



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DOCTORADO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**ESTUDIO DE LA VIABILIDAD,
DIFERENCIACIÓN Y CRECIMIENTO DE
OSTEOBLASTOS EN LA SUPERFICIE DE
TITANIO**

Tesis Doctoral

ISABEL FOS PARRA

Sevilla, 2023

Sevilla, septiembre de 2023

EUGENIO VELASCO ORTEGA, Catedrático de Odontología Integrada de Adultos y Gerodontología de la Facultad de Odontología y Director del Máster de Implantología Oral de la Universidad de Sevilla.

DANIEL CABANILLAS BALSERA, Doctor en Odontología y Profesor Ayudante Doctor de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICAN:

Que D^a. ISABEL FOS PARRA, Graduada en Odontología por la Universidad de Sevilla e inscrita en el Programa de Doctorado de Ciencias de la Salud de la Universidad de Sevilla, ha realizado bajo su tutela y dirección el trabajo de investigación titulado **Estudio de la viabilidad, diferenciación y crecimiento de osteoblastos en la superficie de titanio**, que consideramos satisfactorio para optar al título de Doctora en Odontología.

Prof. Velasco Ortega

Prof. Cabanillas Balsera

DEDICATORIA

A mis padres Alfredo y Pepa

A mi hermano, Alfredo

A mi marido Vicente y a mis hijas, Marta, Carlota y Valentina

AGRADECIMIENTOS

A los Profesores EUGENIO VELASCO ORTEGA y DANIEL CABANILLAS BALSERA del Departamento de Estomatología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Sevilla, por su estímulo continuo e interés por esta investigación doctoral y por compartir sus conocimientos y experiencias, que me han servido de guía durante todo mi trabajo.

A todos los profesores y alumnos compañeros del Máster de Implantología Oral de la Facultad de Odontología de Sevilla, con los que durante los últimos años he participado en mi formación postgraduada y en las diversas actividades científicas relacionadas con el tema de la presente tesis doctoral.

Al profesor JAVIER GIL MUR del Instituto de Tecnología y Bioingeniería de la Universidad Politécnica de Cataluña en Barcelona, por su colaboración en la realización del presente trabajo doctoral en relación a los estudios experimentales sobre la topografía de la superficie de los implantes y la respuesta biológica celular osteoblástica.

A la Universidad de Sevilla, la institución que ha permitido mi formación en Odontología y en el campo de la Implantología Oral y especialmente al Departamento de Doctorado de Ciencias de la Salud donde he realizado mi trabajo de investigación para la tesis doctoral.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1.SUPERFICIE DE IMPLANTE Y OSEOINTEGRACION	2
2.BIOLOGÍA DEL TEJIDO ÓSEO	10
3.CÉLULAS IMPLICADAS EN EL REMODELADO OSEO	16
3.1. Osteoblastos	16
3.2. Células de revestimiento óseo	17
3.3. Osteocitos	18
4.SUPERFICIE DE LOS IMPLANTES DENTALES	19
4.1. Propiedades fisicoquímicas, microestructurales y mecánicas del titanio.	19
4.2. Topografía de las superficies de los implantes dentales	21
4.3. Tipos de superficies de implantes	25
4.3.1. Superficie mecanizada	25
4.3.2. Superficies rugosas o tratadas	27
4.3.2.1. <i>Superficies grabadas con ácidos</i>	28
4.3.2.2. <i>Superficies arenadas</i>	29
4.3.2.3. <i>Superficies arenadas y grabadas</i>	30
4.3.2.4. <i>Otros tipos de tratamientos de la superficie</i>	31
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
MATERIAL Y METODOS	39
1. DISCOS DE TITANIO	40
2.ANALISIS DE LAS SUPERFICIES DE LOS DISCOS DE TITANIO	42

3.ANALISIS DE LA ACTIVIDAD CELULAR OSTEOBLASTICA	45
4. METODO ESTADISTICO	47
RESULTADOS	48
1.MICROSCOPIA Y TOPOGRAFIA DE LAS SUPERFICIES DE TITANIO	49
2. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR OSTEOBLÁSTICA	55
2.1. Viabilidad y proliferación celular	55
2.2. Diferenciación celular	58
2.3. Expresión génica	59
DISCUSION	61
CONCLUSIONES	82
BIBLIOGRAFIA	84

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.SUPERFICIE DE IMPLANTE Y OSEOINTEGRACION

La topografía de las superficies de titanio y sus aleaciones pueden influir en la formación ósea, la adsorción de proteínas y la interacción de los osteoblastos con el biomaterial.¹ Estos aspectos juegan un papel fundamental en la generación de nuevas células osteoblásticas y en el mecanismo de osteoconducción. Además, la rugosidad del titanio conduce a un aumento en el proceso de diferenciación osteoblástica a través de variaciones en la regulación transcripcional o expresión génica de factores osteogénicos debido a variaciones morfológicas de las células causadas por la topografía de la superficie del titanio ².

Es necesario comprender la anatomía y la biología del hueso, su funcionamiento, su respuesta y como interfieren sus células con el objetivo de estudiar y comprender la relación que se produce entre el tejido óseo y un implante dental cuyo material es totalmente biocompatible y constituye el material ideal para para conseguir la oseointegración con éxito a largo plazo tras la carga funcional.³

La adhesión celular a este tipo de material no siempre es fuerte, y se deben desarrollar nuevas formulaciones y modificaciones de superficie para aumentar la unión celular al titanio, de hecho, desde hace más de 40 años, se acepta que la superficie de los implantes constituye uno de los factores que influyen en la cicatrización tisular del lecho implantario, estimulando la presencia de proteínas morfogenéticas, el depósito de matriz mineralizada y como consecuencia en el fenómeno de la oseointegración.⁴

INTRODUCCIÓN

Se está investigando que las características físicas y químicas de la superficie de los implantes dentales pueden influir en el desarrollo de una mejor respuesta tisular del huésped, en este sentido, la energía, la carga y la composición de estas superficies han sido modificadas con el objetivo de mejorar la interfase hueso-implante.⁵

Los primeros implantes dentales de superficie pulida tenían una rugosidad (Ra) de alrededor de $0,15\mu\text{metro}$.⁶ A medida que se ha avanzado en el conocimiento del metabolismo óseo y cómo la celularidad influye en la fijación de los implantes, estos han sido sometidos a diferentes tipos de tratamientos como tratamientos de grabado ácido, arenado con diferentes tipos de abrasivos, mediante láser u otros métodos. Esto ha permitido obtener implantes dentales con un aumento de su rugosidad, lo que potencialmente aumenta el área de superficie en contacto con el hueso, alrededor de ocho veces mayor. Los tratamientos de arenado producen una macrorrugosidad, que se ha combinado con grabado ácido para conseguir una microestructura en la rugosidad del titanio. Todos estos tratamientos se realizaron con el objetivo de promover la buena adhesión, proliferación y diferenciación de las células osteoblásticas para lograr una buena osteointegración.⁷

Las propiedades de las superficies de los implantes de titanio son un factor importante para lograr la osteointegración, ya que participan en el proceso temprano de cicatrización después de su inserción en el hueso alveolar.

INTRODUCCIÓN

Los implantes dentales de titanio están disponibles con diversos tipos de superficies desde unas relativamente lisas o mecanizadas hasta unas superficies rugosas desarrolladas por diversos tratamientos como el arenado con albúmina, el grabado con diferentes ácidos o por la combinación de varios tratamientos.⁸

La importancia de la superficie de los implantes dentales puede radicar en la respuesta biológica *in vitro* (estudios de laboratorio con cultivos celulares), *in vivo* (estudios con animales de experimentación), y finalmente su aplicación clínica como raíces dentales artificiales en pacientes para la rehabilitación prostodóntica en el tratamiento del edentulismo unitario, múltiple o total⁹. Es importante determinar cómo influye la topografía de la superficie en la formación ósea. Hay muchas variables involucradas y la topografía y las propiedades fisicoquímicas de la superficie son claves. De hecho, estudios *in vitro* previos han demostrado un aumento en la unión y actividad de células similares a osteoblastos correlacionadas con un aumento en la rugosidad de la superficie.²

La osteointegración puede ocurrir en un sentido físico cuando el hueso crece desde el lecho óseo nativo, estabilizando el implante. Si el implante tiene una superficie porosa, el crecimiento óseo puede formar una fijación mecánica¹⁰, produciéndose uniones mecánicas y bioquímicas. En este momento es donde las diferentes superficies juegan un papel fundamental en la estimulación de las células implicadas y la aceleración de los tiempos de cicatrización.

En la unión mecánica, el crecimiento del hueso hacia las irregularidades de la superficie produce la fijación del implante. Mientras mayor sean las

INTRODUCCIÓN

irregularidades, mayor será el crecimiento óseo y mayor contacto habrá de la superficie con el hueso. Antes de la carga protésica del implante se deberá esperar el tiempo reglamentario para que se produzca este crecimiento y remodelado óseo. En la inserción del implante en el lecho óseo éste queda fijado al hueso mediante su macrodiseño, permitiendo una correcta estabilidad para que se produzca la osteointegración ¹¹. Es lo que se denomina estabilidad primaria, esta estabilidad se verá aumentada o disminuida en función del tipo de hueso en el que coloquemos el implante y el diseño macroscópico del implante, pues en función del diseño obtendremos mayor estabilidad primaria dependiendo del tipo de hueso. ¹²

La unión bioquímica es la propiedad que tiene el material del implante para unirse a los tejidos. El titanio es un material bioinerte, existen materiales que son bioactivos como es el fosfato cálcico o la albumina que se usan como recubrimiento del titanio facilitando la unión bioquímica. ¹⁴

La unión bioquímica es la encargada de producir la estabilidad secundaria que produce la estabilidad biológica mediante el regenerado y remodelado óseo. Tras la colocación del implante comienza a disminuir la estabilidad primaria (Figura 1) debido a los procesos curativos celulares y extracelulares que se dan en la interfase implante-hueso. Con la formación del coagulo sanguíneo, se comienza a depositar la matriz cálcica mediante las células osteogénicas produciendo la formación de hueso nuevo y trabeculado proporcionando y aumentando la fijación biológica del implante al hueso. ¹³

INTRODUCCIÓN

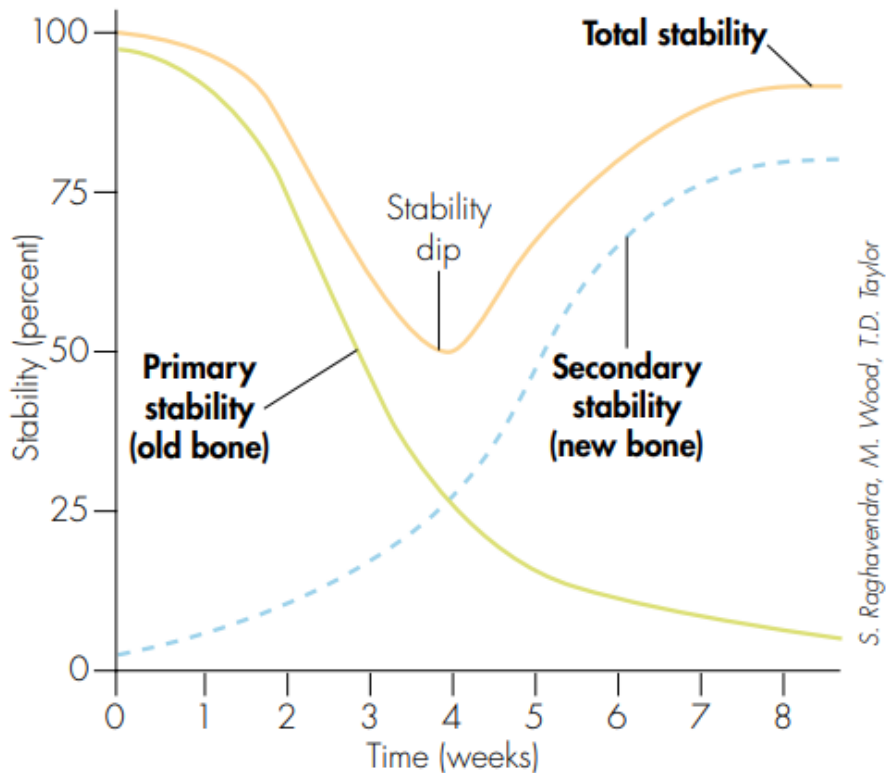


Figura 1. Evolución de la estabilidad en el tiempo. ¹³

Desde un punto de vista biológico, la osteointegración consiste en un proceso de cascada biológico que sucede después de la colocación de un biomaterial en tejido óseo. Consta de cuatro fases de cicatrización después de la inserción de un implante dental: se conoce como las cuatro fases de la cicatrización de heridas, un concepto que se origina a partir de la observación científica de la cicatrización de los tejidos blandos ¹⁵, hemostasia, fase inflamatoria, fase proliferativa y fase de remodelación. Este concepto se transfiere a la cicatrización ósea, concretamente, a la cicatrización ósea del lecho implantario. El proceso de cicatrización de la herida ósea a lo largo de estas cuatro fases es el resultado de la coordinación de distintos tipos celulares que están comunicados entre sí mediante moléculas de señalización como son

INTRODUCCIÓN

citoquinas, proteínas de la matriz extracelular y moléculas pequeñas.¹⁶ Esta activación secuencial de genes controlan la acción de las células implicadas en la osteointegración, estos genes son activados por moléculas mensajeras como son, factores de proteínas solubles, histamina, prostaglandinas o moléculas de la matriz extracelular que interactúan a su vez con receptores específicos de la superficie celular.¹⁷ El proceso comienza por la formación de hematoma después del trauma quirúrgico; activándose la respuesta inmune llevada a cabo por macrófagos y neutrófilos; la migración de las células estromales de la médula ósea y células osteoprogenitoras desde el hueso nativo hacia la superficie del material y su posterior diferenciación en osteoblastos formadores de hueso; fusión de monocitos para formar osteoclastos multinucleados y remodelación del hueso primario recién sintetizado y concluyendo con la formación de hueso maduro¹⁸.

La curación y cicatrización de una herida ósea alrededor de un implante dental es un mecanismo de reparación coordinado y secuencialmente organizado del organismo.¹³

La secuencia regular de tipos de células controlada por concentraciones adecuadas de moléculas de señalización da como resultado una curación sin interrupciones. Cuando la cicatrización es alterada, se asocia con la una fase inflamatoria temprana y el desarrollo de un ambiente tóxico en la herida y se caracteriza por altos recuentos de células polimorfonucleares, altas concentraciones de radicales tóxicos y enzimas proteolíticas y bajas concentraciones de factores de crecimiento y moléculas de matriz extracelular. Clínicamente, debe evitarse el desarrollo de un ambiente tóxico en la herida, por ejemplo, con medidas antibacterianas.

INTRODUCCIÓN

La topografía de la superficie de titanio y sus aleaciones afectan en la formación ósea, la absorción de proteínas y la interacción de los osteoblastos con los biomateriales¹⁹. Se ha observado la expresión de un patrón específico de receptores de integrinas en la membrana de los osteoblastos²⁰. La formación ósea es iniciada por el Colágeno tipo 1 que es generado a partir de los osteoblastos, siendo la proteína más abundante en la matriz extracelular. El Colágeno tipo 1 proporciona un andamiaje para la aposición del componente mineral de Apatita ósea, que le aporta resistencia mecánica. La estructura orgánica proporciona elasticidad²¹.

La homeostasis ósea se rige por varias vías de señalización que desencadenarán la diferenciación celular²². Estas estrategias se deben a los factores de crecimiento de los fibroblastos (FCF), las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y la vía de señalización de Wnt/B-cateninaT que regula procesos como la regeneración de tejidos, la diferenciación de células madre y la proliferación celular²³. Las células Osteoblasticas expresan dos elementos de transcripción, el factor de transcripción Runt 2 (RUNX2) y el factor de transcripción específico de osteoblastos (Osterix u OSX). Estos factores son críticos e indispensables para la diferenciación de los Osteoblastos²⁴. Algunos autores determinaron que los factores de transcripción RUNX2 y OSX tienen un papel fundamental en la osteogénesis, pero no en la diferenciación celular²⁵.

