disolución para prevenir la formación de precipitados y mezclamos bien hasta estar seguros de disolver todas las partículas, no se debe centrifugar el reactivo). Tras esto retiramos el medio de cultivo de las células y lo reemplazamos por la disolución de 1X JC-1 suficiente para cubrir las células. Dejamos incubar las células durante 10 minutos a 37°C (o a temperatura ambiente durante 15 minutos). Retiramos el medio y lavamos la monocapa celular dos veces con tampón fosfato salino (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, PBS) o medio fresco. Añadimos tampón fosfato salino (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, PBS) y cubrimos las células con un cubreobjetos.

Las mitocondrias de dichas células en cultivo en las distintas superficies de los discos de titanio se observaron inmediatamente mediante microscopía confocal láser CLSM de Leica® (Leica microsystems, Wetzlar, Alemania).

En primer lugar se colocó un medio de montaje; Vectashield® (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, EE.UU.), y se colocó un cubremuestras de cristal

de diámetro 0,3mm específico para confocal, tras lo cual se seleccionó el objetivo de aumento 40x y se usó detector fluorescente FIITC para localizar y enfocar las células, en 5 regiones aleatorias predeterminadas de la siguiente manera: campo central, y campos extremos norte, sur, este y oeste del disco, respectivamente, con la cámara se recogió del CLSM las mitocondrias presentes en dichas zonas.

Los agregados de color rojo muestran un espectro de excitación-emisión máxima a una longitud de onda de 514/590nm. Los monómeros de color verde muestran un espectro de excitación-emisión máxima de 514-529nm las imágenes se recogen con el láser Argón de 488nm digital al 76%, el Pinhole en airy 1.02, la apertura al numérica al 0,5, las ganancias 1 y 2 a 799V y 841V respectivamente. El prisma utilizado fue el tricricoico TD 488/543/635 (510-535/590-625), y las imágenes fueron creadas en formato 1024x1024 (8 bits).

Se comienza colocando el potenciómetro del láser Argón general manual al 50% (para evitar el *fotobleaching*), con el objetivo de 40x donde se empiezan a visualizar las mitocondrias. Tras el montaje de los discos como en el caso anterior, la captura de imágenes se produce de la misma manera que en los protocolos anteriores (Figura 3.23.) y en la subpestaña “Análisis” seleccionamos el recuento automático de píxeles rojo/verde y el cálculo de los datos de porcentaje (%) de cada zona a partir del gráfico de distribución de nube de puntos (Figura 3.24.), para cada superficie, que es proporcional al potencial electroquímico de membrana mitocondrial y por consiguiente al nivel de actividad celular.

Se procedió al test de análisis estadístico de los resultados mediante confirmación de normalidad mediante Kolmogorov-Smirnov y comparación entre grupos mediante ANOVA y test de Bonferroni, para observar la significancia de los datos de los ratios medios (rojo/verde) de cada superficie, siendo la presencia de

ambos colores y el ratio más alto el significativo de células con mitocondrias más potencialmente activas y sanas, respecto a un ratio rojo/verde bajo que mostraría signos de apoptosis y senescencia celular.

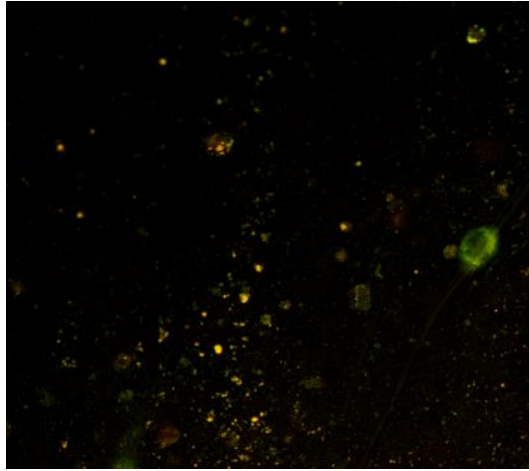


Figura 3.23. ROI zona central superficie Ti Osseotite a 40x zoom 2 en microscopio confocal láser CLSM de Leica.

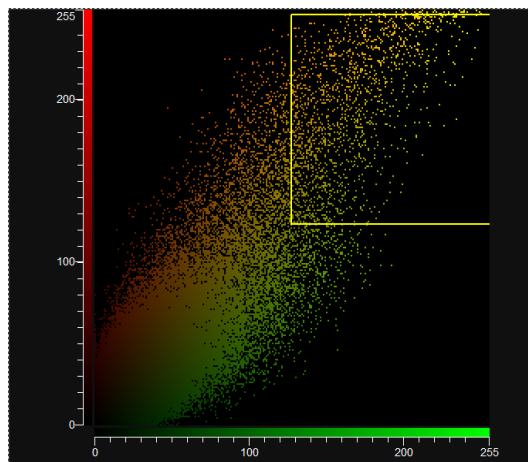


Figura 3.24. Medición Pixeles rojo/verde de ROI zona central en superficie Ti Osseotite.

### **3.2.5. Estudio de productividad ósea: marcador de anticuerpo específico anti proteína BMP-2 humana.**

La proteína BMP-2, proteína morfogenética ósea 2, se encuentra en el espacio intra y extracelular. Las células viables y en estado osificante se muestran pixeladas de color amarillento tanto en el citosol como en la zona extracelular (tras su excreción). A mayor concentración de pixeles, por la proteína marcada con anticuerpo anti hBMP-2 fluorescente, mayor actividad celular de síntesis de proteínas específicas BMP-2.)

Para su detección se comenzó con la fijación celular. Para ello se utilizó paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS durante una hora, tras lo cual se lavó tres veces con PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  atemperado. Cada lavado fue de un minuto de duración. Se sumergió en Triton x-100 durante 30 minutos con el fin de llevar a cabo la permeabilización de la membrana, y se procedió al lavado con PBS, tres veces de un minuto de duración cada una.. Se incubó la muestra con anticuerpo antihumanBMP-2 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) durante una hora, se lavó posteriormente con PBS, tres veces de un minuto de duración cada una. Por último se procedió al marcaje con anticuerpos (anticuerpo Fc antihumanBMP-2 marcado con Cys-5) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) durante una hora. Tras limpieza con albumina (se lavó dos veces utilizando BSA 1% en PBS, durante 10 minutos) se preparó las muestras para microscopía usamos medio de montaje y preservador de la fluorescencia Vectashield® (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, EE.UU.) o glicerol al 10%.

Tras el montaje de los discos como en apartados anteriores, la captura de imágenes se efectuó mediante el microscopio confocal (Carl Zeiss®, OPM, Pico Dental, Alemania) utilizando el Láser de Helio-Neón de 635 al 50%, a objetivo 10x de la misma manera que en los protocolos anteriores. Una vez adquiridas las imágenes

digitales de cada una de las superficies, se procedió a la cuantificación automática de los píxeles de las regiones ROI de cada superficie de estudio, y su correspondiente porcentaje total (%) de proteína marcada, en relación al resto de píxeles negros.

Por último, se procedió a un análisis estadístico de los resultados entre grupos aplicando la confirmación de normalidad mediante Kolmogorov-Smirnov y la comparación entre grupos mediante ANOVA y test de Bonferroni.

# **RESULTADOS**



## 4. Resultados

### 4.1. Estudio de viabilidad celular: tinción fluorescente de núcleos celulares mediante DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*).

Obtuvimos imágenes de los núcleos de NHOst viables mediante utilización de microscopio confocal espectral de barrido láser LEICA TCS-SP2 (Leica microsystems, Wetzlar, Alemania). Presentamos imágenes de NHOst cultivados del grupo control (20x) (Figura 4.1.); y NHOst cultivados sobre discos de titanio con superficie maquinada (20x) (Figura 4.2.), y superficie Osseotite® (20x) (Figura 4.3.).

DATOS DESCRIPTIVOS			
Tipo de experimento	Grupos	Media	Desviación estándar
Células por campo	Control	18,87	±1,72
	Maquinado	19,33	±13,17
	Osseotite	21,26	±11,24
Células viables por campo	Control	18,25	±2,76
	Maquinado	18,83	±12,93
	Osseotite	20,85	±11,55
Células apoptóticas por campo	Control	,62	±1,40
	Maquinado	,38	±,60
	Osseotite	,16	±,74

Tabla 4.1. Datos descriptivos de los experimentos llevados a cabo: Estudio de viabilidad celular: tinción fluorescente de núcleos celulares mediante DAPI: número de células por campo, número de células viables por campo, número de células apoptóticas por campo.

Los datos descriptivos recogidos del experimento para el estudio de viabilidad celular quedan recogidos en la tabla 4.1.

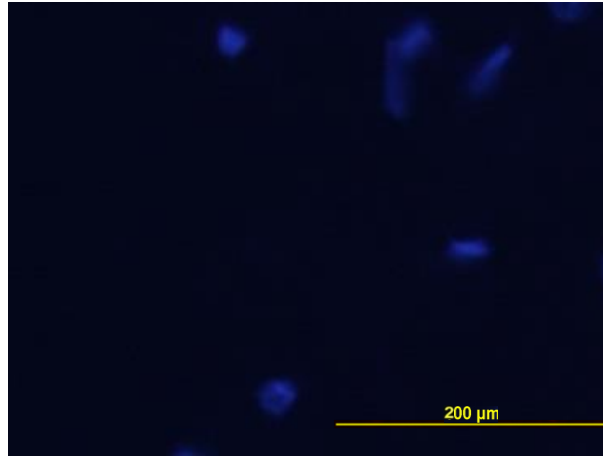


Figura 4.1. Visualización de núcleos de osteoblastos viables en cultivos de grupo Control. Imágenes obtenidas microscopio óptico de fluorescencia Olympus BX61® (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokio, Japón) y cámara Axio Scope® (Carl Zeiss®, OPM, Pico Dental, Alemania) a objetivo de 20x

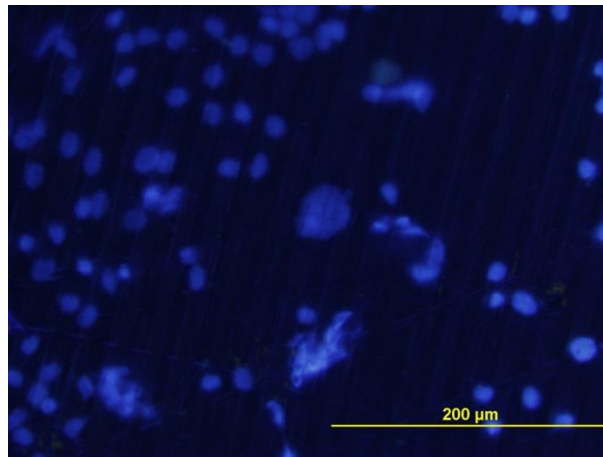


Figura 4.2. Visualización de núcleos de osteoblastos viables en cultivos sobre superficie maquinada. Imágenes obtenidas microscopio óptico de fluorescencia Olympus BX61® (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokio, Japón) y cámara Axio Scope® (Carl Zeiss®, OPM, Pico Dental, Alemania) a objetivo de 20x.

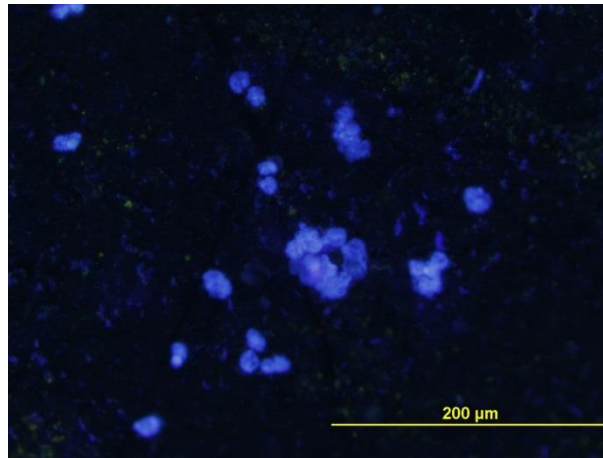


Figura 4.3. Visualización de núcleos de osteoblastos viables en cultivos sobre superficie Osseotite®. Imágenes obtenidas microscopio óptico de fluorescencia Olympus BX61® (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokio, Japón) y cámara Axio Scope® (Carl Zeiss®, OPM, Pico Dental, Alemania) a objetivo de 20x.

## 4.2. Estudio del citoesqueleto celular: tinción con anticuerpos específicos anti actina humana marcados con rodamina-faloidina (*Rhodamine-Phalloidin*).

Obtuvimos imágenes del citoesqueleto de NHOst cultivados sobre discos de titanio con superficie maquinada y superficie Osseotite® (Biomet 3i, Palm Beach Garden, Florida) teñidos con rodamina. Las imágenes fueron obtenidas mediante utilización de microscopio confocal espectral de barrido láser LEICA TCS-SP2 a 20x (Figura 4.4, 4.5, 4.6) (Leica microsystems, Wetzlar, Alemania).

DATOS DESCRIPTIVOS			
Tipo de experimento	Grupos	Media	Desviación estándar
Longitud axial del citoesqueleto	Control	74,11 μm	±22,50
	Maquinado	94,81 μm	±37,84
	Osseotite	115,9 μm	±39,52

Tabla 4.2. Datos descriptivos de los experimentos llevados a cabo: Estudio de citoesqueleto celular: tinción con Anticuerpos específicos anti actina humana marcados con Rodamina-Phalloidina

Los datos descriptivos recogidos del experimento para el estudio del citoesqueleto celular quedan recogidos en la tabla 4.2.

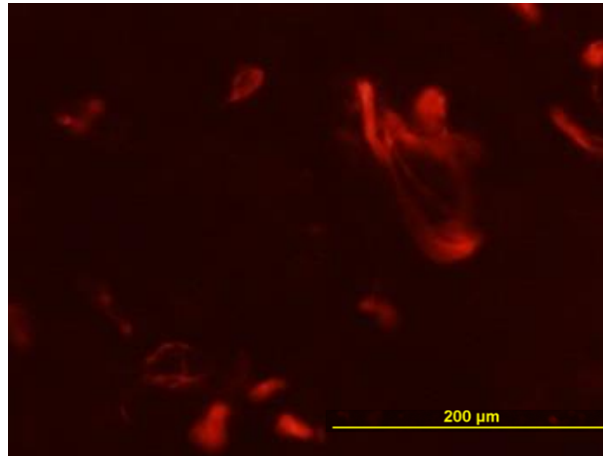


Figura 4.4. Visualización de citoesqueleto osteoblástico mediante tinción con rodamina de osteoblastos cultivados pertenecientes al grupo Control. Imágenes obtenidas mediante utilización de microscopio óptico de fluorescencia Olympus BX61® (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokio, Japón) y cámara Axio Scope® (Carl Zeiss®, OPM, Pico Dental, Alemania) a objetivo de 20x.