La osteogénesis y angiogénesis son mecanismos que están directamente relacionados con el crecimiento, la remodelación y la reparación ósea²⁶. Las células de osteoclastos activan la angiogénesis a través de la expresión de factores proangiogénicos, incluido el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A)²⁷. Este factor funciona con el activador del

INTRODUCCIÓN

receptor del factor nuclear Kappa-B (RANKL) para promover la osteoclastogénesis ²⁸. Deckers y cols. ²⁹ confirmaron que la angiogénesis es causada por la quiescencia de los osteoblastos y no tanto por la actividad de las células de los osteoclastos ²⁹. Además, Cackowski y cols. ²⁸ demostraron que la actividad de los osteoclastos aumentaba la angiogénesis y que la inactividad de las células de los osteoclastos producía osteoprotegerina (OPG), lo que disminuía la angiogénesis. El aumento de la actividad osteoclástica por la paratohormona (PTH) produjo un aumento de la angiogénesis. ²⁸

Ha sido posible determinar la influencia en la adhesión, proliferación y diferenciación de osteoblastos con diferentes topografías de implantes en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* ³⁰. Uno de los resultados más significativos fue cómo el titanio comercialmente puro y rugoso favorecía la expresión de la fosfatasa alcalina (FAL) ³¹. La influencia de la rugosidad en el comportamiento de las células osteoblásticas, especialmente en la diferenciación, es causada por la acción de la proteína quinasa A y PL A2., y por señalización generada por integrina³².

Otros aspectos que favorecieron la diferenciación en superficies rugosas fueron la posterior expresión de citocinas y factores de crecimiento mediados por células osteoblásticas. Se pudo observar en estudios *in vitro* realizados en titanio bruto con células de osteosarcoma (MG-63) que se produjo un aumento de TGF- β e IL-1 β ³³. Se observó una disminución de la proliferación en superficies de titanio con rugosidad superior a 2,5 μ m Ra debido a una respuesta mediada por prostaglandinas. También se pudo observar un aumento de los marcadores fenotípicos celulares de diferenciación (actividad ALP, osteocalcina).

INTRODUCCIÓN

Estos aspectos juegan un papel fundamental en la generación de nuevas células osteoblásticas y en el mecanismo de osteoconducción. Además, la rugosidad del titanio conduce a un aumento en el proceso de diferenciación osteoblástica a través de variaciones en la regulación transcripcional o expresión génica de factores osteogénicos clave debido a variaciones morfológicas de las células causadas por la topografía de la superficie del titanio ²⁴. Ahora es importante determinar la influencia de la topografía de titanio en la formación de hueso. Hay muchas variables involucradas y la topografía y las propiedades fisicoquímicas de la superficie son clave. En la actualidad existe un grave problema con la periimplantitis: se produce una importante pérdida de hueso que en muchos casos provoca la pérdida del implante dental ⁸.

2. BIOLOGÍA DEL TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo es tejido conectivo mineralizado en el cual intervienen cuatro tipos de células: osteoblastos, células de revestimiento óseo, osteocitos y osteoclastos. Se encuentra de manera continua reabsorbido por los osteoclastos y neoformado por los osteoblastos. Existe evidencia de que los osteocitos actúan como mecanosensores y orquestadores de este proceso de remodelación ósea ³⁴.

La remodelación ósea es un proceso muy complejo mediante el cual se reemplaza hueso viejo por hueso nuevo, en un ciclo compuesto por tres fases: el inicio de la resorción ósea por parte de los osteoclastos, el período de reversión de la reabsorción a la formación de hueso nuevo y la formación ósea por parte de los osteoblastos ³⁵. Este proceso ocurre debido a las acciones coordinadas de osteoclastos, osteoblastos, osteocitos y células de

INTRODUCCIÓN

revestimiento óseo que juntas forman la estructura anatómica temporal llamada unidad multicelular básica (BMU) ³⁶.

Es fundamental el equilibrio entre la formación y la reabsorción ósea y depende de la acción de varios factores locales y sistémicos, incluidas hormonas, citocinas, quimiocinas y estimulación biomecánica ³⁷.

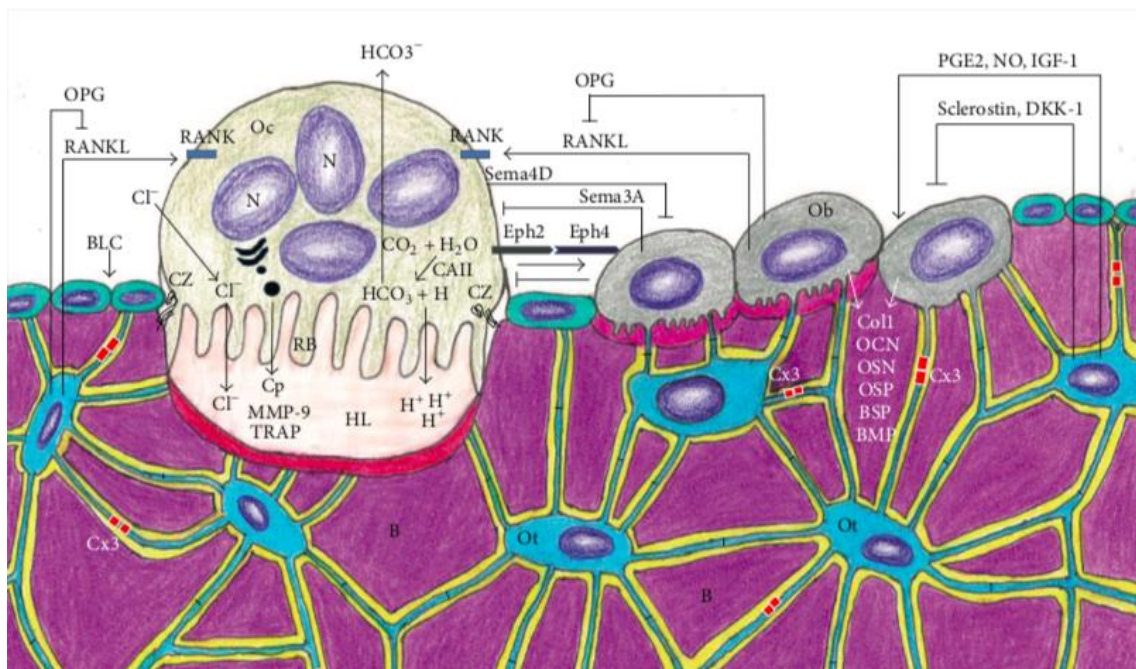


Figura 2. Resumen esquemático del tejido óseo. ³⁸

En la Figura 2 se puede observar el resumen esquemático del tejido óseo que muestra las células óseas y las relaciones entre ellas y con la matriz ósea. La activación de osteoclastos (Oc) se produce tras la unión de RANKL a su receptor RANK, presente en la membrana de los precursores de osteoclastos. El osteoclasto se polariza a través de la reorganización de su

INTRODUCCIÓN

citoesqueleto; el borde ondulado (RB) y la zona clara (CZ) son especializaciones de membrana observadas en la porción del osteoclasto yuxtapuesto a la superficie de reabsorción ósea, la laguna de Howship (HL). La disolución de la hidroxiapatita se produce en la superficie ósea adyacente al borde ondulado (RF) tras su acidificación debido al bombeo de iones de hidrógeno (H^+) al HL e iones bicarbonato (HCO_3^-) se originan a partir de la escisión del ácido carbónico (H_2CO_3) bajo la acción de la anhidrasa carbónica II (CAII) ³⁸.

Después de la disolución de la fase mineral, el osteoclasto (Oc) libera catepsina (Cp), metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9) y fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP) que degradan la matriz orgánica. EphrinB2 (Eph2) presente en la membrana de los osteoclastos se une a EphrinB4 (Eph4) en la membrana de osteoblastos (Ob), promoviendo su diferenciación, mientras que la señalización inversa (ephrinB4/ephrinB2) inhibe la osteoclastogénesis. Sema4D producido por los osteoclastos inhibe a los osteoblastos, mientras que Sema3A secretado por los osteoblastos inhibe a los osteoclastos. Los osteoblastos (Ob) también producen receptor activador del factor nuclear KB (RANKL) y osteoprotegerina (OPG), que aumentan y disminuyen la osteoclastogénesis, respectivamente. Los osteoblastos (Ob) secretan proteínas colágenas (Col1) y no colágenas como osteocalcina (OCN), osteopontina (OSP), osteonectina (OSN), sialoproteína ósea (BSP), y proteínas morfogenéticas óseas (BMP). Los osteocitos (Ot) se encuentran dentro de lagunas rodeadas de matriz ósea mineralizada (B). Sus prolongaciones citoplasmáticas cruzan los canalículos para conectarse con otras prolongaciones de osteocitos vecinos mediante uniones gap, compuestas principalmente por Conexina 43 (Cx3), así como con prolongaciones

INTRODUCCIÓN

citoplasmáticas de osteoblastos (Ob) y células de revestimiento óseo (BLC) en la superficie ósea. RANKL secretado por los osteocitos estimula la osteoclastogénesis, mientras que la prostaglandina E2 (La PGE2), el óxido nítrico (NO) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) estimulan la actividad de los osteoblastos. Por el contrario, los osteocitos producen OPG que inhibe la osteoclastogénesis; además, los osteocitos producen esclerostina e inhibidor de la vía de señalización WNT de Dickkopf (DKK-1) que disminuyen la actividad de los osteoblastos ³⁸.

Con las proteínas de la matriz del trauma óseo, los factores de crecimiento que se almacenan en la matriz ósea se vuelven solubles y los vasos sanguíneos lesionados activan la proliferación del fibrinógeno para crear una primera matriz extracelular en el defecto ¹⁸

En la superficie del implante interactúan proteínas plasmáticas como la albúmina, las globulinas o la fibrina, este proceso de absorción de proteínas es muy efectivo, aumentando su concentración en la superficie en comparación con el medio acuoso circundante ³⁹. Al ser la Albúmina la proteína con más alta concentración en la sangre es la primera que se une a la superficie y serán reemplazadas lentamente por proteínas con una menor concentración, pero con una mayor afinidad por la superficie, como son la vitronectina o la fibronectina ³⁹.

Las plaquetas liberan factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- b), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF).

INTRODUCCIÓN

La angiogénesis es el requisito previo para la osteogénesis. El hueso nuevo se forma solo en estrecha conexión con los vasos sanguíneos ⁴⁰. Primero se desarrolla el vaso sanguíneo y luego sigue el hueso, este proceso recibe el nombre de osteogénesis angiogénica. La célula osteoprogenitora se adhiere a la superficie de un implante a través de integrinas. Las integrinas se unen a las proteínas de la matriz extracelular, como la fibronectina. Un osteoblasto no se adhiere directamente al metal, sino a la capa de proteínas en la parte superior del implante. La propia célula precursora del hueso produce fibronectina celular insoluble necesaria para la unión celular al titanio ⁴¹. Después de esta firme unión a la superficie, la célula osteoprogenitora se denomina osteoblasto que comienza a expresar osteocalcina, fosfatasa alcalina y colágeno tipo I ⁴²

A la semana de la inserción del implante, comienza la formación de hueso nuevo y los contactos óseos primarios se complementan con contactos óseos secundarios recién formados ⁴³. Histológicamente, el hueso que se forma después de una lesión se caracteriza porque sus fibras de colágeno no son paralelas, estas fibras están orientadas al azar. Este hueso crece a lo largo de la superficie ósea existente y a lo largo de la superficie del implante dental hacia las ranuras de las roscas. Se ha demostrado que los restos óseos creados al realizar el lecho implantario son importantes para la formación temprana de hueso y se incorporan a las trabéculas inmaduras del hueso entretejido. ⁴⁴.

La formación de hueso nuevo comienza con la secreción de una matriz de colágeno por parte de los osteoblastos. La formación de hueso dentro del proceso alveolar es un proceso de osificación intramembranosa, comenzando por la secreción de colágeno tipo III.

INTRODUCCIÓN

En la fase de remodelación del tejido óseo son los osteoclastos los que eliminan el tejido óseo entretejido y lo reemplazan por hueso lamelar, formándose en el interior de las fibras de colágeno placas cristalinas de hidroxiapatita orientadas. Su nanoestructura proporciona las propiedades mecánicas y biológicas únicas del hueso, lo suficientemente rígido que lo hace resistente a fuerzas de presión y tracción manteniendo su elasticidad.⁴⁵

El osteoclasto es la célula clave de la fase de remodelación. Estas células aparecen en la herida al cabo de unos días (Figura 3). Comienzan a crear espacio para la formación de hueso nuevo y eliminan los contactos primarios entre el hueso y el implante. Al cabo del tiempo, la mayor parte del hueso entretejido y el hueso viejo de los contactos óseos primarios son reemplazados por hueso recién formado y orientado a la carga.

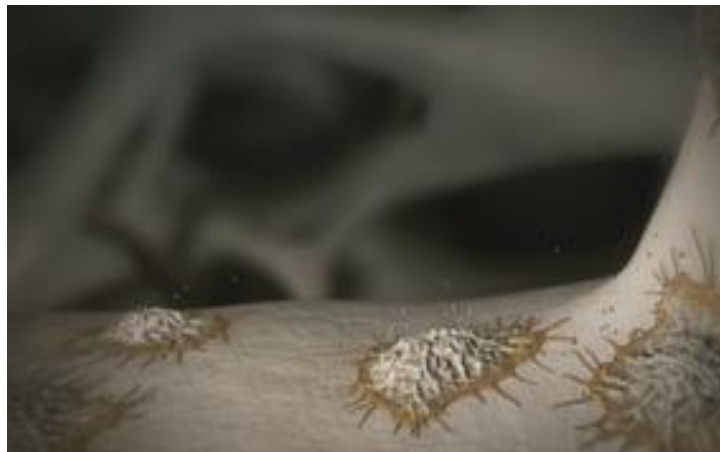


Figura. 3. Célula osteoclastica⁴⁶

INTRODUCCIÓN

El origen de los osteoclastos son los monocitos transportados por la sangre. Se adhieren a las paredes de los vasos sanguíneos mediante la interacción CXCR-4, y SDF-1 que se unen a la superficie de las células endoteliales ⁴⁷. La formación de osteoclastos requiere la presencia del ligando RANK y M-CSF ⁴⁸. Estas proteínas unidas a la membrana son producidas por osteoblastos vecinos, lo que requiere un contacto directo entre estas células y los precursores de osteoclastos ⁴⁹.

El acoplamiento de osteoclastos y osteoblastos y el mecanismo molecular de cómo los osteoclastos controlan y activan los osteoblastos para llenar el vacío óseo después de la reabsorción aún no está claro con detalle ⁵⁰. Los factores de crecimiento y diferenciación como BMP, IGF, TGF beta se almacenan en la matriz ósea. Estos factores son liberados de la matriz ósea y activados por enzimas proteolíticas que se encuentran en la superficie de muchos tipos de células, incluidos los osteoblastos⁵¹.

3. CÉLULAS IMPLICADAS EN EL REMODELADO OSEO.

3.1. OSTEObLASTOS. Los osteoblastos son células cuboidales, comprenden del 4 al 6% de la totalidad de las células óseas que se encuentran a lo largo de la superficie ósea, son las responsables de la formación ósea. Son células sintetizadoras de proteínas con características morfológicas que incluyen un abundante retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi prominente, así como varias vesículas secretoras. Como células polarizadas, los osteoblastos secretan el osteoide hacia la matriz ósea.⁵²

INTRODUCCIÓN

Son derivadas de las células madre mesenquimales (MSC). El compromiso de MSC con el linaje osteoprogenitor requiere la expresión de genes específicos, siguiendo pasos programados como son la síntesis de proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y miembros de las vías Wingless (Wnt). Las expresiones de los factores de transcripción relacionados con Runt 2, y Osterix (Osx) son cruciales para la diferenciación de osteoblastos. Además, Runx2 es un gen maestro de la diferenciación de los osteoblastos.⁵³

En la fase proliferativa los progenitores de osteoblastos aumentan la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) y se consideran preosteoblastos⁵². La transición de preosteoblastos a osteoblastos maduros se caracteriza por existir un aumento en la expresión del gen Osx y de la secreción de proteínas de la matriz ósea como la osteocalcina (OCN), la sialoproteína ósea (BSP) I/II y el colágeno tipo I. Los osteoblastos maduros aparecen como una sola capa de células cuboidales que contienen abundante retículo endoplásmico rugoso y un gran complejo de Golgi, estas células maduras pueden sufrir apoptosis o convertirse en osteocitos o células de revestimiento óseo⁵⁴.