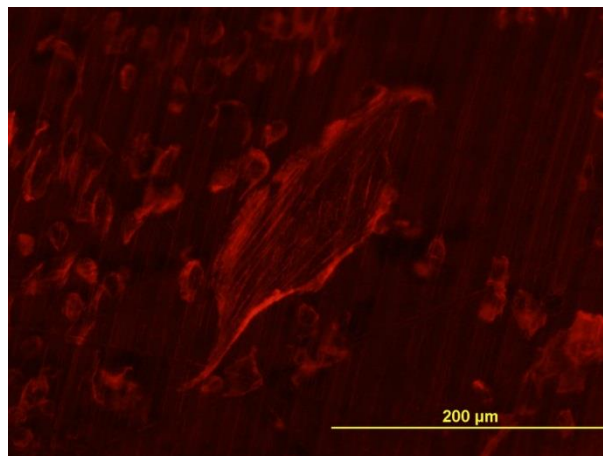


Figura 4.5. Visualización de citoesqueleto osteoblástico mediante tinción con rodamina de osteoblastos cultivados sobre sobre superficie maquinada. Imágenes obtenidas mediante utilización de microscopio óptico de fluorescencia Olympus BX61® (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokio, Japón) y cámara Axio Scope® (Carl Zeiss®, OPM, Pico Dental, Alemania) a objetivo de 20x.

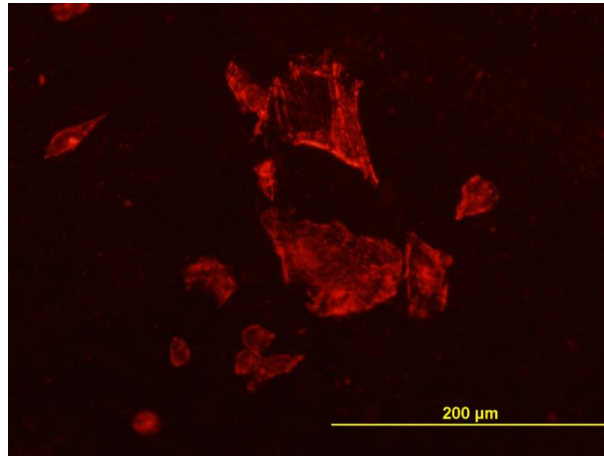


Figura 4.6. Visualización de citoesqueleto osteoblástico mediante tinción con rodamina de osteoblastos cultivados sobre superficie Osseotite®. Imágenes obtenidas mediante utilización de microscopio óptico de fluorescencia Olympus BX61® (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokio, Japón) y cámara Axio Scope® (Carl Zeiss®, OPM, Pico Dental, Alemania) a objetivo de 20x

### 4.3. Estudio energético celular: cuantificación del potencial de membrana mitocondrial mediante tinción JC-1 (*5,5',6,6'tetrachloro1,1',3,3'tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine Iodide*).

Obtuvimos imágenes de mitocondrias de NHOst cultivadas sobre discos de titanio con superficie maquinada y superficie Osseotite® (Biomet 3i, Palm Beach Garden, Florida) teñidas con JC-1. Las imágenes fueron obtenidas mediante utilización de microscopio confocal espectral de barrido láser LEICA TCS-SP2 a 40x (Figura 4.7, 4.8, 4.9) (Leica microsystems, Wetzlar, Alemania).

DATOS DESCRIPTIVOS			
Tipo de experimento	Grupos	Media	Desviación estándar
Estudio energético celular (JC1)	Control	10,28	±4,77
	Maquinado	18,74	±6,16
	Osseotite	23,30	±7,11

Tabla 4.3. JC1 (Estudio energético celular: cuantificación del potencial de membrana mitocondrial mediante tinción JC-1),

Los datos descriptivos recogidos del experimento para el estudio energético celular quedan recogidos en la tabla 4.3.

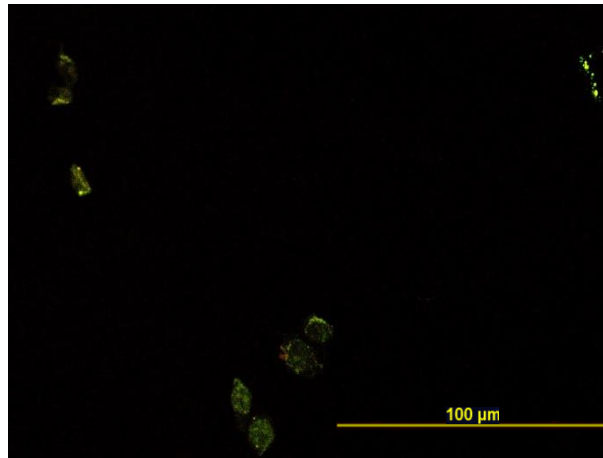


Figura 4.7. Visualización de mitocondrias de NHOst cultivados pertenecientes al grupo Control con JC-1 y visualizadas mediante utilización de microscopio confocal espectral de barrido láser LEICA TCS-SP2 a 40x (Leica microsystems, Wetzlar, Alemania).

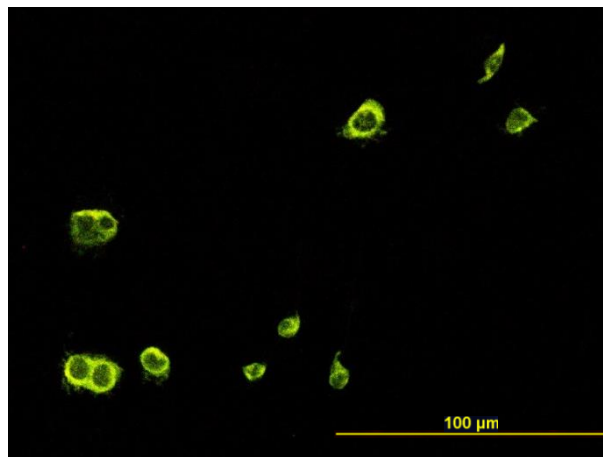


Figura 4.8. Visualización de mitocondrias de NHOst cultivados sobre discos de titanio con superficie maquinada (Biomet 3i, Palm Beach Garden, Florida) teñidas con JC-1 y visualizadas mediante utilización de microscopio confocal espectral de barrido láser LEICA TCS-SP2 a 40x (Leica microsystems, Wetzlar, Alemania).



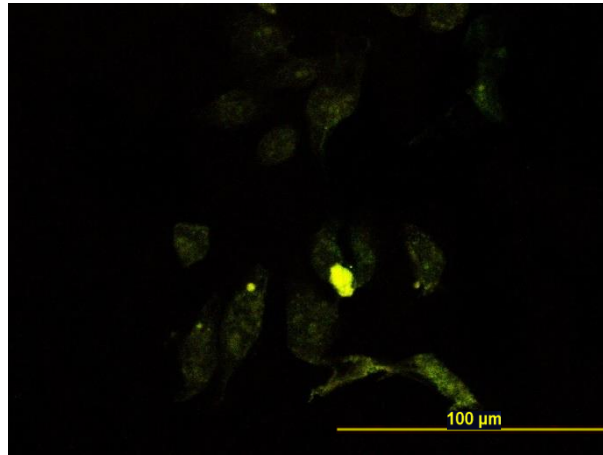


Figura 4.9. Visualización de mitocondrias de NHOst cultivados discos de titanio con superficie tratada mediante doble grabado con ácido nítrico y fluorhídrico (dual acid etch, DAE), Osseotite® (Biomet 3i, Palm Beach Garden, Florida) teñidas con JC-1 y visualizadas mediante utilización de microscopio confocal espectral de barrido láser LEICA TCS-SP2 a 40x (Leica microsystems, Wetzlar, Alemania)

#### 4.4. Estudio de productividad ósea: marcador de anticuerpo específico anti proteína BMP-2 humana.

Obtuvimos imágenes digitales de BMP-2 producidas por NHOst, utilizando para la captura de imágenes de microscopio confocal espectral de barrido láser microscopio confocal (Carl Zeiss®, OPM, Pico Dental, Alemania) utilizando el Láser de Helio-Neón de 635 al 50%, a objetivo 10x. Observamos NHOst cultivados del grupo control (10x) (Figura 4.10.); y NHOst cultivados sobre discos de titanio con superficie maquinada (10x) (Figura 4.11.), y superficie Osseotite® (10x) (Figura 4.12.).

DATOS DESCRIPTIVOS			
Tipo de experimento	Grupos	Media	Desviación estándar
Estudio de productividad ósea (BMP-2)	Control	3,88%	±3,43
	Maquinado	13,10%	±5,51
	Osseotite	22,33%	±11,06

Tabla 4.4. Datos descriptivos de los experimentos llevados a cabo: Marcador de anticuerpo específico de proteína BMP-2: Estudio de productividad ósea.

Los datos descriptivos recogidos del experimento para el estudio de productividad ósea quedan recogidos en la tabla 4.4.

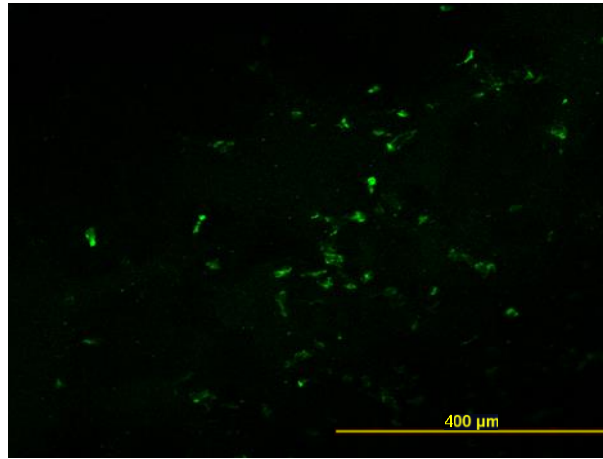


Figura 4.10. Visualización de imágenes digitales de BMP-2 producidas por osteoblastos cultivados pertenecientes al grupo Control. Imágenes obtenidas mediante utilización de microscopio confocal (Carl Zeiss®, OPM, Pico Dental, Alemania) utilizando el Láser de Helio-Neón de 635 al 50%, a objetivos 10x.

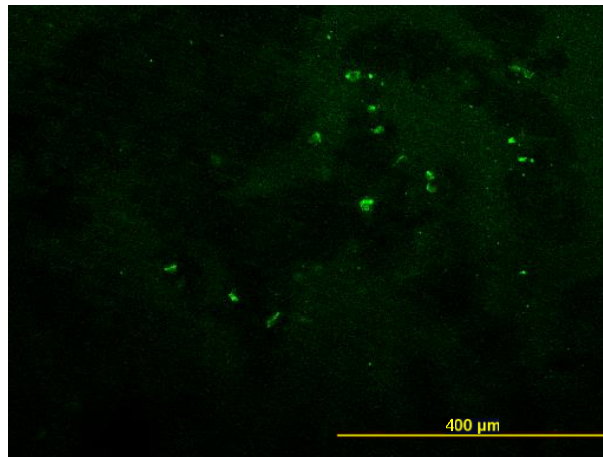


Figura 4.11. Visualización de imágenes digitales de BMP-2 producidas por osteoblastos cultivados de osteoblastos cultivados sobre sobre superficie maquinada. Imágenes obtenidas mediante utilización de Microscopio Confocal (Carl Zeiss®, OPM, Pico Dental, Alemania) utilizando el Láser de Helio-Neón de 635 al 50%, a objetivos 10x.

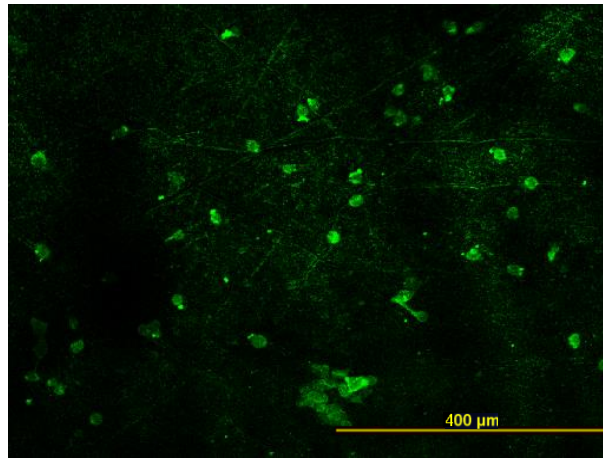


Figura 4.12. Visualización de imágenes digitales de BMP-2 producidas por osteoblastos cultivados sobre sobre superficie Osseotite®. Imágenes obtenidas mediante utilización de microscopio confocal (Carl Zeiss®, OPM, Pico Dental, Alemania) utilizando el Láser de Helio-Neón de 635 al 50%, a objetivos 10x.

## **4.5. Diferencias entre los resultados de los diferentes grupos.**

Sobre los datos presentados aplicamos el test ANOVA (análisis de la varianza), con el fin de comparar varios grupos en una variable cuantitativa y establecer la significancia estadística. Encontrando diferencias significativas en los experimentos de estudio de productividad ósea (marcador de anticuerpo específico anti proteína BMP-2 humana), estudio de movilidad y adhesión (tinción con anticuerpos específicos anti actina humana marcados con rodamina-faloidina) y estudio energético celular (cuantificación del potencial de membrana mitocondrial mediante tinción JC-1). No se observó esa diferencia significativa para estudio de apoptosis mediante tinción fluorescente de núcleos celulares mediante DAPI, en el que podremos observar células apoptóticas y viables y recuento de número de células por campo.

Tras la comparación múltiple y aplicación del test de Bonferroni observamos que existe diferencia estadísticamente significativa entre todos los grupos para el experimento de BMP-2, entre el grupo Control y grupo Osseotite para el estudio de movilidad y adhesión, y para las comparaciones de grupo Control y grupo Maquinado y grupo Control y grupo Osseotite para el estudio energético celular mediante tinción con JC-1.

Observamos que sobre superficies tratadas mediante doble ataque ácido (Osseotite®, Biomet 3i, Palm Beach Garden, Florida, EE.UU.) existe una mayor producción de BMP-2 de los osteoblastos, indicándonos, por tanto, una mayor productividad ósea sobre estas superficies. Se cuantifica la expresión de BMP-2 en un 22,3% en grupo Osseotite, 13,1% en grupo Maquinado y tan sólo un 3,8% en el grupo Control, con un valor  $p < 0,001$ .