3.2. CÉLULAS DE REVESTIMIENTO ÓSEO. Son osteoblastos quiescentes de forma plana que cubren las superficies óseas, donde no se produce ni la reabsorción ósea ni la formación de hueso. Tienen un perfil nuclear delgado y plano; su citoplasma se extiende a lo largo de la superficie ósea y muestra pocos orgánulos citoplasmáticos como perfiles de retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi. Algunas de estas células muestran procesos que se extienden hacia los canalículos, y también se observan uniones comunicantes entre las células de revestimiento óseo adyacentes y entre estas células y los osteocitos.⁵⁵

INTRODUCCIÓN

La actividad secretora de las células de revestimiento óseo depende del estado fisiológico del hueso, por lo que estas células pueden volver a adquirir su actividad secretora, aumentando su tamaño con una apariencia cuboide. No se conoce por completo las funciones de las células de revestimiento óseo, pero se ha demostrado que evitan la interacción directa entre los osteoclastos y la matriz ósea, cuando no debería producirse la reabsorción ósea, y también participan en la diferenciación de los osteoclastos, produciendo osteoprotegerina (OPG) y el activador del receptor del ligando del factor nuclear kappa-B (RANKL)⁵⁶.

3.3. OSTEOCITOS. Estas células comprenden el 90-95% de la totalidad de las células óseas, son las células más abundantes y longevas, con una vida útil de hasta 25 años ⁵⁷. Se encuentran dentro de lagunas rodeadas de matriz ósea mineralizada, con una morfología dendrítica. La morfología de los osteocitos incrustados varía según el tipo de hueso. Por ejemplo, los osteocitos del hueso trabecular son más redondeados que los osteocitos del hueso cortical, que muestran una morfología alargada.⁵⁸

Los osteocitos se derivan de las células madre mesenquimales a través de la diferenciación de osteoblastos. Pasan por cuatro etapas reconocibles: osteoide-osteocitos, preosteocitos, osteocito joven y osteocito maduro. Al final de un ciclo de formación ósea, una subpoblación de osteoblastos se convierte en osteocitos incorporados a la matriz ósea produciéndose cambios morfológicos y ultraestructurales notorios, incluida la reducción del tamaño de los osteoblastos redondos. Se produce una disminución de los orgánulos aumentando la proporción núcleo-citoplasma coincidiendo en una disminución en la síntesis y secreción de proteínas.⁵⁷

INTRODUCCIÓN

Durante la transición osteoblastos/osteocitos, el proceso citoplasmático comienza a emerger antes de que los osteocitos hayan sido encerrados en la matriz ósea ⁵⁹. La superficie de los osteocitos es 400 veces mayor que la de todos los sistemas de Haversian y Volkmann y más de 100 veces mayor que la superficie del hueso trabecular ⁶⁰. La comunicación célula-célula también se logra mediante el líquido intersticial que fluye entre los procesos de los osteocitos y los canalículos. Estas células actúan como mecanosensores ya que su red interconectada tiene la capacidad de detectar presiones y cargas mecánicas, ayudando así a la adaptación del hueso a las fuerzas mecánicas diarias ⁶¹. Actúan como orquestadores de la remodelación ósea, a través de la regulación de las actividades de los osteoblastos y osteoclastos. La apoptosis de los osteocitos es una señal quimiotáctica de la reabsorción ósea osteoclástica ⁶². Y los osteocitos apoptóticos son engullidos por los osteoclastos en la reabsorción.

4.SUPERFICIE DE LOS IMPLANTES DENTALES

4.1.PROPIEDADES FISICOQUIMICAS, MICROESTRUCTURALES Y MECÁNICAS DEL TITANIO.

La excelente biocompatibilidad, bioadhesión y su resistencia a la corrosión, son propiedades que hacen que el titanio sea un material ideal e interesante para la fabricación de los implantes dentales ya que sus propiedades posibilita el crecimiento óseo. Su módulo de elasticidad se encuentra entre 10 y 30 GPa muy similar al del hueso y es muy resistencia a la fatiga facilitando así su procesado.⁶³

La biocompatibilidad del titanio es atribuida a la formación de una capa de óxido estable y autolimitante en la superficie de 3-5 nm. que evita que los

INTRODUCCIÓN

materiales de titanio se oxiden y corroan aún más. Esta característica de resistencia a la corrosión facilita la biocompatibilidad al mantener la integridad mecánica del material y la salud del tejido óseo circundante.⁶⁴

El titanio tiene una gran resistencia a las cargas repetidas y es menos rígido, lo que disminuye la cantidad de tensión sobre el hueso. Por lo tanto, las propiedades mecánicas deseadas, también hacen del titanio un material ideal para su uso en implantes quirúrgicos. Además, estudios recientes indicaron que, en comparación con el cobalto, el vanadio, el aluminio, el cromo y el hierro, el titanio tiene una potencia antibacteriana más intrínseca contra *Porphyromonas Gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Actinobacillus Actinomycetemcomitansi*, entre otras ⁶⁵.

Las superficies de los implantes tradicionales sin modificar carecen de la capacidad total para lograr la osteointegración y combatir la formación de la biopelícula siendo esto un obstáculo para el titanio en la implantología oral ⁶⁶. Esta superficie se vuelve reactiva cuando se expone a fluidos biológicos (p. ej., saliva y sangre) o aire, formando dióxido de titanio que sirve como una capa de pasivación que determina la biocompatibilidad del implante. Sin embargo, las propiedades electroquímicas/ fisicoquímicas del dióxido de titanio son fundamentalmente diferentes en comparación con los tejidos duros dentales mineralizados, que parecen crear un microambiente distinto que afecta la adherencia de los primeros colonizadores orales (como *Streptococos* y *Actinomyces*) y puede alterar las interacciones entre especies asociadas con la salud periimplantaria ⁶⁵. Para superar estos obstáculos, se ha aplicado una diversidad de modificaciones físicas, químicas y biológicas a la superficie de los implantes de titanio para mejorar su rendimiento biológico y los resultados de la osteointegración.

INTRODUCCIÓN

La osteointegración está definida como "El contacto establecido sin interposición de tejido no óseo entre el hueso normal remodelado y un implante que implica una transferencia y distribución sostenida de la carga desde el implante hacia y dentro del tejido óseo". Clínicamente corresponde a la estabilidad y anquilosis de un implante en el hueso ⁶⁷.

Se ha demostrado que las características de la superficie de los implantes dentales promueven los procesos biológicos durante la osteointegración al mediar la interacción directa con los osteoblastos del huésped en la formación ósea ⁶⁷.

En general, las células óseas humanas tienen una capacidad de adhesión muy baja a las superficies metálicas lisas, y el uso de estos materiales podría provocar infecciones, inflamación y baja viabilidad celular. Por esta razón, se han propuesto modificaciones que afectan la rugosidad, la topografía y la química de la superficie del implante para aumentar la viabilidad celular y la biocompatibilidad como son las superficies lisas y las superficies rugosas ⁶⁸.

4.2.TOPOGRAFIA DE LAS SUPERFICIES DE LOS IMPLANTES DENTALES

Son muchos los factores que afectan al éxito del implante a largo plazo, pero existen cuatro propiedades que están íntimamente relacionadas con la superficie del implante. Las propiedades físicas es lo que conocemos como energía superficial, mientras más energía, mayor afinidad para la adsorción y mejor osteointegración, proporcionando una mejor interfase hueso-implante. ⁶⁹

La composición química de la superficie determinará y producirá diferentes reacciones en el medio, esta composición dependerá del

INTRODUCCIÓN

procedimiento de preparación y de los elementos e impurezas que queden en la superficie. La capa más superficial produce un intercambio de iones y de agua influyendo en la unión de proteínas y favoreciendo las reacciones celulares.⁷⁰

Las propiedades mecánicas no están tan investigadas, pero están relacionadas con el estrés de la superficie debido a la corrosión que sufre y el desgaste relacionado con la dureza, a mayor porosidad menor resistencia a la fatiga.⁷¹

La propiedad de la superficie de los implantes más estudiada y más importante es la topografía, es la propiedad fundamental en el desarrollo de las superficies de los implantes, ya que relaciona el grado de rugosidad y la orientación de las rugosidades en la superficie. Los implantes con mayor rugosidad presentan una mejor respuesta ósea y una mejor interfase hueso-implante. Las irregularidades nanométricas de la superficie del implante afectan a la respuesta ósea, favoreciendo e induciendo a las diferentes células la formación ósea sobre la superficie. El inconveniente de la rugosidad de la superficie del implante es el aumento de la periimplantitis, ya que es más fácil también la adhesión bacteriana a esta superficie, y la fuga iónica.⁷⁰

Estas cuatro características descritas anteriormente se han optimizado durante las últimas cuatro décadas para mejorar continuamente el éxito a largo plazo y reducir el tiempo para alcanzar niveles altos de osteointegración ya que contribuyen en los procesos biológicos al mediar en la integración de los osteoblastos¹⁰. Se ha desarrollado y aplicado una serie de modificaciones superficiales en los implantes comercializados mediante diferentes métodos de sustracción y adicción.⁸

INTRODUCCIÓN

Podemos clasificar la topografía de los implantes dentales en macro, micro y nanoescala. La macrotopografía de un implante está determinada por su geometría visible como son las roscas y diseño cónico. La escala métrica es de milímetros a micrómetros. En los últimos años, el esfuerzo científico se ha centrado principalmente en la micro y nanogeometría. Una macrogeometría adecuada combinada con una preparación adecuada del lecho implantario es la base fundamental del éxito clínico de un implante.⁷²

La microtopografía está vinculada a la microrrugosidad en una escala micrométrica (1–100 nanómetros) y se modifica mediante técnicas de fabricación como mecanizado, grabado con ácido, anodización, arenado, granallado y diferentes procedimientos de recubrimiento ⁷³. Importantes estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que las superficies de titanio con una rugosidad media entre 1 y 2 nm han superado en osteointegración a las superficies más lisas o incluso más rugosas ⁷⁴. Un estudio reciente que comparó superficies con microrrugosidad definida confirmó los efectos beneficiosos de las superficies moderadamente rugosas en la diferenciación y migración de osteoblastos ⁷⁵

Entre los diferentes parámetros estudiados para comparar los diferentes diseños de superficies de implantes encontramos los parámetros histomorfométricos, los parámetros dinámicos y los parámetros biomecánicos. ⁷⁶ Con los test biomecánicos obtenemos la información necesaria del grado de fijación del implante en el tejido óseo, proporcionándonos el torque necesario para la remoción del implante, pero no nos proporciona datos a nivel microscópico para saber y evaluar el comportamiento de las diferentes superficies implantológicas sobre el hueso. Para ello tenemos los estudios de

INTRODUCCIÓN

nanointegración, midiendo las propiedades mecánicas del implante en función del tiempo.⁷⁷

Los parámetros científicos comúnmente utilizados para describir la rugosidad de la superficie es el bidimensional (promedio de rugosidad del perfil) y el tridimensional (promedio de rugosidad del área)⁷⁸. La mayoría de los implantes dentales del mercado tienen una rugosidad media entre 1-2 nmetro(nm). Según Albrektsson y Wennerberg⁷⁹, este rango parece proporcionar un grado óptimo de rugosidad para promover la osteointegración. Hoyos, surcos y protuberancias caracterizan la microtopografía y sientan las bases para las respuestas biológicas en la interfase hueso-implante. Las modificaciones de la microtopografía contribuyen a un aumento de la superficie. Los estudios han demostrado niveles elevados de BIC para superficies microrrugosas⁷⁸.

Una mayor rugosidad facilita la colonización bacteriana por lo que los valores óptimos de rugosidad (Ra) deben oscilar ente 0,9 y 1,9 micrometros⁸⁰. Estos cambios en la topografía de la superficie tienen su influencia en los ángulos de contacto; los materiales granulados aumentan el ángulo de contacto y la componente polar de la energía superficial, aspectos que favorecen el comportamiento biológico⁸¹.

La rugosidad del titanio afecta la humectabilidad, la absorción de proteínas en la superficie y la energía superficial tanto en los componentes polares como dispersivos. Estas propiedades fisicoquímicas son factores claves para la migración, proliferación y diferenciación celular (Figura 4)⁸²⁻⁸³.

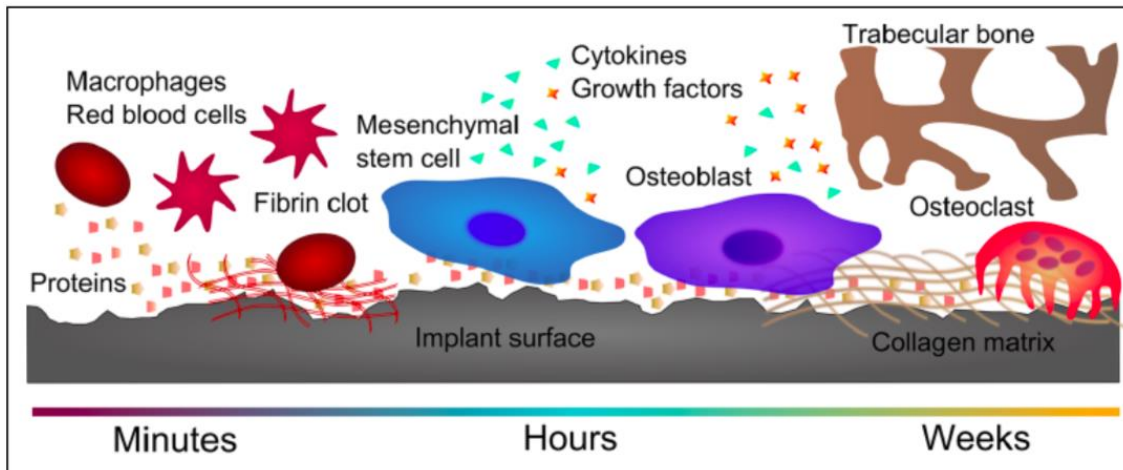


Figura 4. Cronología de la respuesta biológica en la superficie del implante.⁸³

Existen numerosos parámetros estadísticos de la rugosidad de la superficie para caracterizar las superficies nanorrugosas, pero ninguno de ellos por sí solo proporciona una descripción completa de la morfología de la superficie.⁸⁴ Estos parámetros tienen valores por debajo de 2,7 nm pero morfologías superficiales muy diferentes.

4.3. TIPOS DE SUPERFICIES DE IMPLANTES

Las diferentes técnicas de modificación de la superficie de los implantes han resultado en el desarrollo de diversos tipos de superficies:

4.3.1. Superficie mecanizada

Branemark en la década de 1960 desarrollo y puso en práctica las superficies mecanizadas también denominadas lisas.⁴ Era una superficie brillante y aunque se consideraba lisa, el proceso de fresado y pulido creaba una mínima rugosidad en la superficie (entre 0,5-1 μm), cuya composición se trataba de titanio comercialmente puro (Figura 5)⁸⁵.