De igual modo se encontró mejores valores para el estudio de movilidad y adhesión y energético celular para grupo Osseotite, pero con matices. Se midió la longitud axial media del citoesqueleto de osteoblastos, obteniéndose valores de 115,9  $\mu\text{m}$  en el grupo Osseotite, 94,81  $\mu\text{m}$  en el grupo Maquinado y 74,11  $\mu\text{m}$  en el grupo Control, siendo estadísticamente significativo un mejor comportamiento del osteoblastos sobre superficie Osseotite respecto al grupo Control ( $p = 0,042$ ), pero no así respecto al grupo Maquinado ( $p = 0,526$ ).

En cuanto al estudio energético celular también observamos una mejor función de los osteoblastos sobre superficie Osseotite®, también con matices que veremos a continuación. La ratio pixeles rojo/verde es mayor para este grupo, con un valor de 23,3, siendo 18,74 para el grupo Maquinado y 10,28 para el grupo Control. Aplicando el test de Bonferroni para comparaciones múltiples observamos diferencia estadísticamente significativa entre grupo Control y Maquinado ( $p = 0,0034$ ) y grupo Control y Osseotite ( $p < 0,001$ ), no así entre los grupos Maquinado y Osseotite ( $p = 0,449$ ).

# DISCUSIÓN

---

## 5. Discusión.

Una de las finalidades de la microscopía es permitir observar los especímenes en detalle, logrando un balance óptimo entre el contraste y la resolución. Este hecho es de extrema utilidad en muestras incoloras, tales como las células vivas, dado que en su estado natural son transparentes y con poco contraste, en las cuales los detalles permanecen invisibles a pesar de la alta resolución de estos aparatos. El interés de observar células vivas radica en la posibilidad de captar procesos vitales en pleno desarrollo, tales como la motilidad, la división, la fagocitosis y muchos otros. Estas particularidades han motivado a los investigadores a buscar métodos para incrementar el contraste con la finalidad de obtener imágenes de células vivas con más detalles. Normalmente, en el microscopio convencional, esto se puede lograr de cierta manera si se reduce la apertura del diafragma o se disminuye la cantidad de luz; con estas maniobras se incrementa el contraste, pero lamentablemente también se reduce seriamente la resolución y la nitidez; por eso mismo, se han diseñado técnicas microscópicas más complejas que incrementan el contraste sin afectar la resolución. Son procedimientos que proporcionan efectos ópticos en la muestra, permitiendo que aquellos detalles que pasan desapercibidos se traduzcan en cambios de intensidades luminosas las cuales sí pueden ser reconocidas por el ojo humano, incluso cuantificadas. De ahí el desarrollo de técnicas de fluorescencia que nos permiten estudiar de una forma clara los diferentes acontecimientos que pueden suceder en células vivas.

El estudio del comportamiento de los osteoblastos sobre dos diferentes superficies de titanio (como es el caso de nuestro estudio), puede traducirse en el estudio del comportamiento óseo sobre estas mismas. Conocer este comportamiento y desarrollar a partir del mismo superficies de implantes dentales, que promuevan no



sólo el crecimiento, si no la adhesión de las células óseas a las mismas es el principio del camino hasta la consecución de superficies con las cuales podamos garantizar la estabilidad en tratamientos implantológicos teniendo como base una mayor y mejor osteointegración.

Tras años de investigación, sabemos que algunos metales o aleaciones metálicas, tales como titanio, circonio, hafnio, tántalo, niobio o aleaciones de los mismos, se pueden usar para formar enlaces relativamente fuertes con el tejido óseo. El *gold standard* en osteointegración de implantes dentales sigue siendo el titanio. Si bien la unión entre este metal y el tejido óseo es relativamente fuerte, es deseable mejorar dicha unión. Son diversos los métodos desarrollados para tratar dichos implantes metálicos a fin de obtener una superficie adecuada de los mismos que mejore su osteointegración. Por "superficie" se entiende la capa superficial o zona más externa de un implante compuesta principalmente por el óxido del metal correspondiente, cuyas características físicas son claramente diferentes a las del material macizo del cual está compuesto.

Es preciso conocer, antes de estudiar el comportamiento osteoblástico, las características fisicoquímicas y estructurales de los materiales que componen los implantes dentales, y más concretamente sus propiedades de superficie; para ello en este estudio hemos llevado a cabo técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM). La morfología creada mediante diferentes técnicas (descritas en el apartado de introducción) que conlleva un incremento en la rugosidad superficial en comparación con las superficies mecanizadas, supone un incremento en la capacidad de osteointegración de los implantes dentales. En la actualidad, nos encontramos que las superficies tratadas mediante sistemas de adición han sido claramente superadas por aquellas tratadas mediante sistemas de sustracción. Entre estos últimos destacan los arenados con o sin grabado (superficies SLA®, Straumann®, Basilea, Suiza; y

Tioblast®, Astra Tech®, Dentsply Implants®, Suecia) oxidación anódica (superficie TiUnite®, Nobel Biocare®, Suecia) y el grabado ácido (superficie Osseotite®, Biomet 3i®, Palm Beach Garden, Florida, EE.UU.). Además del estudio de morfología de superficie, es importante conocer la química superficial de las mismas, para lo cual, se utilizan técnicas asociadas a SEM, como la espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS). Kang et al. observan utilizando esta técnica como los discos de superficie Osseotite® presentan una capa superficial compuesta por Ti, O, C (110).

El ataque químico de la superficie del implante se puede efectuar empleando diversos ácidos minerales tales como ácido fluorhídrico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, etc. Así, por ejemplo, en una serie de patentes en Estados Unidos de Implant Innovations Inc. (US 5,603,338; US 5,876,453; US 5,863,201 y US 6,652,765) se describe el tratamiento ácido en dos etapas que se usa para obtener la superficie comercial Osseotite® (Biomet 3i®, Palm Beach Garden, Florida, EE.UU.). En la primera etapa se usa ácido fluorhídrico acuoso para eliminar el óxido natural sobre la superficie metálica, en la segunda etapa se usa una mezcla de ácido clorhídrico y ácido sulfúrico para obtener una superficie rugosa micrométrica, modificando así la microestructura de superficie y las propiedades químicas de la misma. En la solicitud de patente europea EP 1477 141, también de Implant Innovations Inc., se describe una variación de este método en el que se emplea una mezcla de ácido fluorhídrico y ácido clorhídrico en la segunda etapa para tratar superficies de implantes a base de aleaciones de titanio  $Ti_6Al_4V$ .

La respuesta de las células óseas a las superficies tratadas con doble ataque ácido con ácido fluorhídrico y ácido nítrico, como la superficie Osseotite® ha sido estudiada tanto en modelo animal *in vivo* como en modelo humano.

En 2009, el grupo brasileño de Silva et al. (111) presentó un estudio en el que evalúan la proliferación y diferenciación de células derivadas de la médula ósea humana sobre diferentes superficies rugosas de titanio. Las células obtenidas de la cresta ilíaca de un donante humano adulto (paciente de 45 años de edad, en buenas condiciones fisiológicas) fueron procesadas siguiendo el siguiente protocolo: las células fueron suspendidas en DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*), suplementadas con suero fetal bovino al 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y gentamicina 50 µg/ml, tras lo cual se cultivaron sobre superficies de titanio de diferente rugosidad, distribuyendo los grupos según el método de preparación:

- Superficie lisa y pulida
- Superficie lisa y pulida, y posterior ataque con ácido fluorhídrico / ácido nítrico durante 15 minutos (superficies rugosas).
- Superficie lisa y pulida, y posterior ataque con ácido fluorhídrico / ácido nítrico durante 30 minutos (superficies rugosas).

Las superficies se evaluaron mediante microscopio electrónico de barrido y perfilometría. Para el análisis de la proliferación celular se llevaron a cabo recuentos a los tres, siete, 14 y 21 días. Para el estudio de diferenciación celular se detectó la expresión de ARNm para osteocalcina y osteopontina mediante extracción de ARN mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Observaron que los discos de titanio sometidos a grabado con ácido durante 15 minutos permitían una mayor proliferación celular en todos los períodos de cultivo. El nivel de la expresión osteopontina y osteocalcina se incrementó en el grupo de tratamiento con ácido, lo que indica un incremento en la diferenciación de las células derivadas de la médula ósea humana a osteoblastos. Por todo ello, concluyen que el aumento de la rugosidad superficial en implantes dentales de titanio acelera la diferenciación de las células mesenquimales indiferenciadas en células de linaje

osteogénico, aunque no favorece necesariamente la proliferación celular. La rugosidad de la superficie intermedia, de 0,5  $\mu\text{m}$  (grabado ácido durante 15 minutos), favorece tanto las respuestas iniciales, como finales de las células.

Por otro lado en 2011, el grupo chino compuesto por He, Yang, Zhao y Cheng (112) publica un estudio cuyo objetivo era investigar la respuesta del hueso a la superficie de titanio rugosa creada mediante doble ataque ácido ácido fluorhídrico / ácido nítrico. Para ello dividieron dos grupos de estudio:

- Grupo test o experimental: implantes de titanio tratados con solución ácido fluorhídrico / ácido nítrico.
- Grupo control: implantes de titanio sin tratamiento con solución ácido fluorhídrico / ácido nítrico.

Para el estudio utilizaron discos de titanio comercialmente puro (cpTi) (10 x 10 x 15 mm) e implantes maquinados (3.0 mm de diámetro x 8 mm de longitud) (Zhejiang Guangci Medical Appliance, China). Se insertaron 45 implantes de cada grupo en ambas tibias de 15 conejos. Después de dos, cuatro y ocho semanas *in situ*, las tibias fueron extraídas y preparadas para observación con microscopía electrónica. Las pruebas mecánicas indicaron que la media del torque de retirada de los implantes fue mayor en el grupo experimental que en el grupo control tras ocho semanas. El análisis histomorfométrico indica que el área de hueso de la región cortical de los implantes explantados era significativamente mayor en el grupo experimental que en el grupo control tras cuatro y ocho semanas después de la cicatrización. La ratio del contacto hueso implante en la región cortical fue mayor también en el grupo experimental tras ocho semanas. Por lo tanto, concluyen que el tratamiento mediante doble ataque ácido (ácido fluorhídrico / ácido nítrico) promueve la formación ósea y la osteointegración tras cuatro y ocho semanas en un modelo animal de tibia de conejo.

Utilizando modelo animal se han llevado estudios experimentales comparativos de superficie con tratamiento mediante doble ataque ácido (ácido fluorhídrico / ácido nítrico) y maquinada, cuantificando en términos de contacto hueso implante (BIC) tras el tiempo de osteointegración. Weng et al. (113) presentan un estudio experimental sobre modelo animal en el cual colocan dos implantes de titanio maquinado (ICE group, Implant Innovations, Inc., Palm Beach Gardens, FL, EE.UU.) y dos implantes tratados en superficie mediante doble ataque ácido (OSS group, Osseotite®, Implant Innovations, Inc., Palm Beach Gardens, FL, EE.UU.) de 3,75x10 mm en posición de premolares mandibulares, sumergiéndolos completamente, retirando la sutura a los diez días y llevando a cabo su explantación y estudio histomorfométrico a los cuatro meses. Por otro lado, Veis et al. (114) llevan a cabo un estudio de características similares, también sobre perros en el cual implantan 22 implantes (20 Osseotite® y dos de superficie maquinada como control). En algunos sitios se realizaron defectos artificiales que fueron rellenados con hueso autólogo triturado. Los sitios quirúrgicos fueron recubiertos por membranas y éstas fijadas con pins. Tras cinco meses se explantaron y se realizó el estudio histomorfométrico. Comparando los resultados de ambos estudios se observa casi el doble de BIC para los grupos de implantes Osseotite® respecto a los implantes con superficie maquinada (Tabla 5.1.).

<b>Autores</b>	<b>Tiempo de explantación</b>	<b>Superficie Osseotite®</b>	<b>Superficie Maquinada</b>	
Weng et al. (113)	4 meses	62,9±12,4%	39,5±13%	p<0,01
Veis et al. (114)	5 meses (hueso regenerado)	64,44±15,8%	28,59±12,04%	p<0,00
	5 meses (hueso nativo)	32,32±15,09%	17,25±7,4%	p<0,001

Tabla 5.1. Comparación de BIC en estudios de Weng et al y Veis et al.

También se han comparado ambas superficies en modelo animal en términos de cuantificación de torque de desinserción (115-117), demostrando mejor comportamiento también la superficie Osseotite® en comparación con aquellos implantes de superficie maquinada (Tabla 5.2.).

<b>Autores</b>	<b>Dimensiones de los implantes</b>	<b>Tiempo de cicatrización</b>	<b>Torque de desinserción de implantes con superficie maquinada</b>	<b>Torque de desinserción de implantes con superficie Osseotite®</b>
Klokkevold PR et al. (115)	3,75x10 mm	8 semanas	4,95±1,61 Ncm	20,5±6,59 Ncm
Buser D et al. (116)	3,75x10 mm	4 semanas	-----	62,5 Ncm
		8 semanas		87,6 Ncm
		12 semanas		95,7 Ncm
Cordioli G et al. (117)	3,75x4 mm	5 semanas	25,26±3,35 Ncm	40,85±4,14 Ncm

Tabla 5.2. Comparación de torques de desinserción en estudios sobre modelos animal.

El comportamiento de las células osteoblásticas sobre la superficie de los implantes dentales determinará el grado de osteointegración que podemos llegar a conseguir que al fin al cabo será uno de los factores determinantes para la estabilidad del tratamiento, así como la posibilidad de acortar los tiempos actuales en los protocolos de implantología dental a la hora de someter a los implantes a carga. Actualmente, dada la trayectoria y la experiencia adquirida en la rehabilitación con implantes dentales la estabilidad de nuestro tratamiento se antoja cada vez más importante.

Con el fin de conocer en profundidad el comportamiento de los osteoblastos sobre superficies de titanio, se han llevado a cabo diferentes estudios en los últimos años. Traduciendo este comportamiento en cuantificación de una serie de parámetros.

Oliveira et al. (118) presentaron un estudio sobre especímenes de titanio comercialmente puro (cpTi) con la superficie modificada mediante ataque ácido (HCl o  $H_2PO_3$ ), o por ataque ácido y posterior tratamiento alcalino (NaOH) para investigar la influencia de dichos tratamientos en las propiedades osteoconductoras de la superficie, utilizando para ello osteoblastos humanos (HOb). Los niveles de expresión de ciertos genes tales con ALPL (fosfatasa alcalina), COL3A1 (colágeno tipo III $\alpha$ 1), SPP1 (osteopontina), RUNX2 (factor de transcripción *Runt-related*), SPARC (osteonectina) fueron analizados utilizando RT-PCR a tiempo real. Según los autores los resultados de este estudio son útiles para evaluar los mecanismos que gobiernan el comportamiento de los osteoblastos sobre las superficies de implantes dentales, el cual es la llave para el control de la formación ósea, la cual aceleraría los procesos que conllevan a la osteointegración. Concluyen que la superficie tratada mediante ataque ácido y posterior alcalinización induce a un mayor comportamiento osteoconductor: dichas superficies presentaban mayor formación de micro y nanoestructuras calcificadas.

Harimoto et al. (119) con el objetivo de investigar los efectos de los materiales por sí mismos en la compatibilidad con los osteoblastos utilizaron tres tipos diferentes de discos: un disco con superficie lisa de titanio (*ti disk*), un segundo con superficie lisa de hidroxiapatita (*Ap disk*) y un tercero con superficie rugosa de titanio (*TI disk*). Cultivaron células de ratón *osteoblast-like* sobre los tres tipos diferentes de superficies para proceder a recuento celular, tinción de fosfatasa alcalina, tinción de *Alizarin Red S* y medidores de *Quariz crystal microbalance*. Concluyen en que la hidroxiapatita presenta una mayor afinidad por los osteoblastos que el titanio. Este hecho fue, no

tanto por el tipo de superficie, sino por propiedades intrínsecas tales como la capacidad de adsorción de proteínas. Los autores afirman que aunque el titanio haya sido utilizado durante un largo tiempo como material de elección para la fabricación de implantes dentales su estudio sugiere que la razón por la que el titanio promueve mejor la osteointegración está relacionada con la alta compatibilidad de la apatita que debería formar parte de la superficie de implantes dentales de titanio.

Para conocer algo más el comportamiento de la superficie de hidroxiapatita (*hydroxyapatite coated, HA-coated*) acudimos a un artículo más clásico de Vallecillo et al. (120) en el que presentan un estudio en el que se evaluaron dos tipos de tratamiento de superficie de implantes después de cinco años, una de ellas recubierta con hidroxiapatita y otra con *plasma spray* de titanio. No se encontró diferencia significativa. Tras un seguimiento de cinco años se observó que los implantes con *plasma spray* de titanio obtuvieron diez casos fallidos (13,3%), mientras que los recubiertos con hidroxiapatita obtuvieron tres casos fallidos (5,6%). Concluyeron que el recubrimiento con hidroxiapatita tenía mayor probabilidad de éxito, ya que el *plasma spray* de titanio presenta mayor pérdida de hueso marginal periimplantario.

No obstante, aunque quede refrendado por la literatura que los implantes con recubrimiento de hidroxiapatita presentan una unión entre esta superficie y el hueso mayor que la del titanio únicamente, presentan una mayor adhesión osteoblástica y proliferación de la matriz extracelular que mejora la unión hueso – implante, y que se haya demostrado su eficacia clínica en diversos estudios realizados; a largo plazo no existen diferencias entre implantes con superficie recubierta con hidroxiapatita o superficie mecanizada. Además ya en 1999, Lacefield (121) reveló que este tipo de superficies presentan desventajas notorias por su potencial contaminación y posible reacción inflamatoria del tejido óseo adyacente debido a su dehiscencia o desprendimiento de la superficie del implante.



Como hemos visto hasta ahora respecto a las propiedades de superficie que presenta el titanio ha quedado demostrado que afectan a la respuesta de los osteoblastos, además debemos tener en cuenta el papel que juega la calidad ósea del huésped en el éxito de la osteointegración. Uno de los factores que determinan esta calidad es la edad del paciente. Olivares-Navarrete et al. en 2012, presentaron un artículo en el que examinan, tanto *in vitro* como *in vivo*, si la respuesta a las características de la superficie de titanio se veía afectada por la edad, en un modelo animal. Se aislaron osteoblastos obtenidos del cráneo de ratas de uno, tres y once meses. Todos mostraron una reducción en el número de células e incremento en la actividad específica de la fosfatasa alcalina y la osteocalcina en respuesta al aumento de la microtopografía del titanio y a su energía superficial. Los osteoblastos obtenidos de las ratas de las tres edades mostraron un incremento de la producción de la osteocalcina, de factores locales de osteoprotegerina, VEGF-A y TGF- $\beta$  activa en respuesta al incremento de la rugosidad de la superficie de titanio y su consecuente aumento de energía superficial. La TGF- $\beta$  latente sólo se veía aumentada en las ratas de uno y tres meses de edad. El tratamiento con la hormona sistémica  $1\alpha$ , 25 (OH) 2D3 incluso mejora aún más la respuesta de los osteoblastos a la superficie de titanio en los tres grupos de edad. Sin embargo, los osteoblastos derivados de las ratas de once meses de edad tenían una respuesta reducida a la  $1\alpha$ , 25 (OH) 2D3 en comparación con los osteoblastos derivados de ratas de uno y tres meses. Estos resultados fueron confirmados *in vivo*. En los implantes de titanio colocados en el canal intramedular femoral en ratas de nueve meses se observó un menor contacto hueso-implante y menor neovascularización en respuesta a la rugosidad de la superficie y la energía superficial, en comparación con ratas más jóvenes, de dos meses de edad. Estos resultados muestran que la maduración de osteoblastos de roedores *in vitro*, así como el hueso neoformado *in vivo* se reduce con la edad. Por otro lado, estos resultados deben ser determinados aún en humanos, aunque nos presentan una referencia orientativa (122).

La comprensión de la base celular de la interacción célula-biomaterial osteoblástica es crucial para el análisis del mecanismo de la osteointegración. La adhesión celular es un proceso complejo que depende de los tipos de células, la microtopografía superficie y la química del sustrato. Salido et al. (123) estudiaron el papel de la microtopografía en la modulación de la adhesión celular *in vitro* usando una línea celular de osteoblastos humanos para la evaluación de la organización del citoesqueleto de actina. A través de la aplicación de la combinación de microscopía confocal láser (CLSM) de reflexión y fluorescencia, se obtuvieron imágenes en dos o tres dimensiones del citoesqueleto. Sobre superficies lisas de titanio comercialmente puro (cpTi mecanizadas) se orientaron al azar células óseas predominantemente planas con una relación axial de 1:1, con fibras de estrés que se ejecutan en todas las direcciones y filopodios delgados. En superficies Osseotite® las células osteoblásticas se conformaron al terreno irregular de la superficie, con sitios de adhesión focal establecidos sólo en los picos topográficos relativos separados por una distancia mayor que en la superficie mecanizada, con una mayor expresión de fibras, formando grandes contactos en la superficie rugosa. La organización del citoesqueleto de las células cultivadas en las superficies Osseotite® apoya un papel activo de la superficie del biomaterial en los acontecimientos que rigen la adhesión celular osteoblástica. Los resultados refieren como la topografía de superficie afecta a la adhesión celular osteoblástica y proporcionan información valiosa para el diseño de superficies de materiales que se requieren para el desarrollo de una superficie osteogénica adecuada para el anclaje osteoblástico, siendo este anclaje y la organización del citoesqueleto mayor en superficies rugosas en comparación con las superficies mecanizadas, en el caso de los implantes dentales.

Como se ha propuesto en nuestro estudio, es importante saber, para un conocimiento más profundo de la función osteoblástica sobre los implantes dentales, la función mitocondrial de los mismos, puesto que un osteoblasto energético podrá

llevar mejor a cabo sus funciones de proliferación y crecimiento sobre superficies de implantes dentales. Con este fin, Salido et al. (124) en 2009 realizaron un estudio *in vitro* cultivando osteoblastos humanos normales sobre superficie de titanio Osseotite®. Para el estudio de mitocondrias, llevan a cabo tinción con JC-1 y obtención de imágenes mediante microscopia de fluorescencia. Observan mayor densidad de mitocondrias filamentosas sobre superficie Osseotite® en comparación con superficie maquinada. Las mitocondrias altamente energizadas se observan teñidas en rojo y acumuladas en las ramas filopodiales largas. La visualización simultánea mitocondrial y la formación de imágenes de retrodispersión de la superficie les permitió correlacionar la distribución mitocondrial con la microtopografía de sustrato irregular, lleno de picos y valles. En las células que crecieron en el disco cpTi (superficies mecanizadas), también aparecieron gran cantidad de mitocondrias altamente energizadas. No se observó agrupación o polarización significativa alrededor de las zonas de contacto. También se observó una red filamentosas de las mitocondrias polarizadas que rodeaba el núcleo. Por otro lado, en este mismo estudio se observó la organización del citoesqueleto de actina a través de la tinción del mismo mediante rodamina-faloidina. Las células cultivadas sobre discos cpTi de superficies mecanizadas adoptaron una morfología que parecía ser predominantemente plana orientada al azar con una relación axial media de 1:1. Por otro lado las células cultivadas en el grupo control no presentaban un patrón de crecimiento homogéneo, observándose una gran variabilidad en la organización del citoesqueleto.

Aunque en nuestro estudio encontramos mejor comportamiento con matices en el estudio de adhesión de los osteoblastos cultivados sobre superficie rugosa o tratada, es importante considerarlo; puesto que el citoesqueleto es un complejo sistema tridimensional de fibras proteicas que intervienen en movilidad y forma de la célula, así como en la adhesión. Un citoesqueleto de mayor extensión y mejor

organizado mejora la adhesión celular, como primer paso hacia la consecución de la osteointegración.

En estudios actuales en humanos no se han evaluado los acontecimientos biomoleculares que tienen lugar en las primeras etapas de la osteointegración que están relacionados con la osteointegración y la inmunomodulación. Con este objetivo Bryington et al. (125) presentaron un estudio en 2012 en el cual usan un modelo de implante dental explantado para evaluar la respuesta celular y molecular asociadas a la cicatrización primaria y osteoinducción de los mismos. Presentan la primera evaluación molecular de la cicatrización temprana y los eventos de la osteointegración en humanos mostrando pruebas de la respuesta molecular de las células adherentes sobre superficies de implantes dentales *in vivo*. Para evaluar los eventos de osteoinducción y procesos de señalización célula-célula en células adherentes, se realizó una comparación *in vivo* de implantes de titanio comercialmente puro (cpTi) con nanotopografía tratados con ácido fluorhídrico (grupo experimental) e implantes de óxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) con topografía a escala micrométrica tratados con chorro de arena (grupo control). Se colocaron seis implantes en diez sujetos sanos y fueron desinsertados por roscado inverso a uno, tres y siete días. Los perfiles de expresión génica de las células adherentes fueron estudiados mediante RT-PCR. En el primer día no se observó osteoinducción en ninguna de las superficies. A los tres días, se observó en el ARN de las células adherentes que los niveles de BMP-6, osteopontina, y osterix (OSX) eran elevados, tanto en las superficies micro- como nanotopográficas. A los siete días, ambas superficies presentaron expresión de genes que ayudan a la osteoconducción; sin embargo, se observó un aumento muy moderado de la mayoría de los ARNm y se midieron niveles significativamente más altos de ARNm para OSX para células adheridas a los implantes nanotopografía. Además, se observó un aumento en la expresión de quimioquinas y los perfiles de citoquinas incluyendo CXCL10, CXCL14, IL-9, IL-22, y TOLLIP en superficies nanotopográficas en

comparación con las superficies microtopográficas. Por tanto, los autores concluyen que las superficies con nanotografía generan una mayor inducción de genes relacionados con la osteoinducción en las fases más tempranas de la osteointegración.

Solá-Ruiz et al. (126) presentan un estudio cuyo objetivo es observar el comportamiento de osteoblastos cultivados *in vitro* sobre discos de titanio, en relación con su rugosidad y la aplicación de melatonina. Extraeremos a continuación los datos correspondientes al comportamiento sobre superficie rugosa, que de hecho es en lo que se centra nuestro estudio. Los discos utilizados fueron manufacturados por Biomet 3i® (Paterna, España) utilizando una aleación de titanio, aluminio y vanadio. Como hemos comentado anteriormente nos centramos en el grupo tratado mediante doble ataque ácido. Se llevó a cabo un análisis de la superficie de los discos previo a cultivo celular mediante microscopio óptico (Carl Zeiss, OPM Pico Dental, Alemania), microscopio electrónico de barrido (Jeol JSM 6300; Oxford Instruments Ltd. Abingdon, Reino Unido) y microscopio confocal (CLSM) (Lext PLS3100; Olympus Corporation, Tokio, Japón). Tras cultivo celular se procedió a estudiar la adhesión y proliferación celular. Para ello tras 24 y 72 horas del cultivo, los discos se lavaron con solución salina tamponada (PBS) tres veces, fijando posteriormente las células mediante glutaraldehído 2,5%. Tras cuatro lavados con PBS, las muestras fueron teñidas secuencialmente con hematoxilina-eosina, y posteriormente incubadas con DAPI, tras lo cual los discos fueron observados bajo microscopía de fluorescencia utilizando el filtro adecuado. Las imágenes se capturaron con lentes de 10x y 20x para hacer el recuento celular y estudio de su morfología (por la emisión fluorescente de la eosina). Se observó que la media de rugosidad en los discos tratados mediante doble ataque ácido fue de 0,277  $\mu\text{m}$  y en los discos maquinados de 0,114  $\mu\text{m}$ . Tras 24 horas del cultivo, los osteoblastos se adherían activamente a ambas superficies, aunque veremos que los osteoblastos se comportaban de forma diferente en una y otra. En la superficie rugosa las células crecían de forma aleatoria, mientras que en la superficie

lisa seguían un patrón lineal. En el estudio de adhesión celular tras 24 horas mediante microscopía de fluorescencia se observó un mejor comportamiento sobre superficie rugosa. En el estudio de proliferación llevado a cabo tras 72 horas se contabilizó 261,7 células por campo en superficie rugosa frente a 144, 5 células por campo en superficie maquinada, demostrando un mejor comportamiento de los osteoblastos sobre las mismas *in vitro*.

Como hemos visto hasta ahora tanto en los resultados de nuestro experimento como en la revisión de la literatura científica publicada hasta la fecha, las superficies rugosas o tratadas de implantes dentales de titanio han demostrado mayores tasas de osteointegración, en gran medida dada la mejor predisposición que presentan las células osteoblásticas a la adhesión y proliferación. En nuestro estudio hemos observado una mayor producción de BMP-2, indicándonos una mayor productividad ósea de los osteoblastos cultivados sobre superficies rugosas. En la misma línea, hemos encontrado mejores valores en movilidad y adhesión y estudio energético celular sobre estas superficies. Parece evidente una mayor probabilidad que en un ambiente contaminado como es el medio oral pueda aumentar la posibilidad de adhesión microbiana a estas superficies, lo cual puede dar a la larga problemas tales como recesión gingival, reabsorción ósea y pérdida final del implante. La periimplantitis avanza más rápidamente que la periodontitis y los mecanismos de reparación son más lentos, resultando en una ruptura de las fibras de colágeno y escasa reconstrucción ósea. En líneas generales, la adhesión bacteriana es similar en dientes y en implantes, podemos dividirla en tres etapas:

1. Las bacterias son transportadas hacia el sustrato a través de la saliva. Esta etapa sí diferiría claramente de la adhesión celular, por ejemplo osteoblástica.
2. Establecimiento de una interacción electrostática bacteria-sustrato y una interacción específica entre bacteria y ligando.