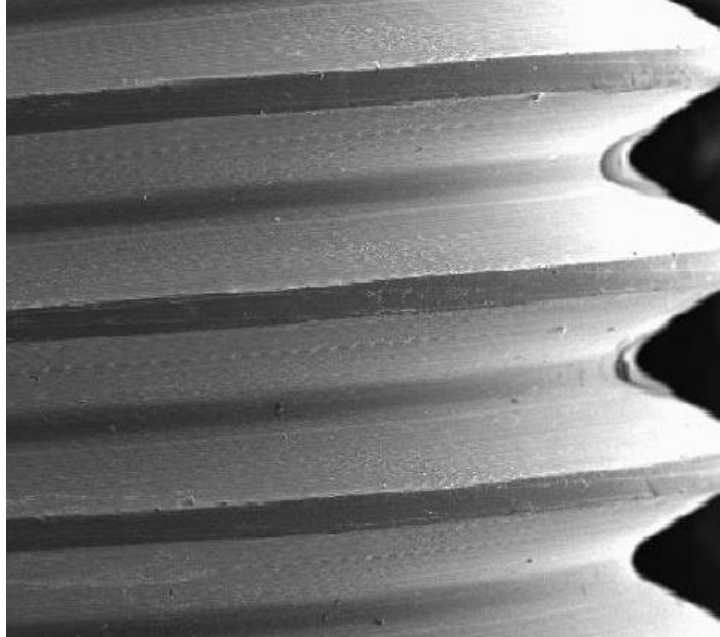


Figura 5. Superficie mecanizada de implante

Desde un punto de vista microscópico las superficies mecanizadas tienen circunferencias paralelas entre sí y perpendiculares al eje largo de los implantes, estas circunferencias son fundamentales para la viabilidad de la osteointegración. Presentan una serie de surcos, donde el tipo de surco y el ángulo de corte depende del tipo de mecanizado recibido. Las superficies lisas son consideradas las superficie más estudiadas ya que los primeros estudios de Branemark fueron realizados con este tipo de superficies ⁸⁶. Durante muchos años se consideró la superficie ideal en implantología, realizándose gran cantidad de estudios, y siendo actualmente una superficie con la que se comparan el resto de nuevas superficies para los nuevos estudios.

INTRODUCCIÓN

A este tipo de superficies también se le puede aplicar un proceso de fotofuncionalización mediante luz ultravioleta, esto altera las propiedades fisicoquímicas, modificando una superficie hidrofóbica a una superficie superhidrofílica, y mejorando las capacidades biológicas, elimina los hidrocarburos de la superficie que actúan como residuos y mejora e induce la actividad de los osteoblastos, mejorando la osteointegración.⁸⁷

4.3.2. Superficies rugosas o tratadas

La topografía de estas superficies es decir el grado de rugosidad y la orientación de estas irregularidades superficiales constituyen desde hace más de 40 años un reto de investigación e interés en la implantología oral. Con el paso del tiempo se ha ido demostrando que el tratamiento de la superficie para incrementar la rugosidad o desarrollar microcavidades, fisuras o grietas mediante diversas tecnologías favorece la unión entre la superficie del implante y el tejido oseo, favoreciendo la osteointegración y mejorando la respuesta tisular osteoblástica resultando así en una mayor resistencia a la compresión, tensión y estrés y proporcionando valores mayores de torque de remoción lo que se vincula a un alto porcentaje de contacto hueso-implante⁸⁸.

Las superficies de los implantes son tratadas con diversas sustancias que provocan diferentes grados de rugosidad. Estas rugosidades se manifiestan en forma de grietas, cavidades o hendiduras con el objetivo de conseguir una superficie más biocompatibles y que mejore la unión hueso-implante⁸⁹

Mediante estudios *in vitro*, estas superficies presentan la evidencia experimental de un incremento en la adherencia celular incrementando la actividad de los osteoblastos al producir un mayor número de proteínas morfogenéticas que estimulan y aceleran la respuesta biológica celular².

INTRODUCCIÓN

Dentro de las modificaciones de este tipo de superficies se puede encontrar diferentes técnicas para conseguir una óptima rugosidad. Entre los principales tratamientos y técnicas empleadas se puede definir:

4.3.2.1. Superficies grabadas con ácidos

El tratamiento por grabado ácido de la superficie (acid-etching): mediante la inmersión del material en ácidos fuertes como pueden ser ácido fluorhídrico (HF), ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido nítrico (HNO_3) o ácido clorhídrico (HCl) consigue el desprendimiento de partículas de metal de la superficie de los implantes consiguiendo unos microporos en la superficie entre 0,5 y 2 μm (Figura 6).

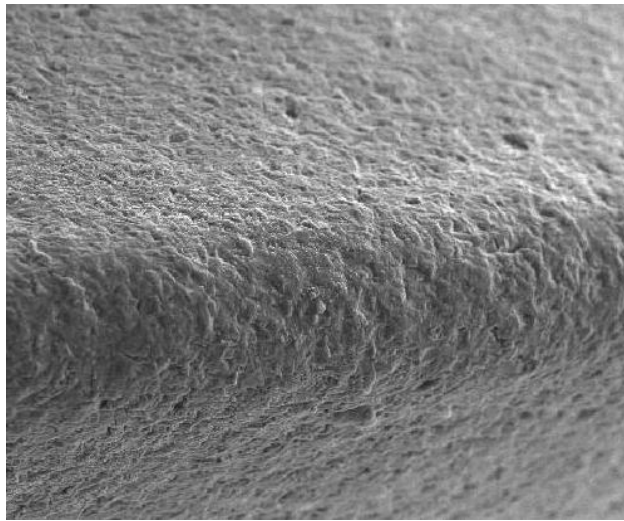


Figura 6. Superficie grabada de implante

El grabado de la superficie de los implantes con diferentes combinaciones de ácidos (ácido nítrico, clorhídrico, sulfúrico, etc) fue desarrollado para aumentar el grado de rugosidad y mejorar la respuesta

INTRODUCCIÓN

biológica⁹¹. La adherencia celular es estimulada, y la actividad de la fosfatasa alcalina y la osteocalcina se incrementan significativamente. Estos hallazgos mediante estudios *in vivo*, implican que las características químicas de las superficies tratadas con ácidos, juegan un importante papel en su respuesta celular pudiendo mejorar la oseointegración⁹²⁻⁹³.

4.3.2.2. Superficies arenadas

El tratamiento por chorreado de partículas (grit-blasting) o arenado (sand-blasting) consiste en chorrear la superficie de los implantes mecanizados con partículas de diversos materiales. Estas partículas pueden ser de óxido de aluminio (Al_2O_3), óxido de titanio (TiO_2) y fosfatos cálcicos (hidroxiapatita, fosfato beta-tricálcico). Al colisionar estas partículas sobre la superficie del titanio forman depresiones irregulares llamadas macrorrugosidades⁹⁰⁻⁹³.

La rugosidad que produce el óxido de aluminio (Al_2O_3) varía según la granulometría del material chorreado, es un material insoluble en ácido por lo que es difícil de eliminar de la superficie del titanio después del tratamiento pudiendo esto interferir en la osteointegración del implante. Las partículas de TiO_2 suelen ser de unos 25 μm estas producen una rugosidad en la superficie de entre 1-2 μm (Figura 7). La hidroxiapatita y el betafosfato tricálcico son materiales que son reabsorbibles, esta cualidad los hace fácilmente retirables de la superficie de titanio después de su tratamiento⁹⁰⁻⁹³.

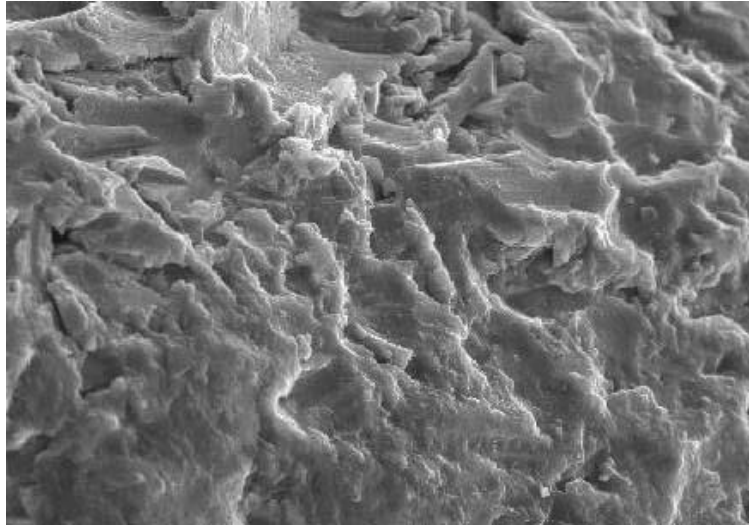


Figura 7. Superficie arenada de implante

En las superficies chorreadas o arenadas se ha demostrado que se produce un incremento en la adhesión, proliferación y diferenciación osteoblástica ⁹⁰. Los estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la rugosidad de la superficie arenada estimula la oseointegración de los implantes dentales⁹².

4.3.2.3. Superficies arenadas y grabadas

El tratamiento por chorreado de partículas y asociado a un tratamiento ácido se puede asociar con el objetivo de unir las dos propiedades, se obtienen macrorrugosidades(2 μm) con el chorro de partículas y microrrugosidades (1,3 μm) mediante el tratamiento ácido (Figura 8) ^{89,93-94}.

El grado de rugosidad de la superficie arenadas y grabadas de los implantes, pueden afectar a la función celular, la adhesión y la viabilidad. Las células cultivadas sobre las superficies de los implantes tratados (arenado y grabado ácido) muestran más signos de diferenciación celular que las células cultivadas sobre superficies mecanizadas ⁸⁹.

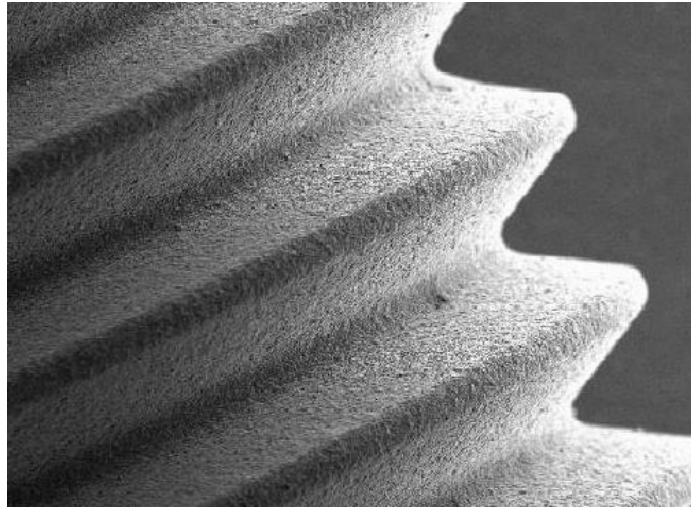


Figura 8. Superficie arenada y grabada de implante

Estudios *in vitro* demuestran que la superficie tratada con arenado y grabado ácido, incrementa la rugosidad del implante, y puede mejorar la adhesión de células de estirpe osteoblástica y tener un efecto sobre la configuración y conformación de pseudópodos celulares lo que aumentaría la proliferación celular en la superficie del implante ⁹³⁻⁹⁴.

4.3.2.4. Otros tipos de tratamientos de la superficie.

Se pueden obtener superficies mediante tratamiento láser, este tipo de tratamiento crea rugosidades con una profundidad, dirección, tamaño y orientación controlados. Tiene un índice de contaminación bajo ya la superficie no tiene contacto con ninguna sustancia química.

También se pueden encontrar superficies obtenidas mediante la adición o aposición de material como son el plasma de titanio o la hidroxiapatita ⁸⁸. Los implantes cuya superficie están recubiertas con plasma de titanio tienen un incremento de la superficie de contacto hueso-implante (BIC) y estimula la

INTRODUCCIÓN

osteogénesis por mecanismos de adhesión celular, estos implantes son más resistentes a las cargas funcionales convencionales, a la tracción y cizallamiento ⁹³.

La sinterización de la superficie se produce por la adición de partículas de titanio esféricas a una temperatura elevada, estas partículas se condensan y fusionan formando una capa de 30 μm aproximadamente. Con este procedimiento, la superficie TPS presenta una rugosidad (poros) aproximada de 7 μm ⁹⁵. También ha sido utilizada la Hidroxiapatita para incrementar la rugosidad de la superficie de los implantes de forma similar a la de TPS. La unión entre esta superficie y el hueso es mayor que la del titanio. De hecho se ha demostrado histológicamente que la superficie recubierta de hidroxiapatita provoca una mayor adhesión osteoblástica y proliferación de la matriz extracelular que mejora la unión hueso-implante ⁹⁶.

En los tratamientos por anodización donde mediante inmersión en un medio electroquímico, se consiguen superficies micro o nanoporosas mediante anodización potencioestática, galvanostática u oxidación electrolítica en ácidos fuertes (H_2SO_4 , H_3PO_4 , HNO_3 , HF) a alta densidad ($200\text{A}/\text{m}^2$) o potencial (100 V).

Se ha observado que la rugosidad establecida mediante arenado y grabado ácido (SB + AE) es la que proporciona una mayor viabilidad a las células osteoblástica; esta rugosidad varía los grados de hidrofilia y los componentes polares y dispersivos de la energía superficial que favorecen la viabilidad osteoblástica y la expresión de genes óseos ⁹⁷.

INTRODUCCIÓN

La rugosidad de SB + AE favorece el comportamiento de las células osteoblásticas pero también favorece la colonización bacteriana ^{82,97}. La rugosidad favorece la formación de biopelículas y se debe alcanzar una rugosidad de compromiso para una buena viabilidad celular y la peor para la adhesión bacteriana.

En el procedimiento de la colocación de un implante dental, el primer componente que contacta con el tejido es la superficie del implante, con sus diferentes tipos de alteraciones y modificaciones que se han investigado y realizado, cuyo objetivo es aumentar la remodelación ósea a través del implante y permitir la rehabilitación del implante lo más pronto posible, incluso favorecer una carga inmediata ⁹⁸.

El aumento de la rugosidad superficial en la zona marginal de los implantes, favorecen la colonización bacteriana y por consiguiente el riesgo de periimplantitis. Es necesario encontrar el equilibrio entre el beneficio y el perjuicio. Se han desarrollado diferentes métodos de pasivación para crear superficies estables de óxido de titanio. Las superficies obtenidas por anodización química y electroquímica produce una mejora en la resistencia a la corrosión del implante dental, una limpieza total de las superficies de titanio y una reducción muy significativa en la liberación de iones de titanio, pero no mostraron diferencias estadísticamente significativa en la colonización bacteriana ⁹⁹.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La topografía de las superficies de titanio y sus aleaciones pueden influir en la formación ósea, la adsorción de proteínas y la interacción de los osteoblastos con el biomaterial.¹ Estos aspectos juegan un papel fundamental en la generación de nuevas células osteoblásticas y en el mecanismo de osteoconducción. Además, la rugosidad del titanio conduce a un aumento en el proceso de diferenciación osteoblástica a través de variaciones en la regulación transcripcional o expresión génica de factores osteogénicos debido a variaciones morfológicas de las células causadas por la topografía de la superficie del titanio ².

Se está investigando que las características físicas y químicas de la superficie de los implantes dentales pueden influir en el desarrollo de una mejor respuesta tisular del huésped, como la energía, la carga y la composición de estas superficies han sido modificadas con el objetivo de mejorar la interfase hueso-implante ⁵.

Se ha podido determinar la influencia en la adhesión, proliferación y diferenciación de osteoblastos con diferentes topografías de implantes en estudios experimentales ³⁰. La superficie rugosa de titanio puede favorecer la expresión de la fosfatasa alcalina ³¹. La influencia de la rugosidad en el comportamiento de la expresión de citocinas y factores de crecimiento mediados por células osteoblásticas ha sido demostrado en estudios in vitro ³³.

Estos aspectos juegan un papel fundamental en la generación de nuevas células osteoblásticas y en el mecanismo de osteoconducción. Además, la rugosidad del titanio conduce a un aumento en el proceso de

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

diferenciación osteoblástica a través de variaciones en la regulación transcripcional o expresión génica de factores osteogénicos clave debido a variaciones morfológicas de las células causadas por la topografía de la superficie del titanio ²⁴.

A la semana de la inserción del implante, comienza la formación de hueso nuevo y los contactos óseos primarios se complementan con contactos óseos secundarios recién formados ⁴³. Histológicamente, el hueso que se forma después de una lesión se caracteriza porque sus fibras de colágeno no son paralelas, estas fibras están orientadas al azar. Este hueso crece a lo largo de la superficie ósea existente y a lo largo de la superficie del implante dental hacia las ranuras de las roscas. Se ha demostrado que los restos óseos creados al realizar el lecho implantario son importantes para la formación temprana de hueso y se incorporan a las trabéculas inmaduras del hueso entretejido ⁴⁴.

En la fase proliferativa los progenitores de osteoblastos aumentan la actividad de la fosfatasa alcalina y se consideran preosteoblastos ⁵². La transición de preosteoblastos a osteoblastos maduros se caracteriza por existir un aumento en la expresión del gen *Osx* y de la secreción de proteínas de la matriz ósea como la osteocalcina, la sialoproteína ósea I/II y el colágeno tipo I ⁵⁴.

Durante la transición osteoblastos/osteocitos, el proceso citoplasmático comienza a emerger antes de que los osteocitos hayan sido encerrados en la matriz ósea.⁵⁹ La comunicación célula-célula también se logra mediante el líquido intersticial que fluye entre los procesos de los osteocitos y los canalículos. Estas células actúan como mecanosensores ya que su red interconectada tiene la capacidad de detectar presiones y cargas

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

mecánicas, ayudando así a la adaptación del hueso a las fuerzas mecánicas diarias ⁶¹. Actúan como orquestadores de la remodelación ósea, a través de la regulación de las actividades de los osteoblastos y osteoclastos. La apoptosis de los osteocitos es una señal quimiotáctica de la reabsorción ósea osteoclástica ⁶².

Las superficies de los implantes se vuelven reactivas cuando se exponen a fluidos biológicos (p. ej., sangre), formando dióxido de titanio que sirve como una capa de pasivación que determina la biocompatibilidad del implante ⁶⁵. Sin embargo, las propiedades electroquímicas/fisicoquímicas del dióxido de titanio son fundamentalmente diferentes en comparación con los tejidos duros dentales mineralizados, que parecen crear un microambiente distinto que afecta la adherencia de los primeros colonizadores orales y puede alterar las interacciones entre especies asociadas con la salud periimplantaria ⁶⁵. Para superar estos obstáculos, se ha aplicado una diversidad de modificaciones físicas, químicas y biológicas a la superficie de los implantes de titanio para mejorar su rendimiento biológico y los resultados de la osteointegración ⁸⁹⁻⁹³.

De hecho, las células óseas humanas tienen una capacidad de adhesión muy baja a las superficies metálicas lisas, y el uso de estos materiales podría provocar inflamación y baja viabilidad celular. Por esta razón, se han propuesto modificaciones que afectan la rugosidad, la topografía y la química de la superficie del implante para aumentar la viabilidad celular y la biocompatibilidad como son las superficies rugosas ⁶⁸.

Durante las últimas décadas se ha desarrollado una ingente investigación experimental y clínica para mejorar continuamente el éxito a

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

largo plazo de las superficies de los implantes dentales y reducir el tiempo para alcanzar niveles altos de osteointegración ya que contribuyen en los procesos biológicos al mediar en la integración de los osteoblastos¹⁰. Se ha desarrollado y aplicado una serie de modificaciones superficiales en los implantes comercializados mediante diferentes métodos de sustracción y adicción⁹⁰⁻⁹³.

Teniendo en cuenta la evidencia experimental sobre la investigación en las superficies de los implantes dentales, con respecto a su desarrollo, topografía, y respuesta celular, el objetivo general del presente estudio de investigación doctoral es evaluar la influencia del tipo de superficie sobre la respuesta biológica, especialmente relacionada con las células involucradas en el metabolismo óseo.

Los objetivos específicos son:

1. Determinar la rugosidad de las superficies de los implantes dentales y su influencia en el metabolismo óseo.
2. Evaluar la viabilidad celular en diversas superficies de implantes dentales.
3. Evaluar la respuesta osteoblástica y su expresión génica en diferentes topografías de las superficies de implantes.

MATERIAL
Y
MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio doctoral ha sido realizado en la Facultad de Odontología de la Universidad de Sevilla en el Máster de Implantología Oral. La fase experimental del presente estudio ha sido realizada en la Universidad Politécnica de Cataluña en Barcelona en el Instituto de Tecnología y Bioingeniería.

1.DISCOS DE TITANIO

Discos de titanio comercialmente puro grado 3 fueron estudiados. Las dimensiones de los discos eran de un diámetro de 12 mm y un espesor de 4 mm. El material fué suministrado por la empresa Galimplant ® (Sarria, España).

Según el tratamiento de las superficies de titanio de los discos, se dividieron en 4 grupos:

1. Mecanizados (MA): Los discos muestran la típica abrasión del mecanizado de los implantes sin un tratamiento de la superficie (Figura 1).

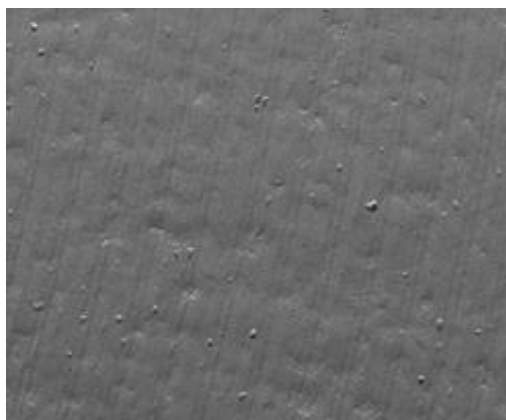


Figura 1. Superficie mecanizada

MATERIAL Y MÉTODOS

2. Arenados+grabados (SB+AE, Sandblasted and acid etching). Los discos fueron tratados con partículas de alúmina 250 a 450 μm con una presión de 2.5 bar a una distancia de la superficie de 100 mm. Los discos fueron lavados con agua destilada y tratados por inmersión en una mezcla 1:1 de ácido clorhídrico y ácido nítrico durante 45 segundos (Figura 2).

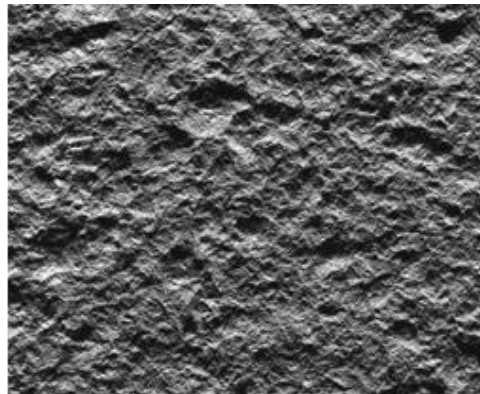


Figura 2. Superficie arenada y grabada

3. Arenados (SB, Sandblasted en inglés): Estos discos se han expuestos al proceso de arenado, sin tratamiento con ácidos. Solamente han sido tratados con alúmina. Alrededor del 3% de las partículas abrasivas de alúmina suelen permanecer incluidas en esta superficie rugosa (Figura 3).

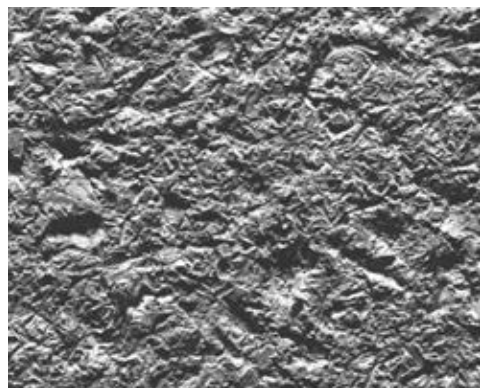


Figura 3. Superficie arenada

MATERIAL Y MÉTODOS

4. Grabados con ácidos (AE, Acid etching en inglés). Estos discos se elaboraron con una mezcla 1:1 de ácido clorhídrico y ácido nítrico durante 45 segundos (Figura 4).

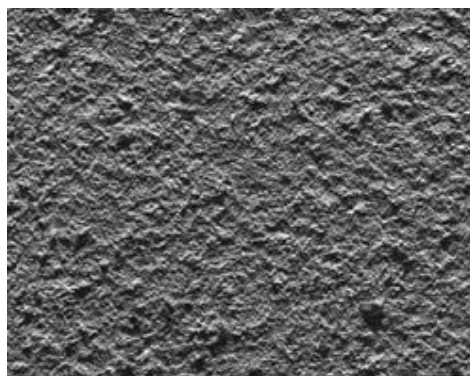


Figura 4. Superficie grabada

La limpieza de las muestras de las superficies estudiadas fue realizada con alcohol metílico durante 15 minutos en un baño de ultrasonidos y en acetona durante 5 minutos. El secado de las muestras se realizó con aire caliente.

2. ANALISIS DE LAS SUPERFICIES DE LOS DISCOS DE TITANIO

La topografía de la superficie de los discos de titanio fué observada por microscopio electrónico de barrido con un modelo Zeiss Neon40 FE SEM ® (Carl Zeiss NTS GmbH, Jena, Alemania). La pulverización catódica no fué necesaria para mejorar la conductividad eléctrica. Se utilizó un potencial de aceleración electrónica de 5KV. La distancia de trabajo fue de 7 mm²⁴.

La rugosidad de las superficies de titanio se determinó utilizando diez muestras para cada superficie estudiada. Se analizaron tres localizaciones para cada muestra (4 superficies×10 muestras/superficie×3 localizaciones/muestra).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó un microscopio interferométrico Wyko NT1100 ® (Veeco Instruments, Plainview, EE.UU.) de luz blanca y haz ortogonal en la superficie (Figura 5). Se utilizó un aumento constante con un objetivo de 5 aumentos. La rugosidad se determinó en un área de escaneo de 1 x 0,5 mm. Se obtuvieron 10 valores para cada superficie en las diferentes áreas ²⁴.



Figura 5. Interferómetro de luz blanca.

La altura media aritmética (R_a), la asimetría de la superficie (R_{sk}), que mide la asimetría de la distribución de la altura del perfil, y la curtosis de la superficie (R_{ku}), que representa la nitidez de la distribución de la altura o el "pico" del perfil fueron estudiados ^{7,92}. Los resultados se analizaron utilizando el software Wyko Vision 232TM 3Xb ® (Veeco Instruments Plainview, Nueva York, EE. UU.).

La humectabilidad de los cuatro tipos de superficies se determinó mediante la técnica del ángulo de contacto estático siguiendo la técnica de la gota sésil en condiciones estáticas y a una temperatura de 25°C ²³. Se analizaron seis muestras para cada tratamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estas mediciones se llevaron a cabo con un instrumento OCA15 Plus[®] (Dataphysics, Filderstadt, Alemania) (Figura 6). El volumen de caída fue de 3 μ L y la tasa de dosificación fue de 1 μ L/min. Los fluidos utilizados fueron agua destilada ultrapura (Millipore Milli-Q[®], Merck Millipore Corporation, Burlington, EE. UU.) y diiodometano (Sigma-Aldrich[®], Barcelona, España).



Figura 6. Instrumento OCA15 Plus.

La determinación de la energía libre superficial se calculó mediante la ecuación de Owens y Wendt¹⁰⁰.

$$\gamma_L(1 + \cos \theta) = 2 \left((\gamma_L^d \gamma_S^d)^{\frac{1}{2}} + (\gamma_L^p \gamma_S^p)^{\frac{1}{2}} \right)$$

Donde γ^d e γ^p son componentes dispersivos y polares, respectivamente. γ_L corresponde a la de la tensión superficial del líquido y θ es el ángulo de contacto entre el líquido (L) y el sólido (S).

MATERIAL Y MÉTODOS

Los datos se analizaron con el software SCA 20 3240 ® (Dataphysics Filderstadt, Alemania). Se realizaron tres mediciones para tres muestras diferentes en cada serie.

3. ANALISIS DE LA ACTIVIDAD CELULAR OSTEOLASTICA

Se utilizaron células osteoblásticas (SaOS-2 ®; ATCC, Manassas, EE.UU) para los estudios *in vitro*. Se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) y medio 5A modificado de McCoy. A estas dos soluciones, agregamos 10% de suero bovino fetal (FBS) y 50µg/mL L-glutamina y penicilina/estreptomicina a una concentración de 2 mM (Invitrogen ®, Carlsbad, EE.UU.). Las muestras celulares se cultivaron a 37°C (temperatura corporal) incubadas en un 5% de CO₂ en condiciones de humedad ²⁴.

Las células confluentes se separaron del cultivo mediante incubación con TrypLE (Invitrogen ®, Carlsbad, EE. UU.) durante 1 min. La dilución celular se centrifugó y se colocó en un nuevo medio de cultivo. Posteriormente, los discos de titanio se sembraron en las diferentes superficies con una concentración celular de 5000 células por cada uno de los discos estudiados/disco y se incubaron a 37 °C. Después de 3 y 21 días de incubación, las células se lisaron con 200 µL/pocillo de M-PER® (Pierce, Rockford, USA) ²⁴.

La proliferación celular se determinó en las diferentes topografías de los discos de titanio utilizando el kit de detección de citotoxicidad LDH ® (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania). El número de células en proliferación es proporcional a la liberación de lactatodeshidrogenasa (LDH) y este lactato se determinó espectrofotométricamente a 492 nm con

MATERIAL Y MÉTODOS

un detector de microplacas ELx800 convencional (Bio-Tek ® Instruments, Inc., Winooski, EE.UU) ²⁴.

La actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) de las células osteoblásticas se determinó mediante el ensayo colorimétrico de fosfatasa alcalina Sensolyte pNPP (Anaspec ®, Fremont, EE.UU). Para la determinación de ALP se utilizó una longitud de onda de 405 nm y la detección se realizó con un lector de microplacas ELx800 convencional (Bio-Tek ® Instruments, Winooski, EE.UU.).

La evaluación de la expresión génica osteoblástica se realizó con la determinación del ARN total en diferentes tiempos de cultivo, el cual se extrajo mediante el Mini Kit RNeasy ® (Qiagen, Hilden, Alemania). El ARN se cuantificó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 ® (NanoDrop Technologies Montchanin, EE.UU.). Se retrotranscribieron cien nanogr a ADNc utilizando el kit de transcripción inversa QuantiTect ® (Qiagen, Hilden, Alemania). Los productos de ADNc se diluyeron a 1 ng/μL y se utilizan como plantillas de reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) ²⁴.

Los primers (secuencias cortas de moléculas de ácidos nucleicos) se seleccionaron de Universal ProbeLibrary ® (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) para amplificar los genes específicos de diferenciación de los osteoblastos. Los primers para genes que presentaban más de una transcripción se seleccionaron de regiones comunes.

Los análisis de SYBR Green RT-qPCR se realizaron con el kit QuantiTect SYBR Green RT-PCR ® (Qiagen, Hilden, Alemania) en una máquina de PCR en tiempo real StepOnePlus ® (Thermo Fisher Scientific,

MATERIAL Y MÉTODOS

Waltham, EE. UU.). La especificidad de cada reacción de RT-qPCR se determinó mediante el análisis de la curva de fusión ²⁴.

4. METODO ESTADÍSTICO

Se utilizó un programa de software estadístico Minitab 13.1 ® (Minitab, Pensilvania, EE.UU.) Para observar si las diferencias entre las diferentes superficies de los implantes eran estadísticamente significativas con respecto a la rugosidad y a la respuesta celular osteoblástica se procedió a realizar un análisis de los tests no paramétricos de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney. La significación estadística fue considerada cuando $p < 0,001$.

RESULTADOS

RESULTADOS

1.MICROSCOPIA Y TOPOGRAFIA DE LAS SUPERFICIES DE TITANIO

Las características microscópicas de las superficies de los diferentes discos de titanio estudiados fueron valoradas por microscopia electrónica de barrido (MEB). Las superficies se pueden observar en la Figura 1.

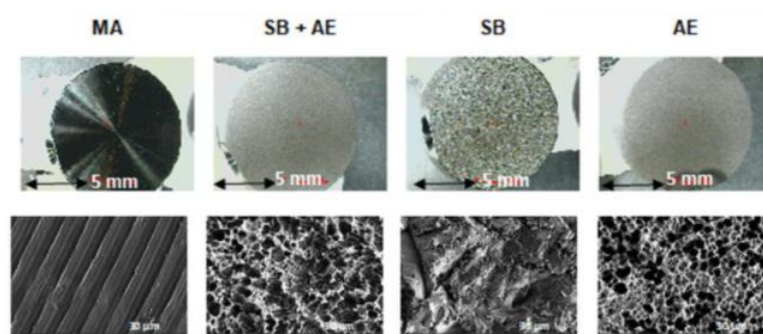


Figura 1
Superficies analizadas por MEB

Los discos de superficies mecanizadas (MA) presentan simplemente los relieves del mecanizado (Figura 2).