### 3. Agregación de diferentes tipos de bacterias.

El biofilm está formado por bacterias inmersas en una matriz extracelular que proporciona resistencia a los mecanismos de defensa del huésped y cualquier intento en contra de la bacteria. La interacción inicial entre las células microbianas y el sustrato está muy influenciada por las características fisicoquímicas de las superficie del implante. La rugosidad superficial es el factor principal que aumenta la colonización bacteriana dado que aumenta el área de superficie, protege a la bacteria y hace más estable la unión microbio/sustrato. La rugosidad de superficie demuestra ser especialmente importante sobre todo durante las etapas iniciales de la colonización bacteriana. La energía libre superficial es el segundo factor fisicoquímico que influencia la propagación bacteriana (127).

En la búsqueda de nuevos materiales para el uso en implantes dentales han surgido líneas de investigación que estudian el comportamiento de los osteoblastos sobre estos. Así Hofstetter et al. en 2013 (128) presentan un estudio enfocado a dilucidar los efectos de la estructura de las superficies metálicas en el comportamiento *in vitro* de las células derivadas del hueso humano. Para ello se recubrió superficies de titanio SLA con geometría idéntica con una capa de un metal determinado (en rango de tamaño nanométrico). De esta forma se observaría las capacidades de cada metal para aumentar la formación ósea. Con ese propósito se recubrió los discos de Ti/SLA con capas de distintos metales, titanio (Ti), circonio (Zr), tantalio (Ta), niobio (Nb), así como de oro (Au) y cromo (Cr). Por su superioridad en biocompatibilidad se utilizó al titanio como Control Positivo para investigar el comportamiento celular, por el contrario oro y cromo, los cuales han sido descritos como menos adecuados para el desarrollo celular, fueron utilizados como Control Negativo. Las células se sembraron en estas superficies con geometrías idénticas pero con diferentes superficies químicas metálicas sobre las que adherirse. Para evaluar la reacción celular a estas superficies se

determinó la proliferación, diferenciación y función de osteoblastos humanos primarios. Para los autores, el objetivo más importante en el desarrollo de implantes dentales u ortopédicos en este sentido es la aplicación de estrategias que permitan acelerar los procesos de osteointegración. Además de la aplicación de factores de crecimiento, los cuales representan una gran oportunidad de futuro al respecto, pero que aún presenta numerosas cuestiones sin resolver (tales como la concentración óptima de estos factores de crecimiento y vislumbrar su cinética). Con el objetivo de modificar o acelerar los acontecimientos que conllevan como resultado la osteointegración entra en juego la elección del metal, superficie de contacto, etc. En este estudio se observó que todos los metales utilizados eran biocompatibles y permitían la adhesión de los osteoblastos humanos primarios, así como su proliferación, diferenciación y función. No se encontraron diferencias significativas en el desarrollo celular de las muestras cultivadas sobre los distintos metales, aunque sí se encontró diferencia significativa en el estudio de diferenciación osteogénica. Las superficies en la que los osteoblastos presentan mejor comportamiento son en orden decreciente Ta > Nb > Zr > Cr > Ti > Au, aunque son necesarios más estudios para refrendar estos resultados. Un parámetro determinante para el establecimiento de la biocompatibilidad de un metal es su resistencia a la corrosión y la producción de productos reactivos que pueden provocar que las células generen nuevos antígenos que actúen contra esos alérgenos. Este estudio *in vitro* sugiere que metales como Ta o Nb presentan superficies más adecuadas para facilitar la osteointegración que las de Ti o Zr, aunque debemos tener en cuenta, y los propios autores lo recalcan así, que es un estudio *in vitro*.

El circonio y más particularmente los policristales de circonio tetragonal o TZP han sido estudiados y utilizados en Odontología, más particularmente en implantología dental y prótesis sobre implantes dentales, por sus propiedades mecánicas, biocompatibilidad y propiedades estéticas. Con respecto al conocimiento



del comportamiento de los osteoblastos sobre TZP existen muchas lagunas. Las superficies de TZP tratadas con ataque ácido han demostrado un aumento de la proliferación celular significativa durante los primeros días del cultivo pero sin una adhesión a superficie fuerte (129).

Kohal et al. (130) proponen tratar la superficie de circonio con el fin de promover la proliferación y adhesión en estas superficies; tratamientos tales como el arenado, ataque ácido, tecnología láser o nanotecnología. Este grupo de investigación lleva a cabo un estudio cuya finalidad es doble, por un lado evaluar el comportamiento de los osteoblastos hFOB 1,19 sobre superficie rugosa de circonio (Y-TZP) tratada con anodización electroquímica (TiUnite®, Nobel Biocare, Suecia) y por otro lado evaluar de la cicatrización endoósea de esta nueva superficie en un modelo animal estandarizado (fémur de rata). Para ello se llevó a cabo cultivo de osteoblastos humanos (línea hFOB 1,19, ATCC, LGC; Promochem, Wesel, Alemania) sobre:

- Superficie TiUnite®: Y-TZP tratada mediante anodización electroquímica.
- Superficie Ti-m: titanio maquinado.
- Superficie TZP-proc: tratada mediante arenado y ataque ácido.
- Superficie TZP-Am: circonio maquinado.

Se estudió la proliferación celular, la expresión de genes mediante RT-PCR y análisis histológico y biomecánico de implantes en miniatura colocados en fémur de rata. En los primeros siete días se constató una proliferación retardada de células cultivadas sobre superficies TiUnite®. Tras 28 días, la proliferación celular fue similar en todos los tipos de superficies. Entre los 14 y 28 días la media de contacto hueso-implante fue mayor en TiUnite®. A los 28 días el test biomecánico mostraba mejor comportamiento de TiUnite® sobre otras superficies. Los autores concluyen que el circonio es un material biocompatible que muestra una respuesta celular comparable al

del titanio, que aún es el material de elección para implantes dentales. En el ensayo *in vivo* las superficies de circonio tratadas muestran propiedades mecánicas menores a las del titanio.

Por otro lado, los hallazgos de respuesta celular sobre la topografía de superficie TZP han sido contradictorios. Para ello es muy necesario que se lleve a cabo la caracterización de superficie con el fin de diferenciar la influencia en los cambios de la morfología de superficie sobre la respuesta celular y de alguna forma tenerlo en cuenta independientemente del material que estudiemos. Ito et al. (131) presentan un estudio cuyo objetivo es evaluar la influencia de la topografía superficial en la adhesión, morfología, proliferación y diferenciación de células *osteoblast-like* sobre TZP mediante caracterización 2D y 3D de superficie. Para ello se compararon superficies lisas de TZP con tres tipos diferentes de superficies tratadas del mismo material con niveles diferentes de rugosidad, observándose que aunque no hubiera una diferencia clara en la adhesión inicial de los distintos grupos de estudio, la proliferación celular y la expresión de ALP en el grupo de superficie rugosa tratada mediante ataque mecánico con alúmina y ataque ácido con ácido fluorhídrico, fue simplemente mayor que en estos otros grupos. Con estos resultados, los autores concluyen que los tratamientos de superficie para la creación de micro y nanopropiedades en TZP son un método prometedor para aumentar la proliferación y diferenciación de osteoblastos, aunque son necesarios más estudios para determinar si es debido a los cambios topográficos o a los cambios fisicoquímicos resultantes del tratamiento de dichas superficies.

Tras el análisis de la bibliografía disponible para el estudio de superficie de implantes dentales observamos que independientemente de la elección del material, teniendo en cuenta que el *gold standard* sigue siendo el titanio, las superficies rugosas

presentan un mejor sustrato para el comportamiento de los osteoblastos y una consecuente mejor osteointegración de los implantes dentales.

Tal y como hemos visto hasta ahora revisando la literatura, tanto la química superficial (tipo de material elegido) como la topografía de los materiales seleccionados para la confección de implantes dentales son factores críticos para modular la respuesta inicial de las células óseas y consecuentemente afectar a la osteointegración. En este mismo contexto, se ha demostrado que el rol que juega la topografía superficial es muy importante, incrementando las funciones osteoblásticas en contacto con superficies rugosas. Como hemos comprobado en nuestro estudio, observando que los osteoblastos cultivados sobre superficie rugosa presentaban un mejor comportamiento tanto en productividad ósea, movilidad y adhesión a superficie. Además, las propiedades fisicoquímicas de superficie como la hidrofilia y la carga superficial tienen un impacto directo en la adsorción inicial de proteínas a la superficie. Estas propiedades median la adhesión celular y regulan la expresión de integrinas para las uniones de superficie. La superficie de los implantes dentales muestran propiedades hidrofílicas tales como una alta energía superficial que promueve un aumento de la diferenciación osteogénica y la integración de estos materiales con los tejidos duros. En este estudio nos hemos centrado en el comportamiento de los osteoblastos sobre superficies de titanio con o sin tratamiento de superficie. Por otro lado, revisando la literatura científica al respecto, hemos tratado de ofrecer una visión general de los estudios relacionados sobre comportamiento osteoblásticos sobre otro tipo de materiales (propiedades químicas) u otro tipo de superficie (propiedades fisicoquímicas). Para tener un conocimiento más completo, decidimos revisar otros métodos utilizados para aumentar la biocompatibilidad de la propia superficie implantaria más allá de tratamientos que vayan encaminados a crear micro o nanotopografías. En este sentido existen métodos como la modificación fotoquímica de superficies de dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) mediante irradiación con luz

ultravioleta (UV). La bioactivación inducida por UV está causada probablemente por la eliminación de los hidrocarburos adsorbidos y otras especies carbonosas de dióxido de titanio mediados por fotooxidación y/o por la producción de vacantes de oxígeno foto-inducidas de la superficie, dando como resultado una mayor reactividad de la superficie de titanio, traduciéndose en un aumento de la susceptibilidad para la adsorción disociativa de agua (132).

Ante el intento de lograr una osteointegración más rápida para poder acelerar el proceso general del tratamiento, el uso de agentes biomiméticos representa un campo de investigación en expansión en Odontología. En 2009 Ávila, Misch, Galindo y Wang (133) presentan un trabajo en el que recogen las cuatro categorías de agentes bioactivos que pueden aplicarse para cubrir la superficie de un implante de titanio y su respectiva importancia en las primeras etapas de la osteointegración:

- *Cerámicas biocompatibles*: la más utilizadas en Medicina y en Odontología son las sales de fosfato tricálcico, con variaciones en su composición química, estructura cristalina y formulación química. Es el componente inorgánico principal de los huesos. Así mismo, el fosfato cálcico es el biomaterial y sustitutivo óseo más utilizado en Medicina. Los principios biológicos que apoyan el uso de recubrimientos de cerámicas biocompatibles o biomiméticas con fines terapéuticos han sido ampliamente investigados. La hidroxiapatita (HA) fue la primera modificación de superficie utilizada (inicialmente usada para el uso en prótesis de cadera). Como hemos visto anteriormente, el uso de HA favorece la osteointegración en las etapas tempranas, no siendo así en las más tardías. El valor clínico de estos materiales deriva en parte por la biocompatibilidad y bioactividad cuando son aplicados sobre hueso vivo.

- *Proteínas bioactivas*: este grupo lo conforman las proteínas morfogenéticas humanas (BMP) y los factores de crecimiento. La opción de inmovilizar las BMPs a las superficies de titanio ha abierto una nueva puerta hacia sus aplicaciones clínicas. Hasta la fecha se han identificado varios tipos, aunque las más utilizadas en terapias de implantes dentales son la BMP-2 y BMP-7. Para un uso clínico adecuado de estas proteínas, la barrera de BMPs debe ser dimensionalmente estable y capaz de resistir las fuerzas de compresión si están situadas en zonas de hueso supraalveolar. Así mismo, las propiedades de estas moléculas no deben verse alteradas en los procesos de adición. Los autores refieren que las características y propiedades de los implantes tratados con rhBMP-2 pueden influenciar claramente las capacidades de esta proteína como agente biomimético. Las ventajas que presenta el uso de estas proteínas en implantología dental son: pueden ser utilizadas sobre cualquier tipo de material, incluso sobre polímeros en condiciones de temperatura y pH fisiológicas; la molécula conserva sus propiedades hasta su uso terapéutico, con pequeñas dosis se observa una gran cantidad de osteogénesis periimplantaria.

Dentro de los factores de crecimiento los autores engloban a las citoquinas, plasma rico en plaquetas (PRP), colágeno tipo I, péptido RGD; como agentes bioactivos potenciales.

- *Iones*: para aumentar la biocompatibilidad del titanio, se han identificado algunos estudios en los cuales, con el fin de mejorar la biocompatibilidad del titanio, se ha utilizado una modificación química que une ciertos elementos esenciales (por ejemplo, flúor) del hueso con la superficie del implante con el fin de promover la osteogénesis. De hecho, existen ya disponibles para uso clínico implantes de titanio con flúor como agente biomimético (OsseoSpeed®, AstraTech®, Mölndal, Suecia) cuyo mecanismo de acción se basa en, primero, formación de fluorapatita, a continuación, promoción de proliferación de osteoblastos y estimulación de actividad

de la fosfatasa alcalina. El flúor pertenece a la familia de los halógenos, es el miembro con el número y peso atómico más bajo. En soluciones acuosas aparece en la forma de ion fluoruro, altamente reactivo con capacidad considerable para formar compuestos muy estables con otros elementos. Estas propiedades permiten que el fluoruro pueda interactuar con la HA presente en el tejido óseo y dar lugar a la fluorapatita o HA fluorada, que presenta una mejor cristalinidad y menor velocidad de disolución en comparación con la HA. Por lo tanto, se observa una unión estrecha entre el hueso y el implante.

- *Polímeros (chitosán)*: el chitosán es un polisacárido de origen natural formado por copolímeros de N-acetil-glucosamina. Es obtenido a partir de la diacetilación del chitin, el segundo polímero orgánico marino más abundante en la naturaleza. Tiene numerosos grupos amino unidos a la cadena principal que le permiten reaccionar químicamente con ambientes aniónicos. Las propiedades químicas y estructurales beneficiosas del chitosán han impulsado propuestas para varias aplicaciones terapéuticas (por ejemplo, como agente hemostático). También se ha desarrollado un implante dental recubierto, que se ha estudiado en modelo animal. Se han observado resultados notables en regeneración.