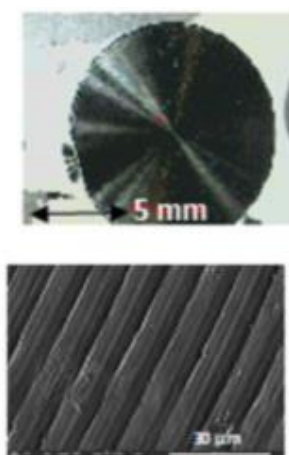


Figura 2.
Superficie mecanizada

RESULTADOS

En la superficie arenada, se aprecian los típicos valles y oquedades de los discos tratados con partículas abrasivas, arenado (SB) (Figura 3) y proyección de partículas abrasivas (arenado) con grabado al ácido (SB+AE)(Figura 4).

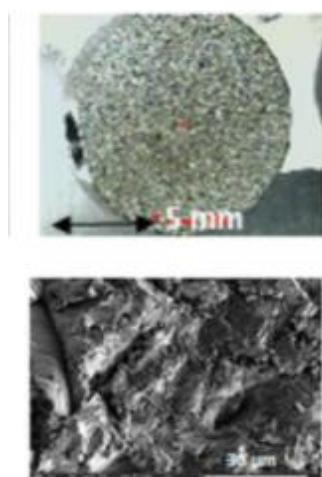


Figura 3.
Superficie arenada

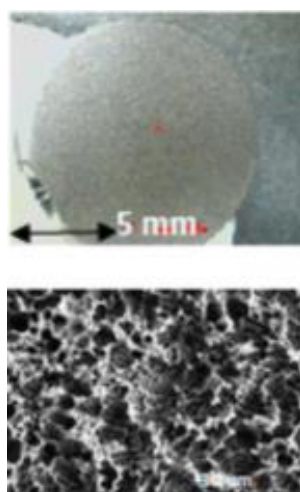


Figura 4
Superficie arenada y grabada

RESULTADOS

En este último caso, se observaron que el grabado ácido en el tratamiento mixto produce una variación muy pequeña en la topografía de los discos de titanio. La contribución más importante de la macrorrugosidad se debe al arenado y al grabado ácido que produce un ataque más microestructural.

Este hecho se puede comprobar observando la topografía de los discos en los que sólo se ha producido el ataque ácido (AE)(Figura 5).

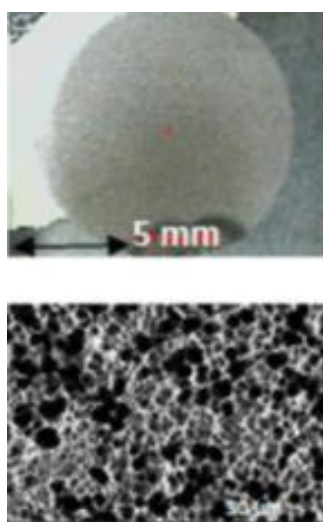


Figura 5
Superficie grabada

La rugosidad de las diferentes superficies se determinó mediante microscopía interferométrica para obtener los diferentes parámetros que caracterizan la rugosidad, como se puede observar en la Tabla 1.

Tabla 1

Significa \pm error estándar de la media del parámetro de rugosidad superficial Ra para los diferentes tipos de implantes e Ti. (* y ** significa significación estadística de las diferencias)

Ti-Disc	MA	SB+AE	SB	AE
Ra (μm)	0.026 ± 0.008	1.235 ± 0.020 *	1.162 ± 0.492 *	0.303 ± 0.112 **

RESULTADOS

Los discos MA muestran los valores más bajos de Ra. (0.026 ± 0.008). Esta rugosidad se define como la rugosidad pico-valle promedio y los valores pueden considerarse una superficie lisa (Figura 6).

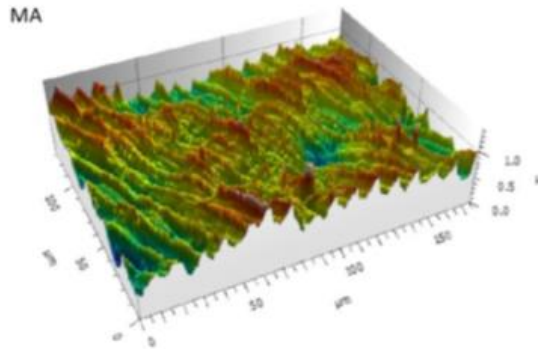


Figura 6
Superficie topográfica de la superficie mecanizada

Los discos que han sido tratados con arenado SB (Figura 7) y arenado + grabado SB+AE (Figura 8) tienen los valores de Ra más altos y no existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Estos resultados muestran la pequeña contribución a la rugosidad del grabado ácido.

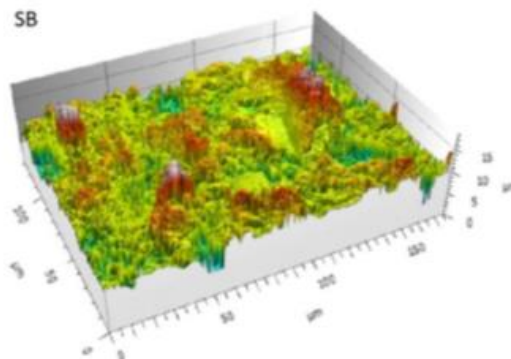


Figura 7
Superficie topográfica de la superficie mecanizada

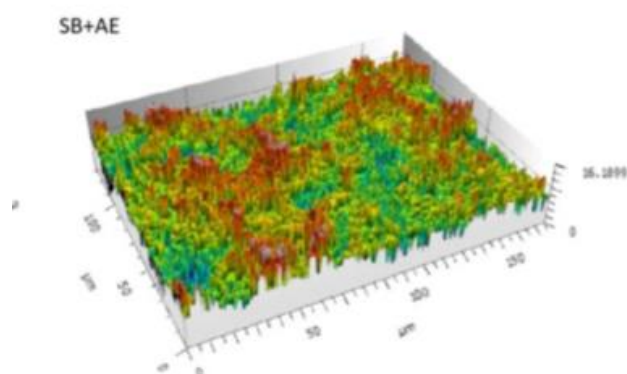


Figura 8
Superficie topográfica de la superficie arenada y grabada

Los discos AE (grabado ácido) (Figura 9) muestran una rugosidad superior a MA e inferior a la correspondiente a los discos SB y SB+AE. La rugosidad de los discos SB y SB+AE presentó diferencias estadísticamente significativas en comparación con los discos AE. ($p < 0.005$).

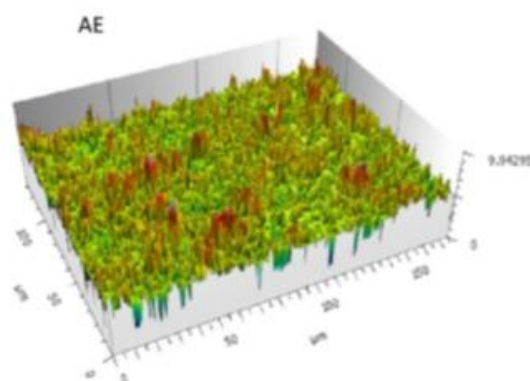


Figura 9
Superficie topográfica de la superficie grabada

Las topografías observadas a mayores aumentos usando FESEM (microscopía electrónica de barrido de emisión de campo) mostraron que los discos tratados con MA tenían una superficie ondulada con surcos

RESULTADOS

debido al procedimiento de mecanizado. Las superficies de los otros discos eran más rugosas e irregulares, especialmente las muestras que habían sido tratadas con chorreado de arena (Figuras 6-9).

En particular, los discos SB revelaron grandes picos y valles de geometría variable con numerosos planos, mientras que las superficies de los otros discos de titanio eran menos nítidas. Los discos expuestos a los procedimientos SB+AE mostraron la mayor rugosidad y una superficie de micropitting heterogénea. Los discos sometidos a AE exhibieron micropitting de diferentes tamaños. Las superficies observadas en las imágenes de microscopía electrónica de barrido coincidieron con las de las representaciones 3D obtenidas por interferometría óptica (Figuras 6-9).

Los ángulos de contacto con el agua (CA) y los valores calculados para la energía libre superficial (SFE) y sus compuestos siguiendo el enfoque de Owens y Wendt se muestran en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2. Ángulos de contacto aparentes para los tres líquidos utilizados en las diferentes superficies de Ti. Los valores son medios \pm Error estándar de la media. Las diferencias estadísticas frente a superficies lisas para cada columna se indican mediante símbolos de asterisco simple * o doble **.

Surface	Water CA' [°]	Di-Iodomethane CA' [°]	Formamide CA' [°]
MA	61.9 \pm 5.0	48.0 \pm 2.9 *	51.0 \pm 1.6
SB+AE	81.9 \pm 5.1 *	36.2 \pm 3.0 **	36.0 \pm 1.3 *
SB	76.7 \pm 6.5 *	56.9 \pm 1.7	58.9 \pm 2.0
AE	63.3 \pm 8.1	37.6 \pm 4.0 **	33.9 \pm 5.0 *

RESULTADOS

En general, el tratamiento con arenado disminuyó la humectabilidad de la superficie, es decir, aumentó el CA. Este efecto fue particularmente pronunciado para aquellas superficies arenadas con partículas residuales de Al_2O_3 .

Tabla 3. Ángulo de contacto del agua, energía libre superficial y sus componentes para las diferentes superficies de Ti. Los valores son medios \pm Error estándar de la media. Las diferencias estadísticas frente a las superficies lisas para cada columna se indican mediante símbolos de asterisco simple * o doble **.

Surface	Surface Free Energy (mJ/m ²)		
	Total Surface Free Energy	Dispersive Component	Polar Component
MA	42.98 \pm 1.70	33.19 \pm 1.94 *	9.79 \pm 2.93 *
SB+AE	42.48 \pm 1.88	29.30 \pm 1.22 *	13.18 \pm 1.20 **
SB	42.95 \pm 1.69	30.99 \pm 0.85 *	11.96 \pm 0.90 **
AE	47.08 \pm 2.92 *	41.10 \pm 2.34 *	6.64 \pm 3.15 *

Al comparar los componentes dispersos o polares de SFE, hubo una tendencia general en los componentes polares a disminuir cuando las muestras contenían albúmina (Tabla 3) ¹⁰¹. Se determinaron diferencias estadísticamente significativas en los componentes polares de las superficies rugosas con albúmina con respecto a las superficies de control y para las muestras tratadas con las partículas más grandes.

2. EVALUACION DE LA RESPUESTA CELULAR OSTEOLASTICA

2.1. VIABILIDAD Y PROLIFERACION CELULAR

La Figura 10, muestra la viabilidad y la proliferación celular para dos puntos de tiempo, 3 y 21 días, utilizando células osteoblásticas. La medida de la viabilidad se ha obtenido determinando que su reducción es proporcional al aumento de la viabilidad de las células osteoblásticas en los diferentes tipos de superficie de titanio. El control se ha tomado como el

RESULTADOS

disco de superficie mecanizada (MA) ya que no está tratado, mostrando como las tres superficies mejoran la viabilidad con respecto a MA.

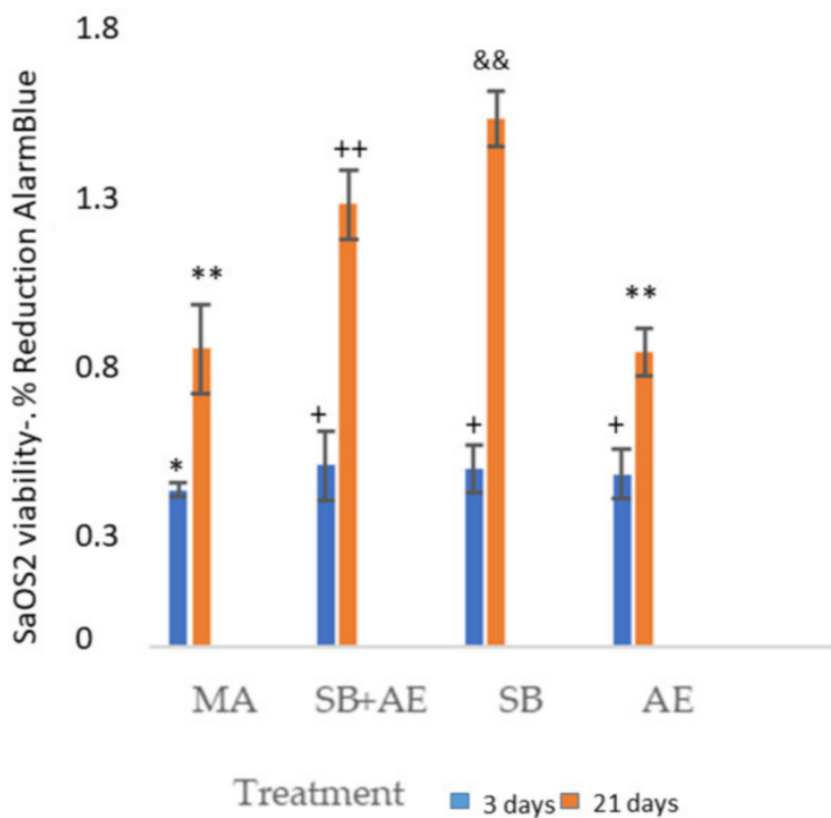


Figura 10

Viabilidad de las células osteoblásticas SaSO-2 a los 3 y 21 días para las diferentes topografías estudiadas. Cada símbolo indica el significado de las diferentes estadísticas.

Se puede observar una viabilidad y proliferación similar para los tres días en los discos de titanio con superficie tratada con arenado de alúmina y grabado ácido. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la viabilidad celular de SB, SB+AE y AE a los 3 días con una $P < 0.001$.

Se observaron diferencias con MA de las otras superficies con un $P < 0.001$. A los 21 días se obtuvo el mejor valor de viabilidad para las

RESULTADOS

superficies que sólo han sido tratadas con arenado. La Figura 11 muestra las células osteoblásticas en las diferentes superficies a 3 y 21 días.

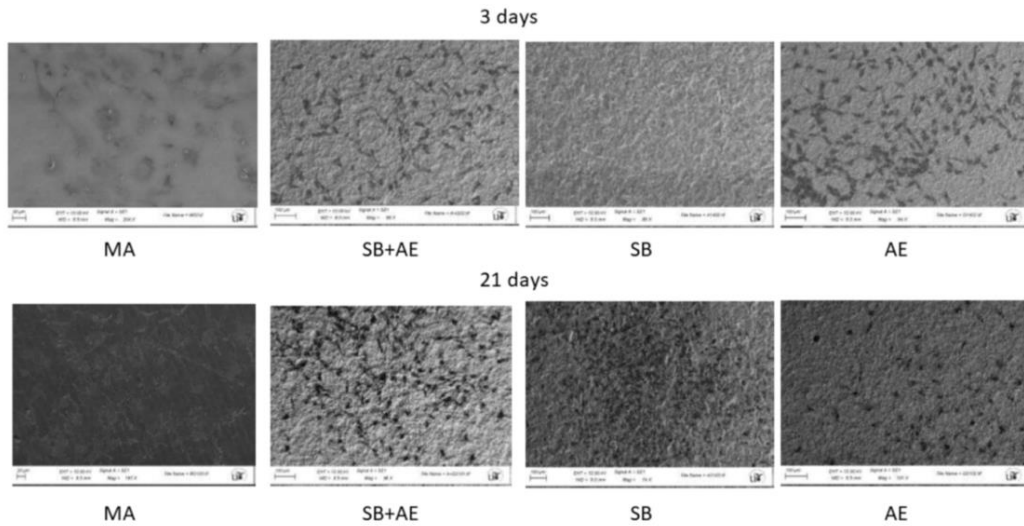


Figura 11
Células osteoblásticas SaOS-2 observadas por SEM a los 3 y 21 días para las diferentes topografías estudiadas.

En la Figura 12, se pueden observar a mayores aumentos los osteoblastos en la superficie MA (a) y en la superficie (SB+AE)(b).

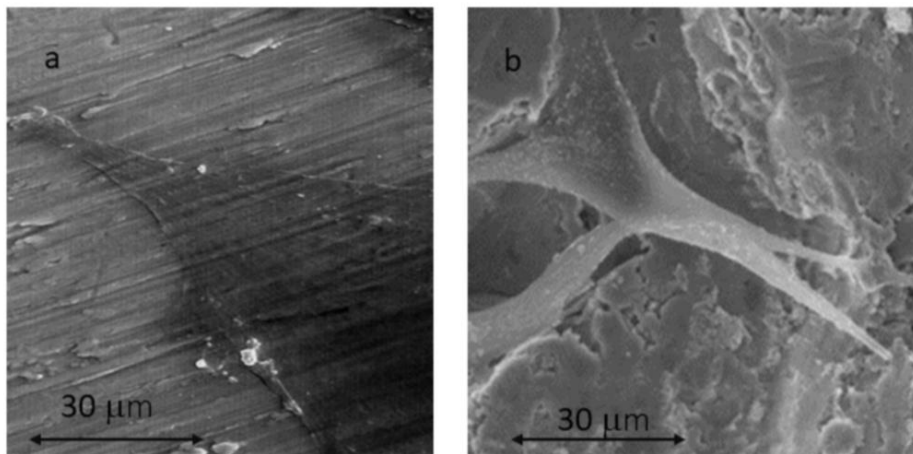


Figura 12
Células osteoblásticas SaOS-2 observadas usando SEM a los 21 días para superficie MA (a) y superficie SB+AE (b)

RESULTADOS

Se observa que la morfología de las células es plana, con mayor actividad en la superficie rugosa SB+AE donde hay mayor actividad dorsal con filopodios y algunos núcleos blanquecinos en la superficie, lo que podría atribuirse a la actividad de mineralización de la célula osteoblástica (Figura 12).

2.2. DIFERENCIACION CELULAR

La Figura 13, muestra los resultados de la fosfatasa alcalina, indicando la diferenciación de las células osteoblásticas experimentando el aumento de esta enzima.

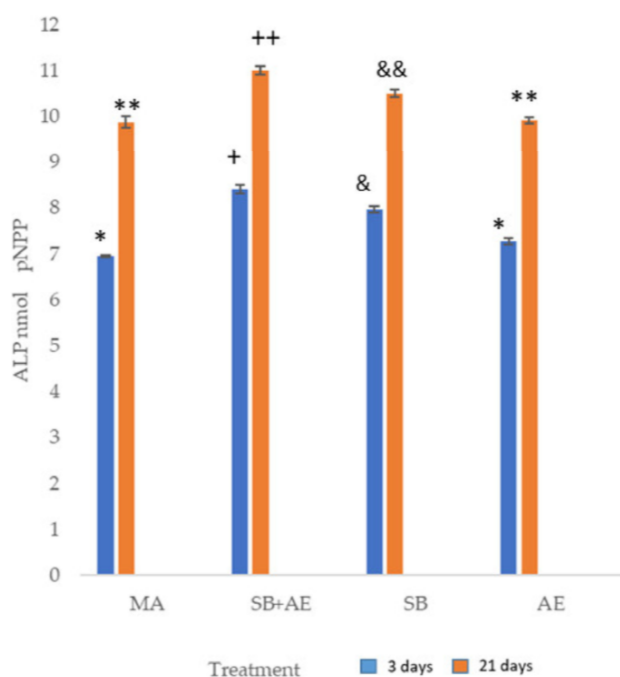


Figura 13

Fosfatasa alcalina de células osteoblásticas SaOS-2 a los 3 y 21 días para las diferentes topografías estudiadas. Cada símbolo indica el significado de las diferentes estadísticas

RESULTADOS

Se puede observar que el día 3 las células no están completamente diferenciadas y los valores de pNPP (Fosfatasa Alcalina) son menores que el día 21. Las superficies con mayor diferenciación son los discos que han sido sometidos a arenado con o sin tratamiento de grabado ácido. La superficie grabada también muestra una mayor diferenciación celular que la superficie mecanizada

2.3. EXPRESION GENICA

La Figura 14 muestra la expresión del gen con respecto a la condición mecanizada M, que consideramos la condición de control.

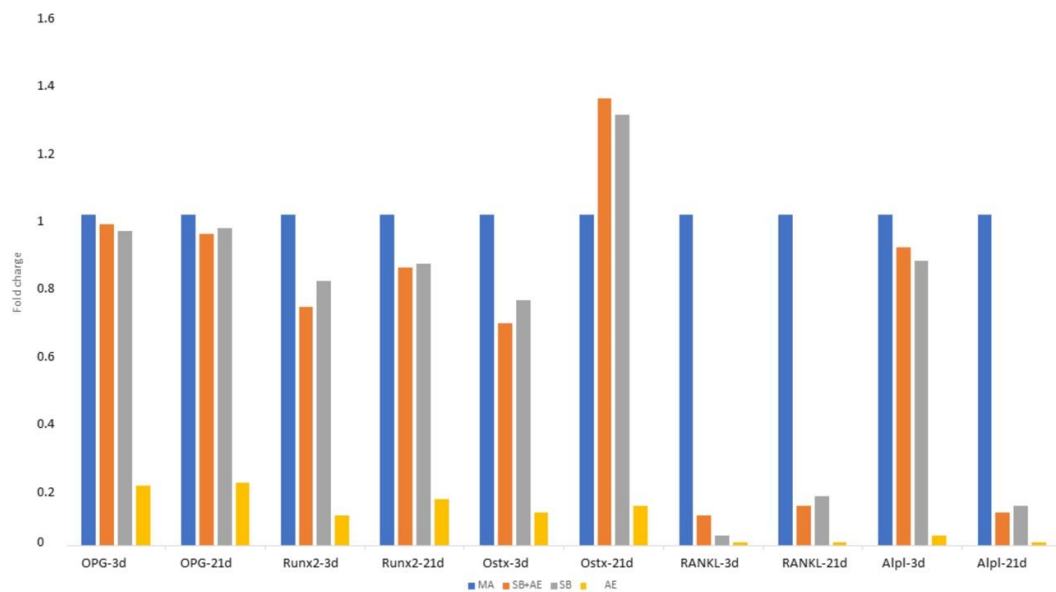


Figura 14.

Expresión genética de células osteoblásticas SaOS-2 a los 3 y 21 días para las diferentes topografías estudiadas.

Se puede observar que en todos los casos excepto en el Ostx se observa una disminución de la expresión génica. El aumento se observó para la condición SB+AE. Se observó una disminución en la expresión

RESULTADOS

génica de los genes OPG, Runx2, RANKL y Alpl en los discos de ataque ácido (Figura 14).

Hay una expresión mayor con respecto al control de Ostx en los discos tratado con arenado y grabado al ácido. Para el gen RunX2 hay un aumento de expresión el día 21 con respecto al día 4 (Figura 14).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El presente estudio de investigación doctoral valora la respuesta osteoblástica a diferentes superficies de implantes dentales de titanio. En este sentido, el estudio analiza la rugosidad de las superficies y su influencia en el metabolismo óseo, mediante la evaluación de la viabilidad celular osteoblástica y su expresión génica en diferentes topografías de las superficies de implantes ²⁴.

La investigación básica y clínica de las superficies de los implantes de titanio ha despertado un gran interés en las últimas décadas en el campo de la implantología oral ^{50,70,74,92}. Numerosos estudios *in vitro*, *in vivo* y clínicos han determinado la influencia de las superficies de los implantes dentales en conseguir la oseointegración como base científica para la carga funcional y el éxito a largo plazo del tratamiento con implantes dentales ^{2,7,9,24,43,93}.

Muchos materiales diferentes de implantes han sido utilizados en diversas aplicaciones clínicas en la odontología, dependiendo de su eficacia y disponibilidad. Los implantes dentales deben poseer algunas características o propiedades como la biocompatibilidad, la resistencia a la corrosión y al desgaste, propiedades biomecánicas y pos supuesto capacidad de oseointegración para asegurar una utilización clínica segura y óptima ¹⁰².

Desde los años 80 del siglo XX, el titanio y sus aleaciones se ha empleado extensivamente en la elaboración de los implantes dentales por sus propiedades biológicas y biomecánicas favorables. El titanio se ha utilizado en el diseño de los implantes dentales por su bajo módulo de elasticidad, bajo peso específico, extraordinaria resistencia a la corrosión, y una excepcional biocompatibilidad ¹⁰³⁻¹⁰⁴.

DISCUSIÓN

Las propiedades biológicas de las superficies de los implantes dentales constituyen uno de los factores más importantes para conseguir el éxito a largo plazo del tratamiento con implantes dentales. El titanio comercialmente puro se ha convertido en un material ideal para la rehabilitación de las áreas edéntulas ya que proporciona la unión con el hueso del paciente durante un largo periodo de tiempo ^{16,18,20,90,97}.

Para conseguir y mejorar la oseointegración y obtener una tasa elevada de éxito, se han realizado diversos procedimientos para modificar la superficie de los implantes dentales. En este sentido, se han utilizado tratamientos con arenado, grabado ácido, arenado+grabado, anodización, recubrimientos que han modificado la topografía y la composición química de las superficies de los implantes. La consecuencia de estos tratamientos es una mayor rugosidad de la superficie de los implantes. El control en la rugosidad de la superficie del implante puede proporcionar un método favorable para mejorar la oseointegración ^{73,79,82}.

En la actualidad, los implantes dentales con superficie mecanizada o pulida no se están empleando ya que está demostrado que los implantes con superficie rugosa y el aumento en la topografía favorece la actividad osteoblástica, disminuyendo los tiempos y aumentando el grado de osteointegración. La rugosidad provoca un aumento muy importante en la superficie, aumentando la interfase hueso e implante hasta 5 y 8 veces la superficie real mecanizada y consecuentemente aumentando la fijación mecánica ^{80-81,83,102-104}.

Se han desarrollado unos implantes denominados híbridos, estos poseen la parte pulida en la zona de la conexión y en las dos o tres primeras espiras del implante dental. Este diseño fue creado para tratar de evitar o

DISCUSIÓN

disminuir la formación de biofilm en procesos de periimplantitis ya que la colonización bacteriana es menor en las partes pulidas del implante dental, por lo que estarían indicados en aquellos pacientes con antecedentes periodontales que yinen una mayor incidencia de patología inflamatoria periimplantaria ¹⁰⁵⁻¹⁰⁶.

El tratamiento de la superficie mediante el arenado con partículas de alúmina es el tratamiento más frecuente para los implantes dentales ya que permite optimizar la rugosidad del implante dental a la afinidad de las células osteoblásticas. El tamaño de las partículas abrasivas, la naturaleza de estas partículas, la presión de impacto y la distancia entre la fuente de emisión y la superficie del implante se pueden modular para obtener una rugosidad óptima. En este estudio de investigación doctoral se emplearon unas partículas de 250 a 450 μm , con una presión de impacto de 2,5 bares a una distancia de 10 cm para poder alcanzar una rugosidad apropiada ⁸¹⁻⁸³.

El posterior ataque ácido no aumenta significativamente la rugosidad, pero sí crea una microrrugosidad en combinación con la macrorrugosidad obtenida por arenado, lo que mejorará el comportamiento biológico. Aumentar el tamaño de las partículas, la abrasividad de las partículas, la presión de impacto o disminuir la distancia entre la fuente de emisión y la superficie aumentaría la rugosidad. En cualquier caso, una mayor rugosidad facilitaría la colonización bacteriana. Esta es la razón por la que los valores óptimos de rugosidad (Ra) deben oscilar entre 0,9 y 1,9 μm ⁸¹⁻⁸³.

El tratamiento de la superficie de los implantes dentales mediante el grabado ácido es un procedimiento que aumenta ligeramente la rugosidad del implante dental. Sin embargo, como se ha podido comprobar en los resultados del presente estudio doctoral, el aumento es pequeño. Sería un

DISCUSIÓN

error tratarlo con ácidos de mayor concentración ya que la rugosidad aumentará verticalmente pero no horizontalmente (distancia entre picos) y este aumento de profundidad no favorece la oseeintegración. Además, el aumento de la concentración en los ácidos podría producir una incorporación de hidrógeno en el titanio, provocando la formación de hidruros y provocando fragilización por hidrógeno, reduciendo drásticamente las propiedades mecánicas. En este caso, el implante debe ser sometido a un tratamiento térmico de eliminación de hidrógeno llevando este a temperaturas superiores a 150°C durante 1 hora^{97,100}.

La combinación del arenado y el grabado ácido ha dado lugar a una superficie que mejora la oseeintegración en intensidad y rapidez¹⁰⁷⁻¹⁰⁸. Esta superficie SLA constituye por su frecuencia e importancia, una superficie muy extendida en la elaboración de los implantes dentales actuales^{8,19,24}. Topográficamente, esta superficie presenta una rugosidad con valles, grietas y micropicos que incrementa la superficie de contacto entre el implante y el hueso del huésped. Además ha demostrado buenas propiedades biológicas favoreciendo el crecimiento y la diferenciación celular osteoblástica¹⁰⁷⁻¹⁰⁸.

En el presente estudio de investigación doctoral se utilizaron 4 tipos de discos con diferentes superficies, mecanizadas, arenadas, grabadas y arenadas+grabadas. La rugosidad de las diferentes superficies se determinó mediante microscopía interferométrica para obtener los diferentes parámetros que caracterizan la rugosidad (Tabla 1 de Resultados). Los discos mecanizados mostraron los valores más bajos de Ra. Esta rugosidad se define como la rugosidad pico-valle promedio y los valores pueden considerarse una superficie lisa. Los discos que han sido tratados con

DISCUSIÓN

arenado y arenado + grabado SB+AE presentaron los valores de Ra más altos. Estos resultados mostraron la pequeña contribución a la rugosidad del grabado ácido. Los discos grabados mostraron una rugosidad superior a la mecanizada e inferior a la correspondiente a los discos con arenado. La rugosidad de los discos con arenado presentó diferencias estadísticamente significativas en comparación con los discos con grabado.

El presente estudio de investigación doctoral ha demostrado que estos cambios topográficos relacionados con las superficies de los implantes, tienen su influencia en los ángulos de contacto (Tabla 2 de Resultados). En general, el tratamiento con arenado disminuyó la humectabilidad de la superficie, es decir, aumentó el ángulo de contacto con el agua. Este efecto fue particularmente pronunciado para aquellas superficies arenadas con partículas residuales de alúmina. En cambio, el ángulo de contacto fué menor en las superficies grabadas y mecanizadas.

En este sentido, los materiales arenados aumentan el ángulo de contacto y la componente polar de la energía superficial, aspectos que favorecen el comportamiento biológico de las células osteoblásticas. Además, los tratamientos con arenado provocan un estado tensional compresivo en la superficie que mejora significativamente la resistencia del implante dental a la fatiga. Este estado de compresión superficial, provoca un retraso en el riesgo de la nucleación de grietas en la superficie debido a las cargas masticatorias cíclicas, y no está presente en los implantes mecanizados o grabados con ácido. Por ello, estos implantes tendrán un peor comportamiento biomecánico a largo plazo ⁹⁷.

Las superficies de los implantes dentales con una tensión de humectabilidad mayor de 30 mN/m son hidrofóbicas, mientras que las

DISCUSIÓN

superficies con una tensión de humectabilidad menor de 30 mN/m son hidrofílicas. En este sentido, las superficies hidrofílicas con un ángulo de contacto de 40-70 presentan una buena respuesta biológica a los fluidos y células del organismo humano ¹¹⁰⁻¹¹¹.

El volumen de los implantes dentales afecta a su capacidad biogénica cuando se modifica el ángulo de contacto. También, cuando el ángulo de contacto se incrementa con los componentes celulares y biológicos. Los implantes con una hidrofilia extrema y superficie irregular desarrollan una interfase hueso-implante favorable y son los mejores candidatos para conseguir la oseointegración ¹¹⁰.

Por lo tanto, con respecto al grado de humectabilidad, las superficies hidrofílicas son mejores que las superficies hidrofóbicas por su afinidad a las células y a los compuestos biológicos. Sin embargo, las superficies de los implantes de titanio tratadas químicamente, con un incremento de la hidrofiliidad y de la energía libre superficial pueden contaminarse con hidrocarburos ¹¹².