En este mismo artículo se evalúan las características ideales que retienen los agentes biomiméticos y los factores que podrían influenciar en su eficacia. Los autores incluyen la textura de la superficie del implante, vehículos de entrega orientados hacia el tiempo y la capacidad del agente de alcanzar la meta. Algunos de estos agentes, tales como las biocerámicas (sales de fosfato de calcio) o iones (flúor) ya están disponibles comercialmente y han demostrado ser clínicamente exitosos. Otros, tales como las BMPs, son muy prometedores, con un excelente potencial terapéutico. Un recubrimiento específico de la superficie del implante podría mejorar el porcentaje del contacto entre el hueso y el implante así como acelerar la osteointegración que permite

a los clínicos superar muchos escenarios complicados, aunque aún hace falta mucha investigación con datos concluyentes que den una base científica a su uso terapéutico.

Anteriormente a este artículo de revisión de Ávila et al. y ante el auge de las superficies bioactivas, Letić-Gavrilović et al. (134), en 2000, presentaron un artículo en el que revisaron el potencial genético de las células osteoprogenitoras para reconocer y responder a los distintos biomateriales. En el mismo presentan una tabla de clasificación de los biomateriales utilizados en implantología según el tipo de contacto que establecían con el huésped y el tipo de osteogénesis (Tabla 5.3., Figura 5.1.).

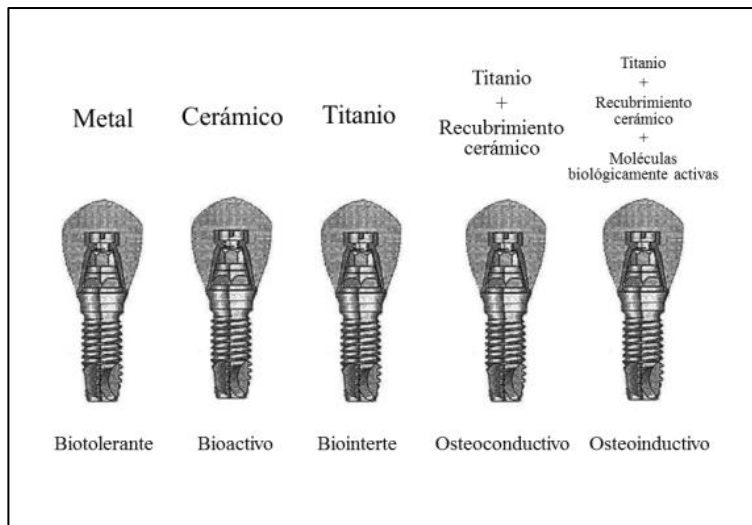


Figura 5.1. Crónica del desarrollo de los implantes con efectos directos sobre hueso. Desde la tolerancia pasiva entre implante y hueso hasta la creación de superficies bioactivas (134).

CATEGORÍA	TIPO DE CONTACTO	TIPO DE OSTEOGÉNESIS
<b>1. Biotolerante</b> (Co, Cr, Mo, Au, polímeros)	Cápsula de tejido conectivo	Distante
<b>2. Bioinerte</b> (Ti, Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , Ta, cerámicas)	Contacto directo entre hueso e implante	Contacto directo
<b>3. Bioactivos</b> (HA, fosfato cálcicos, biocerámicas, biocristales, coral)	Unión química entre hueso e implante	Osteogénesis
<b>4. Bioinerte osteoconductor</b> (ej; aleaciones de titanio con recubrimientos)	Unión físico-química entre hueso e implante	Osteogénesis

Tabla 5.3. Biomateriales utilizados en implantología según el tipo de contacto que establecían con el huésped y el tipo de osteogénesis (134).

Como puede parecer obvio y ante el resultado de los estudios revisados los cambios provocados sobre las superficies de los materiales a implantar provocan un aumento de la biocompatibilidad y osteointegración, hechos o propiedades que son indispensables para la implantación a largo plazo en el cuerpo humano. En la revisión de Letić-Gavrilović et al., la interfase hueso implante fue interpretada y evaluada en base a cultivos de osteoblastos, por ejemplo, en el potencial genético de los osteoblastos a expresar diferentes marcadores fenotípicos según el tipo de biomaterial utilizado. Así se observó que el titanio y el fosfato cálcico eran los materiales de sustancias sintéticas que mejores propiedades presentaban para implantaciones en tejidos duros. No obstante, proporcionan una matriz física adecuada para la aposición de hueso nuevo que es capaz de guiar tanto el crecimiento como la extensión del nuevo hueso formado. Comparando las superficies de titanio con las superficies de sistemas cerámicos, estas primeras presentan mayor aposición ósea, aunque las



investigaciones que comparan superficies de titanio de diferentes aleaciones y superficies bioactivas presentan resultados extremadamente diversos. Las distintas casas comerciales han creado un amplio rango de recubrimientos inorgánicos o cerámicos sobre superficies de titanio con el fin de promover una mejor cicatrización y osteoconducción.

El titanio, como material, presenta unas propiedades mecánicas y fisicoquímicas únicas, y actualmente gracias a los tratamientos de superficie se han incrementado las propiedades que siguen manteniéndolo como *gold standard* en términos de osteointegración.

Como hemos visto hasta ahora, existe una gran cantidad de literatura científica en el campo del diseño de implantes dentales y modificaciones de superficie. Observando la investigación sobre superficies de implantes dentales Coelho et al. (135) constatan una falta importante de guías racionales y claras para los clínicos del uso de diseños de superficies de implantes dado que no existen criterios unificados para relacionar estudios *in vivo*, *in vitro*, ensayos clínicos, etc. Esto has sido constatado por nosotros mismos al llevar a cabo la revisión para la documentación de la presente tesis. Por ello, es aún si cabe más importante conocer y estar al día de las diferentes metodologías y técnicas con el fin de comprender los estudios publicados para de poder llegar a aplicar en la práctica clínica los conocimientos adquiridos.

En palabras de David Sackett (136), “la Medicina Basada en la Evidencia es la utilización consciente, explícita y juiciosa de la mejor evidencia clínica disponible para tomar decisiones sobre el cuidado de los pacientes individuales”.

Aplicándolo a la Odontología, la Odontología Basada en la Evidencia pretende aportar más ciencia al arte de la Odontología, siendo su objetivo disponer de

la mejor información científica disponible (la evidencia) para aplicarla en la práctica clínica.

En los distintos niveles de evidencia, desde el inicio de su uso los implantes Osseotite® han demostrado tasas de éxito elevadas (ejemplos recogidos en la Tabla 5.4.), y un buen comportamiento clínico (137-144).

AUTORES	TIPO DE ESTUDIO	Nº PACIENTES/ Nº IMPLANTES Osseotite®	TIEMPO DE SEGUIMIENTO	CONCLUSIONES
Lazzara et al. (137)	Estudio prospectivo multicéntrico	155 pacientes / 429 implantes (cargados 2 meses aproximadamente después de insertar)	12,6 meses	Estudio preliminar sin conclusiones fiables.
Davarpanah et al.(138)	Evaluación multicéntrica a 3 años	199 implantes (maxilar) / 222 implantes (mandíbula) / 16 fallos de integración	18 meses	Tasa de éxito de 95,3%
Sullivan et al. (139)	Estudio prospectivo multicéntrico	75 pacientes / 147 implantes	6 años	Tasa de éxito de 96,6%
Testori et al. (140)	Estudio prospectivo multicéntrico	15 pacientes/ 103 implantes	12 – 24 meses	Tasa de éxito de 95,3%
Schoropp et al. (141)	Estudio prospectivo, controlado, aleatorizado	47 pacientes/ 46 implantes (23 tras 10 postextracción/ 23 tras 3 meses postextracción)	24 meses	Tasa de éxito de 91% en grupo implantes 10 postextracción. Tasa de éxito de 96% en grupo implantes 3 meses postextracción.
Garlini et al. (142)	Estudio clínico retrospectivo	244 pacientes/ 555 implantes	5 años	Tasa de éxito de 98.5%
Drago et al. (143)	Estudio prospectivo observacional	27 pacientes / 51 implantes	18 meses	Tasa de éxito de 97.9%
Browaeyts et al. (144)	Estudio clínico retrospectivo	83 pacientes/ 749 implantes (que recibieron carga inmediata)	7 años	Tasa de éxito de 92%

Tabla 5.4. Tasas de éxito de implantes con superficie Osseotite® en estudios clínicos.

Menicucci et al. (145) presentaron un estudio prospectivo, aleatorizado, a doble ciego en el que evaluaron el proceso de formación de hueso alrededor de implantes insertados simultáneamente con hueso bovino inorgánico (ABB) en elevación de seno maxilar. Se incluyeron siete pacientes siguiendo los siguientes criterios de inclusión: brecha edéntula de menos de dos dientes, altura alveolar de al menos 5 mm (evaluado en ortopantomografía), no existencia de historia de radioterapia en cabeza y cuello, diabetes mellitus o desordenes inmunitarios y de coagulación, y pacientes no fumadores. Para el estudio se colocaron miniimplantes experimentales de 2,18x10 mm con superficies Osseotite® y Nanotite®, lo cuales fueron insertados en la misma intervención quirúrgica de elevación de seno maxilar mediante abordaje a través de ventana lateral. A los doce meses se retiraron las 18 muestras y se llevó a cabo el análisis histomorfométrico, microscopía de luz circular polarizada (CPLM), SEM-EDX y evaluación de rugosidad de superficie. Se observó que la superficie Nanotite® presenta mejores propiedades sobre hueso nativo, en términos de BIC que la superficie Osseotite®, aunque no hay diferencia estadísticamente significativa en el comportamiento en hueso injertado, tras un periodo de cicatrización de 12 meses.

En 2004, Kokubo et al. (146) describen un tratamiento de bioactivación del titanio para promover la precipitación de apatita. Basan el propósito de su estudio en incrementar las propiedades de superficie del titanio y sus aleaciones, como material de alta resistencia a la fractura en comparación con las cerámicas bioactivas, sobre todo para zonas que vayan a soportar una carga elevada. El titanio y sus aleaciones forman una capa de titanato sódico cuando son sumergidos en una solución 5M – NaOH a 60°C durante 24 horas, seguido por un tratamiento a alta temperatura, 600°C, durante una hora. Gradualmente, se va formando hacia el interior del metal puro una capa de titanato sódico de 1 µm de grosor. La resistencia mecánica del titanio y sus aleaciones no se ve afectada negativamente ni por el tratamiento químico ni térmico.

A causa de esta combinación de tratamientos se liberan iones  $\text{Na}^+$  provenientes de la superficie de titanio hacia el fluido corporal que circunda, por medio de una reacción de intercambio iónico con iones  $\text{H}_3\text{O}^+$ , resultando en muchos grupos  $\text{TiOH}$  formados en la superficie. Inicialmente, estos grupos  $\text{TiOH}$  combinan con iones  $\text{Ca}^+$  para formar titanato cálcico amorfo y posteriormente el titanato cálcico combina con iones fosfato para formar fosfato cálcico amorfo, el cual se transformará en apatita *bone-like*. Por medio de este proceso el titanio se une al hueso circundante a través de esta capa de apatita *bone-like*.

Con el fin de evaluar el potencial de regeneración ósea de nuevas superficies osteoconductoras a corto plazo, el grupo de Gil-Mur et al. (147) presenta un estudio en el cual colocan 320 implantes de titanio grado 3 con distintos tratamientos de superficie en *minipigs*.

1. Titanio maquinado (*Ctr*).
2. Titanio tratado con grabado ácido (*AETch*).
3. Titanio tratado con chorreado de partículas de alúmina (*GBlast*).
4. Titanio tratado mediante técnica de Kokubo (*2step*) (146).

La principal relevancia clínica de este estudio, según los autores, es presentarlo como primer paso en dirección a reducir el tiempo entre la colocación del implante dental en el lecho óseo preparado para albergarlo y su carga funcional. Se evalúa el BIC a los tres días y a la primera, segunda y tercera semana tras la colocación mediante análisis histomorfogénico. Así mismo se analiza la composición, topografía y humectabilidad de la superficie de los implantes mediante SEM y CLSM. Se observa que las superficies tratadas mediante técnica de Kokubo presentan una osteointegración más acelerada y la proponen como candidata para aplicaciones en terapias de carga inmediata.

La evolución de las superficies de implantes dentales parece estar encaminada hacia la consecución de superficies bioactivas con las que se pueda aumentar el grado de osteointegración, reducir tiempos en protocolos de carga funcional y mayor estabilidad a largo plazo de los tratamientos con implantes dentales. Para ello existen, como hemos visto anteriormente, tratamientos que alteran la microtopografía y las características químicas de las mismas. Más recientemente se han presentado superficies en las cuales se ha inmovilizado moléculas, o incluso partes de moléculas, que contribuyen a este propósito. Como por ejemplo la unión de lactoferrina como péptido antimicrobiano (148) o la unión de peptidomiméticos basados en el motivo RGD con selectividad a integrinas (149).

Como hemos observado en este estudio y queda refrendado en la literatura utilizada la topografía de la superficie de implantes dentales juega un papel principal en la osteointegración de los mismos. Dado lo cual las nuevas líneas de investigación están encaminadas a la consecución de superficies con una mayor biocompatibilidad y bioactividad (superficies nanométricas, superficies bioactivas, etc.) aunque presentan buenos resultados preliminares son necesarios más estudios que ofrezcan datos concluyentes.

# CONCLUSIONES

## 6. Conclusiones.

1. Obtenemos menor grado de apoptosis celular en osteoblastos (NHOST) cultivados sobre discos de superficie rugosa, tratada mediante doble ataque ácido (Osseotite®, Biomet 3i, Palm Beach Garden, Florida, USA) y lisa o maquinada. Conclusión referida al objetivo específico 1.
2. Las imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia para el estudio de la movilidad y adhesión de los osteoblastos sobre superficies de titanio mediante tinción con rodamina-faloidina, nos muestran citoesqueletos de mayor dimensión y mejor organización en osteoblastos (NHOST) cultivados sobre discos de superficie rugosa, tratada mediante doble ataque ácido (Osseotite®, Biomet 3i, Palm Beach Garden, Florida, USA) y lisa o maquinada. Conclusión referida al objetivo específico 2.
3. Los osteoblastos (NHOST) cultivados sobre discos de superficie rugosa, tratada mediante doble ataque ácido (Osseotite®, Biomet 3i, Palm Beach Garden, Florida, USA) presentan mitocondrias más activas, mostrando un estado energético celular más activo que aquellos osteoblastos (NHOST) cultivados sobre discos de superficie lisa o maquinada. Conclusión referida al objetivo específico 3.
4. El estudio de la productividad ósea tomando como referencia la producción de BMP-2, muestra mayor % de producción de la misma en osteoblasto (NHOST) cultivados sobre superficies de titanio rugosa, tratada mediante doble ataque ácido (Osseotite®, Biomet 3i, Palm Beach Garden, Florida,

USA) que aquellos cultivados sobre discos de superficie lisa o maquinada.  
Conclusión referida al objetivo específico 4.

5. Tras el análisis de los datos recogidos en el experimento, hemos comprobado un mejor comportamiento de los osteoblastos (NHOST) sobre superficie rugosa, tratada mediante doble ataque ácido (Osseotite®, Biomet 3i, Palm Beach Garden, Florida, USA) que sobre superficie lisa o maquinada.  
Conclusión referida al objetivo general.



# **BIBLIOGRAFÍA**

---

## 7. Bibliografía.

- 1.** Baron. Anatomy and biology of the bone matrix and cellular elements. Chapter 1. General principles of bone biology. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 5<sup>th</sup> Ed. Washington, DC: American society for bone and mineral research; 2003. Pp 1-8.
- 2.** Robey PG, Boskey AI. Anatomy and biology of bone matrix and cellular elements. Chapter 6. Extracellular matrix and biomineralization of bone. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, 5<sup>th</sup> Ed. Washington, DC: American society for bone and mineral research; 2003. Pp 38-46.
- 3.** Tohemé JF, Seibel MJ, Silverberg SJ, Robins SP, Bilezikian JP. Biochemical markers of bone metabolism. *Rheumatol.* 1991;50:133-141.
- 4.** Gundberg CM, Clough ME. The osteocalcin propeptide is not secreted in vivo or in vitro. *J Bone Miner Res.* 1992;7:73-80.
- 5.** Garnero P, Grimaux M, Seguin P, Delmas PD. Characterization of immunoreactive forms of human osteocalcin generated in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res.* 1994;9:255-264.
- 6.** Simoes R, Carolina C, Verna C, Teixeira R. Cellular and molecular aspects of bone remodeling. *Femina.* 2006;35:279-283.
- 7.** Fernandez-Tresguerres-Hernandez I, Alobera Gracias MA, del Canto Pingarron M, Blanco Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006;11:E47-51.

- 8.** Knight MN, Hankenson KD. Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013;2:306-316.
- 9.** Aubin JE, Liu F. The osteoblasts lineage. En: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. *Principles of Bone Biology*. San Diego, California: Academic Press; 1996. Pp 51-67.
- 10.** De Souza Nunes LS, De Oliveira RV, Holgado LA, Nary Filho H, Ribeiro DA, Matsumoto MA. Immunoexpression of Cbfa-1/Runx2 and VEGF in sinus lift procedures using bone substitutes in rabbits. *Clin Oral Implants Res*. 2010;21:584-590.
- 11.** Boyce BF. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. *J Dent Res*. 2013;92:860-867.
- 12.** Dallas SL, Bonewald LF. Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1192:437-443.
- 13.** Rutishauser E, Majno G. Physiopathology of bone tissue; the osteocytes and fundamental substance. *Bull Hosp Joint Dis*. 1951;12:469-490.
- 14.** Divieti Pajevic P. Recent Progress in Osteocyte Research. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2013;28:255-261.
- 15.** Tortora GJ, Grabowski SR. *Principios de anatomía y fisiología*, 7ª Ed. México: Oxford University Press Mexico; 2002. Pp 166.
- 16.** Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr rev*. 2003;24:218-235.
- 17.** Schmit A, Hall MN. Signalin to the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1998;14:305-338.
- 18.** Strelkov S, Herrmann H, Geisler N, Wedig T, Zimbelmann R. Conserved segments 1A and 2B of the intermediate filament dimmer: their atomic

- structures and role in filament assembly. *The EMBO Journal*. 2002;21:1255-1266.
- 19.** Sørensen MS, Jørgensen MB, Bretlau P. Distribution of bone remodeling units in the otic capsule of the rabbit. A semiquantitative morphometric study. *Acta Otolaryngol*. 1992;112:462-469.
- 20.** Lind M, Deleuran B, Thestrup-Pedersen K, Soballe K, Eriksen EF, Bunger C. Chemotaxis of human osteoblasts. Effects of osteotropic growth factors. *APMIS*. 1995;103:140-146.
- 21.** Mundy G. R., Chen D., Oyajobi D. O. Bone remodelling. En: Favus M. J. ed. *Primer on the bone diseases and disorders of mineral metabolism*, 5<sup>a</sup> Ed. Washington. American Society for Bone and Mineral Research; 2003. Pp 46-58.
- 22.** Lanyon L, Skerry T. Postmenopausal osteoporosis as a failure of bone's adaptation to functional loading: a hypothesis. *J Bone Miner Res*. 2001;16:1937-1947.
- 23.** Erlich PJ, Lanyon LE. Mechanical strain and bone cell function: a review. *Osteoporos Int*. 2002;13:688-700.
- 24.** Kovacs CS. Bone development and mineral homeostasis in the fetus and neonate: roles of the calciotropic and phosphotropic hormones. *Physiol Rev*. 2014;94:1143-1218.
- 25.** Frost HM. The mechanostat. A proposed pathogenetic mechanism of osteoporoses and the bone mass effects of mechanical and nonmechanical agents. *Bone Miner*. 1987;2:73-85.
- 26.** Neyro Bilbao JL, Cano Sánchez A, Palacios Gil-Antuñano S. Regulación del metabolismo óseo a través del sistema RANK-RANKL-OPG *Rev Osteoporos Metab Miner*. 2011;2:105-112.

- 
- 27.** Kostenuik PJ. Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength. *Curr Opin Pharmacol.* 2005;5:618-625.
- 28.** Muñoz-Torres M, de la Higuera López-Frías M, Fernández García D. Advances in osteochlast biology: the osteoprotegerin-RANK ligand system. *Med Clin (Barc).* 2004;122:75-77.
- 29.** Parr G, Gardner F, Thot L. Titanium: mystery metal of implant dentistry. Dental materials aspects. *J Prosthet Dent.* 1985;54:120-138.
- 30.** Brånemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. *Tissue-Integrated Prosthesis: Osseointegration in Clinical Dentistry.* Chicago: Quintessence, 1985. Pp 88-98.
- 31.** Hobo S, Ichida E, García LT. *Osseointegration and occlusal rehabilitation.* Chicago: Ed. Quintessence; 1991. Pp 33-56.
- 32.** Weiss C. *Oral Implantology.* Barcelona: Doyma C.A.; 1986. Pp 467-487.
- 33.** Oh TJ, Yoon J, Misch CE, Wang HL. The causes of early implant bone loss: Myth or science. *J Periodontol.* 2002;73:322-333.
- 34.** Linkevicius T, Apse P, Pros D, Med H. Influence of abutment material on stability of peri-implant tissues: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2008;23:449-456.
- 35.** Bascones, A., Fernández, E., Maddalena, L. *Odontología Restauradora Contemporánea. Implantes y Estética.* Madrid: Ediciones Avance; 2002. Pp 12-32.
- 36.** Wetzel A, Vlassis J, Caffesse R, Hammerle Ch, Lang N. *Attempts to Obtain Reosseointegration.* Chicago: Smith-Kline Beecham Editions; 1999.

- 
- 37.** Kawahara H. *Implantology and biomaterials in stomatology: proceedings of 1980 IIBS and The 9th JSID Meeting*. Tokyo: edited by H. Kawahara, Japan Society for Biomaterials; 1980.
- 38.** Myshin HL, Wiens JP. Factors affecting soft tissue around dental implants: A review of the literature. *J Prosthet Dent*. 2005;94:440-444.
- 39.** Puleo DA, Thomas MV Implant surfaces. *Dent Clin North Am*. 2006;50:323-338.
- 40.** Branemark PI, Hansson BO, Adell R, et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1977;16Suppl:1-132.
- 41.** Pappalardo S, Baglio OA, Cappello V, Mortellaro C, Grassi FR. Implant surface and osseointegration. *Minerva Stomatol*. 2005;54:661-673.
- 42.** Wennerberg A, Albrektsson T. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2010;25:63-74.
- 43.** Brunski J. Biomechanics of Dental Implants. En: Block M, Kent JN, Guerra LR. *Implants in Dentistry*. Chapter 7, part 2. W. B. Saunders Company. Philadelphia; 1997. Pp 63-71.
- 44.** Wennerberg A, Albrektsson T. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000;15:331-344.
- 45.** Hansson S, Norton M. The relation between surface roughness and interfacial shear strength for bone-anchored implants. A mathematical model. *J Biomech*. 1999;32:829-836.
- 46.** Jokstad A. Oral implants--the future. *Aust Dent J*. 2008;5(Suppl)1:S89-93.

- 
- 47.** Le Guehennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater.* 2007;23:844–854.
- 48.** Pattanaik B, Pawar S, Pattanaik S Biocompatible implant surface treatments. *Indian J Dent Res.* 2012;23:398-406.
- 49.** Louropoulou A, Slot DE, Van der Weijden FA. Titanium surface alterations following the use of different mechanical instruments: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23:643-658.
- 50.** Lubin J, Hernandez MA, Drukteinis SE, Parker WB, Murray PE. Effectiveness of disinfection therapies and promotion of osteoblast growth on Osseotite® and Nanotite® implant surfaces. *Implant Dent.* 2014;23:426-433.
- 51.** Puleo DA, Kissling RA, Sheu MS. A technique to immobilize bioactive proteins, including bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), on titanium alloy. *Biomaterials.* 2002;23:2079-2087.
- 52.** Seol YJ, Park YJ, Lee SC, Kim KH, Lee JY, Kim TI, Lee YM, Ku Y, Rhyu IC, Han SB, Chung CP. Enhanced osteogenic promotion around dental implants with synthetic binding motif mimicking bone morphogenetic protein (BMP)-2. *J Biomed Mater Res A.* 2006;7:599-607.
- 53.** Horasawa N, Yamashita T, Uehara S, Udagawa N. High-performance scaffolds on titanium surfaces: Osteoblast differentiation and mineralization promoted by a globular fibrinogen layer through cell-autonomous BMP signaling. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015;46:86-96.
- 54.** Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone anchorage in man. *Acta Orthopaedica Scand.* 1981;52:155-170.

- 
- 55.** Zarb GA, Albrektsson T. Osseointegration: a requiem for the periodontal ligament? *Int J Periodont Rest Dent.* 1991;11:88-91.
- 56.** Listgarten MA, Lang NP, Schroeder HE, Schroeder A. Periodontal tissues and their counterparts around endosseous implants. *Clin Oral Implants Res.* 1991;2:1-19.
- 57.** Watari F, Yokoyama A, Omori M, Hirai T, Kondo H, Uo M, Kawasaki T. Biocompatibility of materials and development to functionally graded implant for biomedical application. *Composites Science and Technology.* 2004;64:893-908.
- 58.** Matsuno H, Yokoyama A, Watari F, Uo M, Kawasaki T. Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium. *Biomaterials.* 2001;22:1253-1262.
- 59.** Ellingsen J, Thomsen P, Lyngstadaas P. Advances in dental implant materials and tissue regeneration. *Periodontology 2000.* 2006;41:136-156.
- 60.** Teng FY, Ko CL, Kuo HN, Hu JJ, Lin JH, Lou CW, Hung CC, Wang YL, Cheng CY, Chen WC. A comparison of epithelial cells, fibroblasts, and osteoblasts in dental implant titanium topographies. *Bioinorg Chem Appl.* 2012;2012:9 pages
- 61.** Cooper IF. Biologic determinants of bone formation for osseointegration. Clues for future clinical improvements. *J Prosth Dent.* 1998;80:439-449.
- 62.** Bagambisa FB, Kappert HF, Schilli W. Cellular and molecular biological events at the implant interface. *J Craniomaxillofac Surg.* 1994;22:12-17.
- 63.** Zoldos J, Kent JN. Chapter 4. Healing of endosseous implants. In: *Endosseous implants for maxillofacial reconstruction.* Ed by Michael Block and John Kent, Philadelphia: WB Saunders Co.; 1995. Pp 40-51.



- 
- 64.** Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14:251-262.
- 65.** 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;15:381-392.
- 66.** Monjo M, Ramis JM, Rønold HJ, Taxt-Lamolle SF, Ellingsen JE, Lyngstadaas SP. Correlation between molecular signals and bone bonding to titanium implants. *Clin Oral Impl Res.* 2013;24:1035–1043.
- 67.** William DL, Marks V. *Biochemistry in clinical practice.* London: Heineman Medical books; 1983.
- 68.** Kasemo B, Lausmaa J. Chapter 4. Metal selection and surface characteristics. In *tissue integrated prostheses. Osseointegration in clinical dentistry.* Edited by Branemark, Zarb, Alberktsson. Chicago: Quintessence; 1985. Pp 99-107.
- 69.** Thalji G, Cooper LF. Molecular assessment of osseointegration in vitro: a review of current literature. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2014;29:e171-199.
- 70.** Thalji G, Cooper LF. Molecular assessment of osseointegration in vivo: a review of the current literature. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013;28:e521-534.
- 71.** Nishimura I. Genetic networks in osseointegration. *J Dent Res.* 2013;92(12 Suppl):109S-18S.
- 72.** Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, McCarthy TL. Transforming growth factor-beta gene family members and bone. *Endocr Rev.* 1994;15:27-39.
- 73.** Kim M, Choe S. BMPs and their clinical potentials. *BMB reports.* 2011;44:619-634.

- 
- 74.** Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965;150:893-899.
- 75.** Wozney JM1, Rosen V, Celeste AJ, Mitscock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*. 1988;242:1528-1534.
- 76.** Sykaras N, Opperman LA. Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? *Journal of Oral Science*. 2003;45:57-73.
- 77.** Hollinger JO, Buck, Bruder SP. Biology of bone healing: Its impact on clinical therapy. In: Lynch SE, Genco JC, Marx RE (editors) *Tissue engineering. Applications in maxillofacial surgery and periodontics*. Carol Stream, Il, USA: Quintessence Publishing co, Inc; 1999. Pp 17-44.
- 78.** Valdes MA, Thakur NA, Namdari S, Ciombor DM, Plumbo M. Recombinant bone morphogenic protein-2 in orthopaedic surgery: a review. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2009;129:1651-1657.
- 79.** BMP2 bone morphogenetic protein 2 [Homo sapiens (human)] [Intenet]. National center of biotechnology information (NCBI) [updated on 2015 Mar 1]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/650>.
- 80.** Rutherford RB, Sampath TK, Rueger Dc, Taylor TD. Use of bovine osteogenic protein to promote reapid osseointegration of endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1992;7:297-301.
- 81.** Sigurdsson TJ, Fu E, Takakis DN, Rohner M, Wikesjo EME. Bone morphogenic protein-2 for perimplant bone regeneration and osseointegration. *Clin Oral Implants Res*. 1997;8:367-374.
- 82.** Sykaras N, Triplett RG, Nunn ME, Iacopino AM, Opperman LA. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on bone regeneration and osseointegration of dental implants. *Clin Oral Impl Res*. 2001;12:339-349.

- 
- 83.** Jung RE, Glauser R, Schärer P, Hämmerle CHF, Sailer HF, Weber FE. Effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans. A randomized controlled clinical and histomorphogenic study. *Clin Oral Impl Res.* 2003;14:556-568.
- 84.** Boyne PJ, Lilly LC, Marx RE, Moy Pk, Nevins M, Spagnoli DB, Triplett G. De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63:1693-1707.
- 85.** Fiorellini J, Howell TH, Cochran D, Malmquist J, Lilly LC, Spagnoli D, Toljanic J, Jones A, Nvins M. Randomizad study evaluating recombinant human bone bone morphogenetic protein-2 for extraction socket augmentation. *J Periodotol.* 2005;76:605-613.
- 86.** Jung RE, Windisch SI, Eggenschwiler AM, Thoma DS, Weber FE, Hämmerle CHF. A randomized-controlled clinical trial evaluating clinical and radiological outcomes after 3 and 5 years of dental implants poaced in bone regenerated by means of GBR techniques with or without the addition of BMP-2. *Clin Oral Impl Res.* 2009;20:660-666.
- 87.** De Freitas RM, Spin-Neto R, Junior EM, Pereira LA, Wikesjö UM, Susin C. Alveolar Ridge and Maxillary Sinus Augmentation Using rhBMP-2: A Systematic Review. *Clin Implant Dent Res.* 2013;17 [Epub ahead of print]
- 88.** Kao DWK, Kubota A, Nevins M, Fiorellini JP. The negative effect of combining rhBMP-2 and Bio-oss® on bone formation for maxillary sinus augmentation. *Int J Period Res Dent.* 2012;32:61-67.
- 89.** Peck WA, Birge, S.I, Fedak SA. Bone cells: biochemical and biological studies after enzymatic isolation. *Science.* 1964; 146:1476-7.
- 90.** Mills BG, Singer FR, Weiner LP, Holst PA. Long-term culture of cells from bone affected by Paget´s disease. *Calcif Tissue Int.* 1979;29:79-87.

- 
- 91.** Robey PG, Termine JD. Human bone cells in vitro. *Calcif Tissue Int.* 1985;37:453-460.
- 92.** Robey PG. Collagenase-treated trabecular bone fragments: a reproducible source of cells in the osteoblastic lineage. *Calcif Tissue Int.* 1995;56 Suppl 1:S11-12.
- 93.** Lodish H. *Biología celular y molecular.* Madrid: Médica Panamericana Eds.; 2006. Pp 513-634.
- 94.** Lehninger D, Michael N, Cox M. *Principles of Biochemistry.* 4ª Ed. New York: W.H. Freeman Publishers; 2002. Pp 659-670.
- 95.** Perelman A, Wachtel C, Cohen M, Haupt S, Shapiro H, Tzur A. JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death Dis.* 2012;22:3:e430.
- 96.** Bedner E, Li X, Gorczyca W, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry.* 1999;35:181-195.
- 97.** Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem.* 1995;70:220-233.
- 98.** Stuart KR, Cole ES. Nuclear and cytoskeletal fluorescence microscopy techniques. *Methods Cell Biol.* 2000;62:291-311.
- 99.** Ahmad M, Gawronski D, Blum J, Goldberg J, Gronowicz G. Differential response of human osteoblast-like cells to commercially pure (cp) titanium grades 1 and 4. *J Biomed Mater Res.* 1999;46:121-131.
- 100.** Yano K, Hoshino M, Ohta Y, Manaka T, Naka Y, Imai Y, Sebald W, Takaoka K. Osteoinductive capacity and heat stability of recombinant human bone morphogenetic protein-2 produced by *Escherichia coli* and dimerized by biochemical processing. *J Bone Miner Metab.* 2009;27:355-363.

- 
- 101.** Bessa PC, Pedro AJ, Klösch B, Nobre A, van Griensven M, Reis RL, Casal M. Osteoinduction in human fat-derived stem cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2 produced in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett.* 2008;30:15-21.
- 102.** Hu J, Cui D, Yang X, Wang S, Hu S, Li C, Zeng J. Bone morphogenetic protein-2: a potential regulator in scleral remodeling. *Mol Vis.* 2008;14:2373-2380.
- 103.** Ellinger P. Fluorescence microscopy in biology. 1940;15:323–347.
- 104.** Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. 3<sup>rd</sup> Ed. New York: Ed. Springer; 2006.
- 105.** Peter S, Harter K, Schleifenbaum F. Fluorescence microscopy. *Methods Mol Biol.* 2014;1062:429-452.
- 106.** Sample V, Newman RH, Zhang J. The structure and function of fluorescent proteins. *Chem Soc Rev.* 2009;38:2852-2864.
- 107.** Fine A, Amos WB, Durbin RM, McNaughton PA. Confocal microscopy: applications in neurobiology. *Trends Neurosci.* 1988;11:346-351.
- 108.** Brakenhoff GJ, van Spronsen EA, van der Voort HT, Nanninga N. Three-dimensional confocal fluorescence microscopy. *Methods Cell Biol.* 1989;30:379-398.
- 109.** Cavanagh HD, Petroll WM, Jester JV. The application of confocal microscopy to the study of living systems. *Neurosci Biobehav Rev.* 1993;17:483-498.
- 110.** Kang BS, Sul YT, Oh SJ, Lee HJ, Albrektsson T. XPS, AES and SEM analysis of recent dental implants. *Acta Biomater.* 2009;5:2222-2229.

- 
- 111.** Silva TS, Machado DC, Viezzer C, Silva Júnior AN, Oliveira MG. Effect of titanium surface roughness on human bone marrow cell proliferation and differentiation: an experimental study. *Acta Cir Bras.* 2009;24:200-205.
- 112.** He FM, Yang GL, Zhao SF, Cheng ZP. Mechanical and histomorphometric evaluations of rough titanium implants treated with hydrofluoric acid/nitric acid solution in rabbit tibia. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011;26:115-122.
- 113.** Weng D, Hoffmeyer M, Hürzeler MB, Richter EJ. Osseotite vs. machined surface in poor bone quality. A study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14:703-708.
- 114.** Veis AA, Trisi P, Papadimitriou S, Tsirlis AT, Parissis NA, Desiris AK, Lazzara RJ. Osseointegration of Osseotite® and machined titanium implants in autogenous bone graft. A histologic and histomorphometric study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2004;15:54-61.
- 115.** Klokkevold PR, Nishimura RD, Adachi M, Caputo A. Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res.* 1997;8:442-447.
- 116.** 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.* 1998;13:611-619.
- 117.** Cordioli G, Majzoub Z, Piattelli A, Scarano A. Removal torque and histomorphometric investigation of 4 different titanium surfaces: an experimental study in the rabbit tibia. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000;15:668-674.
- 118.** Oliveira DP, Palmieri A, Carinci F, Bolfarini C. Osteoblasts behavior on chemically treated commercially pure titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A.* 2014;102:1816-1822.

- 
- 119.** Harimoto K, Yoshida Y, Yoshihara K, Nagaoka N, Matsumoto T, Tagawa Y. Osteoblast compatibility of materials depends on serum protein absorbability in osteogenesis. *Dent Mater J.* 2012;31:674-680.
- 120.** Vallecillo M, Romero M, Olmedo M, Reyes C, Zorrilla C. Cylindrical dental implants with hydroxyapatite and titanium plasma spray coated surfaces: 5-years results. *J Oral Implantol.* 2007;33:59-68.
- 121.** Lacefield WR. Materials characteristics of uncoated/ceramic-coated implant materials. *Adv Dent Res.* 1999;13:21-26.
- 122.** Olivares-Navarrete R, Raines AL, Hyzy SL, Park JH, Hutton DL, Cochran DV, Boyan D, Schwartz Z. Osteoblast maturation and new bone formation in response to titanium implant surface features are reduced with age. *J Bone Miner Res.* 2012;27:1773-1783.
- 123.** Salido M, Vilches JI, Gutiérrez JL, Vilches J. Actin cytoskeletal organization in human osteoblasts grown on different dental titanium implant surfaces. *Histol Histopathol.* 2007;22:1355-1364.
- 124.** Salido M, Vilches-Perez JI, Gonzalez JL, Vilches J. Mitochondrial bioenergetics and distribution in living human osteoblasts grown on implant surfaces. *Histol Histopathol.* 2009;24:1275-1286.
- 125.** Bryington M, Mendonça G, Nares S, Cooper LF. Osteoblastic and cytokine gene expression of implant-adherent cells in humans. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25:52-58.
- 126.** Solá-Ruiz MF, Pérez-Martínez C, Martín-del-Llano JJ, Carda-Batalla C, Labaig-Rueda C. In vitro preliminary study of osteoblast response to surface roughness of titanium discs and topical application of melatonin. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2014. [Epub ahead of print].

- 
- 127.** Rodriguez y Baena R, Arciola CR, Selan L, Battaglia R, Imbriani M, Rizzo S, Visai L. Evaluation of bacterial adhesion on machined titanium, Osseotite® and Nanotite® discs. *Int J Artif Organs*. 2012;35:754-761.
- 128.** Hofstetter W, Sehr H, de Wild M, Portenier J, Gobrecht J, Hunziker EB. Modulation of human osteoblasts by metal surface chemistry. *J Biomed Mater Res A*. 2013;101:2355-2364.
- 129.** Depprich R, Ommerborn M, Zipprich H, Naujoks C, Handschel J, Wiesmann HP, Kubler NR, Meyer U. Behavior of osteoblastic cells cultured on titanium and structured zirconia surfaces. *Head Face Med*. 2008;4:29.
- 130.** Kohal RJ, Bächle M, Att W, Chaar S, Altmann B, Renz A, Butz F. Osteoblast and bone tissue response to surface modified zirconia and titanium implant materials. *Dent Mater*. 2013;29:763-776.
- 131.** Ito H, Sasaki H, Saito K, Honma S, Yajima Y, Yoshinari M. Response of osteoblast-like cells to zirconia with different surface topography. *Dent Mater J*. 2013;32:122-9.
- 132.** Altmann B, Kohal RJ, Steinberg T, Tomakidi P, Bächle-Haas M, Wennerberg A, Att W. Distinct cell functions of osteoblasts on UV-functionalized titanium- and zirconia-based implant materials are modulated by surface topography. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013;19:850-863.
- 133.** Avila G, Misch K, Galindo-Moreno P, Wang HL. Implant surface treatment using biomimetic agents. *Implant Dent*. 2009;18:17-26.
- 134.** Letić-Gavrilović A, Scandurra R, Abe K. Genetic potential of interfacial guided osteogenesis in implant devices. *Dent Mater J*. 2000;19:99-132.
- 135.** Coelho PG, Granjeiro JM, Romanos GE, Suzuki M, Silva NR, Cardaropoli G, Thompson VP, Lemons JE. Basic research methods and current trends of



- dental implant surfaces. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;88:579-596.
- 136.** Sackett DL, Rosenberg WMC, Gary JAM, Haynes RB, Richardson WS. Evidence based medicine: what is it and what it isn't. *BMJ.* 1996;312:71-72.
- 137.** Lazzara RJ, Testori T, Trisi P, Porter SS, Weinstein RL. A human histologic analysis of osseotite and machined surfaces using implants with 2 opposing surfaces. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1999;19:117-129.
- 138.** Davarpanah M, Martinez H, Celletti R, Alcoforado G, Tecucianu JF, Etienne D. Osseotite implant: 3-year prospective multicenter evaluation. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2001;3:111-118.
- 139.** Sullivan DY, Sherwood RL, Porter SS. Long-term performance of Osseotite implants: a 6-year clinical follow-up. *Compend Contin Educ Dent.* 2001;22:326-8, 330, 332-334.
- 140.** Testori T1, Wiseman L, Woolfe S, Porter SS. A prospective multicenter clinical study of the Osseotite implant: four-year interim report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2001;16:193-200.
- 141.** Schropp L, Kostopoulos L, Wenzel A, Isidor F. Clinical and radiographic performance of delayed-immediate single-tooth implant placement associated with peri-implant bone defects. A 2-year prospective, controlled, randomized follow-up report. *J Clin Periodontol.* 2005;32:480-487.
- 142.** Garlini G, Bianchi C, Chierichetti V, Sigurtà D, Maiorana C, Santoro F. Retrospective clinical study of Osseotite implants: zero- to 5-year results. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18:589-593.
- 143.** Drago CJ, Lazzara RJ. Immediate occlusal loading of Osseotite implants in mandibular edentulous patients: a prospective observational report with 18-month data. *J Prosthodont.* 2006;15:187-194.

- 
- 144.** Browaeys H, Defrancq J, Dierens MC, Miremadi R, Vandeweghe S, Van de Velde T, De Bruyn H. A retrospective analysis of early and immediately loaded osseointegrated implants in cross-arch rehabilitations in edentulous maxillas and mandibles up to 7 years. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2013;15:380-389.
- 145.** Menicucci G, Mussano F, Schierano G, Rizzati A, Aimetti M, Gassino G, Traini T, Carossa S. Healing properties of implants inserted concomitantly with anorganic bovine bone. A histomorphometric human study. *Aust Dent J.* 2013;58:57-66.
- 146.** Kokubo T, Kim HM, Kawashita M, Nakamura T. Bioactive metals: preparation and properties. *J Mater Sci Mater Med.* 2004;15:99-107.
- 147.** Gil FJ, Manzanares N, Badet A, Aparicio C, Ginebra MP. Biomimetic treatment on dental implants for short-term bone regeneration. *Clin Oral Investig.* 2014;18:59-66.
- 148.** Godoy-Gallardo M, Mas-Moruno C, Fernández-Calderón MC, Pérez-Giraldo C, Manero JM, Albericio F, Gil FJ, Rodríguez D. Covalent immobilization of hLf1-11 peptide on a titanium surface reduces bacterial adhesion and biofilm formation. *Acta Biomater.* 2014;10:3522-34.
- 149.** Fraioli R, Rechenmacher F, Neubauer S, Manero JM, Gil J, Kessler H, Mas-Moruno C. Mimicking bone extracellular matrix: Integrin-binding peptidomimetics enhance osteoblast-like cells adhesion, proliferation, and differentiation on titanium. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2015. [Epub ahead of print].