Los discos analizados en el presente estudio de investigación doctoral no presentaban ningún tipo de porosidad ya que estaban fabricados en titanio trabajado en frío, que es el mismo material que se utiliza para fabricar los implantes dentales. Por tanto, es sólo la rugosidad la que influye en el comportamiento biológico y se ha observado que la rugosidad establecida mediante arenado y grabado ácido es la que confiere una mayor viabilidad a las células osteoblásticas ¹⁰⁷⁻¹⁰⁸.

Se ha observado que esta rugosidad varía los grados de hidrofilia y los componentes polares y dispersivos de la energía superficial que favorecen

DISCUSIÓN

la viabilidad osteoblástica y la expresión genética en el metabolismo óseo. El efecto de los residuos de alúmina en la superficie se ha demostrado en varios estudios, ya que un 3% de las partículas empleadas permanecen impactadas en la superficie tras el tratamiento ^{33,92,97,109}.

En un estudio con el mismo tipo de discos y superficies, se observó que los microanálisis de dispersión de energía de rayos X mostraron la presencia de aluminio y oxígeno en las muestras de discos arenados debido al uso de alúmina como partícula abrasiva para el tratamiento de arenado ³³. Estas partículas están incrustadas en la superficie del implante dental. Esto también ocurre en las muestras de los discos con tratamiento arenado y grabado, aunque la cantidad de alúmina disminuye ligeramente debido a la disolución parcial de las partículas por el tratamiento ácido ³³.

Está bien establecido como la rugosidad de la superficie de los implantes de titanio afecta a la humectabilidad, a la absorción de proteínas en la superficie y a la energía superficial tanto en los componentes polares como dispersivos, así como el potencial zeta, que es una propiedad física de magnitud de atracción o repulsión de carga entre las partículas en los límites entre sólidos y líquidos. Estas propiedades fisicoquímicas son factores clave para la migración, proliferación y diferenciación celular ³³.

El mecanismo de osteointegración se basa en las interacciones de las células osteoblásticas con la superficie del biomaterial y la generación de estructuras de colágeno en los que se depositarán la apatita y otros componentes orgánicos para la formación de la denominada matriz ósea y en consecuencia, la formación de nuevo tejido óseo. Se puede asegurar que la adhesión de los osteoblastos y su actividad celular junto con la formación de la matriz extracelular de las células son claves para las etapas

DISCUSIÓN

posteriores de proliferación y diferenciación para completar el proceso de osteointegración ^{7,23,100,113-114}.

En este sentido, una de las fases iniciales de la respuesta celular a un biomaterial lo constituye la conexión entre las células y la superficie del implante. Los receptores de unión como las integrinas, son mediadas por la conexión célula a célula mediante una capa rica en proteínas. Cuando el implante es introducido y posicionado en el tejido óseo, la acción de diversos factores biológicos, físicos y químicos inciden conjuntamente para que tenga lugar el proceso de la oseointegración ¹¹⁵.

El presente estudio de investigación doctoral ha demostrado que la viabilidad y la proliferación celular, a los 3 y 21 días, utilizando células osteoblásticas, en los diferentes tipos de superficie de titanio. En este sentido, el estudio demostraba que las superficies arenadas, grabadas y arenadas+grabadas presentaban una mejor viabilidad celular que las superficies mecanizadas (Figura 10 de Resultados).

En concreto, se pudo observar una viabilidad y proliferación similar para los tres días en los discos de titanio con superficie tratada con arenado de alúmina y grabado ácido. A los 21 días se obtuvo el mejor valor de viabilidad para las superficies que sólo fueron tratadas con arenado (Figura 11 de Resultados).

Estos hallazgos experimentales del estudio de investigación doctoral indican la capacidad de cada superficie de promover una viabilidad celular y una posterior diferenciación celular, aunque con distintos grados de intensidad y rapidez. Las superficies de los implantes de titanio son capaces

DISCUSIÓN

de activar y regular las células en las primeras etapas de la cicatrización afectando su morfología y diferenciación ^{2,9,24,116}.

Los presentes resultados de este estudio de investigación experimental indican que las superficies más rugosas, arenadas, grabadas y arenadas+grabadas demuestran una mayor diferenciación celular osteoblástica que las superficies mecanizadas o lisas ¹¹⁶. Las células mostraron una morfología plana, con mayor actividad en la superficie rugosa arenada+grabada donde hay mayor actividad con filopodios y algunos núcleos blanquecinos en la superficie, lo que podría atribuirse a la actividad de mineralización de la célula osteoblástica (Figura 12 de Resultados).

Hay que indicar que la rugosidad de las superficies tratadas, arenadas y grabadas favorece el comportamiento de las células osteoblásticas pero también favorece la colonización bacteriana. La rugosidad favorece la formación de biopelículas y se debe alcanzar una rugosidad de compromiso para una buena viabilidad celular y la peor para la adhesión bacteriana ^{33,97,101}.

Un estudio reciente valora la adhesión y colonización bacterianas en diferentes superficies, mecanizadas, arenadas, grabadas y arenadas+grabadas ¹¹⁶. Aunque no existían diferencias significativas entre las diferentes superficies, sin embargo, existía una tendencia a un número menor de muestras con adhesión bacteriana entre los discos con superficie mecanizada a las 2 horas de cultivo ¹¹⁶. Se han obtenido similares observaciones en estudios realizados con superficies arenadas y grabadas con valores comparables de Ra, en superficies pulidas o mecanizadas ¹¹⁷.

DISCUSIÓN

Se puede decir que la osteointegración presenta cuatro etapas bien diferenciadas. La primera etapa corresponde a la humectabilidad que ejerce la sangre con el titanio. En este caso, dependiendo de la topografía y características fisicoquímicas, tendrá un carácter más hidrofílico o hidrofóbico. Es interesante notar que el ángulo de contacto no es estable en el tiempo porque las proteínas séricas se absorben en la superficie de titanio ¹¹⁸⁻¹²².

La segunda etapa de la osteointegración corresponde a la absorción inespecífica de proteínas. La absorción de proteínas sobre el titanio hace que cambie la naturaleza líquida con respecto a la sólida a medida que se absorben las proteínas de la sangre. Se puede ver como el ángulo de contacto aumenta y la hidrofobicidad en consecuencia aumenta con el tiempo ¹¹⁸⁻¹²².

Esta segunda etapa es crítica ya que dependerá de las proteínas que se absorban y provocará la migración bacteriana, de osteoblastos o fibroblastos según el tipo de proteínas que se hayan absorbido. Este hecho hace que esta segunda etapa de absorción inespecífica de proteínas trate de ser sustituida por la absorción específica de proteínas y que la especificidad se corresponda con las proteínas precursoras de las células osteoblásticas ^{116,118-122}.

La tercera etapa consiste en la migración celular con las tres actividades propias y secuenciales: adhesión, proliferación y diferenciación; y por último la cuarta etapa es la formación de tejido óseo que provocará la fijación biológica del implante y en consecuencia, la osteointegración. Por lo tanto, la absorción de proteínas de la matriz adhesiva del medio circundante, seguida por el reconocimiento de estas

DISCUSIÓN

proteínas por parte de las células, desencadena respuestas celulares específicas ^{116,118-122}.

Las propiedades de los biomateriales, como la humectabilidad, la carga eléctrica superficial, la composición química y la topografía de la superficie, han sido muy estudiadas y publicadas en la literatura científica, demostrando que juegan un papel clave en el establecimiento de contactos entre células y biomateriales ^{97,102,116}. Aunque hay resultados controvertidos, el hecho de que la topografía de la superficie influya fuertemente en el comportamiento de las células adherentes es ampliamente aceptado en la literatura, y, en particular, para superficies de titanio ^{97,102,116}.

En este sentido, las modificaciones realizadas en la composición química y topografía de las superficies de los implantes dentales provocan o inducen reacciones biológicas diversas. La topografía o rugosidad de la superficie del implante influye decisivamente en la viabilidad, diferenciación morfológica y orientación de las células osteoblásticas ¹²³.

En las superficies mecanizadas, las células se aproximan, con extensiones citoplasmáticas y lamelopodia, orientadas sobre las estrías del mecanizado. En las superficies rugosas, las células osteoblásticas presentan numerosas extensiones citoplasmáticas, filopodia e interconexiones con un mayor crecimiento y orientación celular ¹²³.

Los resultados del presente estudio de investigación doctoral confirman la importancia de la topografía y rugosidad de las superficies de los implantes sobre la respuesta celular osteoblástica. En general, la adherencia de los osteoblastos sobre la superficie mecanizada o pulida

DISCUSIÓN

suele ser bastante restrictiva, mientras que esta respuesta es mayor y más rápida entre las superficies tratadas o rugosas ¹²⁴⁻¹²⁵.

Una de las superficies analizadas en el presente estudio de investigación, es la superficie arenada y grabada que crea irregularidades y cavidades intercomunicadas a nivel macro y microscópico que mejora su capacidad osteointegradora ya que combina la unión mecánica y biológica con el hueso del alrededor induciendo la absorción de proteínas y la adhesión celular en las fases iniciales de la cicatrización ósea ¹²⁴⁻¹²⁵.

Los fibroblastos también se adhieren sobre el titanio siguiendo los surcos del mecanizado de forma alineada y evitando una adherencia caótica sobre la superficie mecanizada ¹²⁶. Los osteoblastos también tienen una sensibilidad con topografías de las estrías del mecanizado pero con mucha menos intensidad, y el crecimiento guiado es más difícil que en el caso de los fibroblastos ^{7,113}.

Las superficies rugosas inducen más producción de colágeno y fibronectina que en la superficie pulida, porque crean una superficie irregular con microcavidades que desarrollan una microtopografía muy beneficiosa para la inducción de la adherencia y proliferación celular fibroblástica ¹²⁷.

Este hecho ha permitido fabricar modificaciones cervicales en el cuello de los implantes dentales en los que los surcos se colocan en círculos, y se ha podido observar el crecimiento anular del tejido blando imitando la configuración natural que se da en los dientes naturales. Esta sensibilidad de los fibroblastos a estas topografías permite crecimientos

DISCUSIÓN

celulares guiados que, en este caso, actúan como un sellado biológico para evitar la infiltración bacteriana ¹²⁸⁻¹²⁹.

Desafortunadamente, los mecanismos que explican la respuesta de los osteoblastos con la topografía de los implantes, aún no están muy claros y se puede confirmar el importante papel que juegan no solo los valores de rugosidad sino también los valores de energía superficial, especialmente la contribución polar. Se ha confirmado que los valles cóncavos de una superficie de titanio acumulan una mayor densidad de hidroxilos cargados negativamente y los grupos altamente polares se ubican en los picos convexos ¹³⁰⁻¹³¹.

La posibilidad de bolsas de aire en la parte inferior de la topografía en las primeras etapas de contacto con la solución de proteínas, debido a los efectos dinámicos durante la humectación, es una posible explicación para la acumulación preferencial de proteína en la parte superior de las características topográficas ¹¹⁶.

Es necesario indicar que en los tratamientos de arenado con partículas abrasivas, algunas son incluidas en la superficie. Estas partículas abrasivas, generalmente alúmina, influyen en la humectabilidad y las energías superficiales tanto en los componentes dispersos como polares y probablemente influyen en la distribución de la fibronectina absorbida en las superficies arenadas y en las superficies arenadas y grabadas. Además, estas partículas de alúmina pueden haber afectado la cantidad total de proteína absorbida a través de su influencia en la humectabilidad y energía libre superficial ^{90,132}.

DISCUSIÓN

Se observaron patrones de absorción similares en algunas investigaciones para otras proteínas, como la albúmina y el fibrinógeno, es decir, una proteína globular y otra fibrilar ¹³⁰⁻¹³¹. No observaron ninguna correlación entre el tamaño de las partículas del arenado, es decir, la rugosidad de la superficie y los cambios correspondientes en ELA (excimer laser annealing) ^{130-131,133}. Todos estos factores llevan a la conclusión de que la heterogeneidad observada en la absorción de proteínas debe atribuirse a una propiedad o característica de la superficie arenada de titanio, independientemente de la estructura de la proteína o de la forma en que se forma la rugosidad ⁸¹.

De hecho, los resultados del presente estudio de investigación doctoral concuerdan con otros estudios de investigación sobre la viabilidad y diferenciación celular de las superficies de implantes dentales que muestran que las células cultivadas en superficies más rugosas tienden a mostrar atributos de osteoblastos más diferenciados que las células cultivadas en superficies más lisas ^{109,131,133-134}.

Las investigaciones más recientes sobre superficies de implantes indican que la topografía y la composición química de las superficies incluyendo la energía/humectabilidad, influyen sobre la respuesta celular osteoblástica como la adhesión, proliferación y migración celular. La topografía moderadamente rugosa estimula la producción de mediadores biológicos en los tejidos periimplantarios con el desarrollo de células osteogénicas sobre la superficie de los implantes estimulando la maduración osteogénica ^{108,116,124,133-134}.

Los estudios experimentales sobre la viabilidad celular de las superficies de los implantes dentales de titanio presentan una mayor

DISCUSIÓN

proliferación osteoblástica en relación a la microrrugosidad de las superficies. Sin embargo, el nivel o grado de rugosidad más favorable para mejorar esta respuesta celular todavía es un tema controvertido. Se considera que una superficie óptima puede situarse entre 1–3 μm de Ra, aunque la topografía y la composición química de las superficies tratadas son diferentes dependiendo del procedimiento empleado para el tratamiento de la superficie ^{124,134-135}.

El estudio de la fosfatasa alcalina constituye un indicador biológico de la proliferación y diferenciación celular osteoblástica. En general, la actividad de esta enzima suele incrementarse en las superficies rugosas o tratadas, en comparación con aquellas superficies con un menor grado de rugosidad como son las mecanizadas o pulidas indicando una mayor respuesta osteoblástica ^{24,116}.

En este sentido, la presente investigación doctoral demuestra que la actividad de la fosfatasa alcalina fué mucho mayor, significativamente, en las superficies arenadas, y arenadas + grabadas que en todas las muestras de superficies mecanizadas y grabadas con ácidos y a lo largo del período experimental (Figura 11 de Resultados). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre todas las muestras alcanzando la máxima actividad de la fosfatasa alcalina entre los 3 y 21 días de cultivo.

Según los resultados de Zhao y cols. ¹³⁶, las superficies arenadas y areandas+grabadas mostraron una mayor viabilidad de las células osteoblásticas en comparación con las superficies mecanizadas y grabadas al ácido. Estos investigadores establecieron que las superficies con alta energía superficial (especialmente la componente polar) pueden favorecer la selección de células en un estado más avanzado de diferenciación ¹³⁶.

DISCUSIÓN

Este hecho es confirmado por nuestra investigación doctoral que demuestra similares resultados experimentales.

Por otro lado, Lai y cols.¹³⁷ demostraron que la mayor energía superficial de las superficies de titanio mejoraba el metabolismo celular en la fase inicial de la respuesta celular y podría actuar influyendo en la expresión de moléculas asociadas a la adhesión¹³⁷. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la expresión génica de CK14, integrina 6, integrina 4, vinculina, TGF-1 o TGF-3 entre células epiteliales (HSC-2) cultivadas en superficies mecanizadas, arenadas, arenadas+grabadas y grabadas¹¹³.

Caicedo y cols.¹³⁸ demostraron que ELA es una característica superficial más relevante que la rugosidad de la superficie para la fuerza de adhesión celular y la proliferación, y que los componentes de energía superficial de los diferentes materiales probados demostraron estar relacionados con la fuerza de adhesión celular, se observó una mala correlación entre el componente dispersivo de ELA y la fuerza de adhesión en comparación con el componente polar de ELA¹³⁸.

Correlaciones similares fueron observadas en otros estudios, demostrando una mejor comprensión de las relaciones entre las propiedades de la superficie del material (rugosidad, energía libre superficial) y la proliferación celular. La energía libre superficial parece ser un factor importante en la proliferación y diferenciación celular, aunque la rugosidad de la superficie puede alterar esta relación¹³⁹⁻¹⁴⁰.

El presente estudio de investigación doctoral demuestra que los niveles más altos de fosfatasa alcalina de las muestras arenadas y

DISCUSIÓN

arenadas+grabadas indican una mayor actividad celular en comparación con las superficies mecanizadas y grabadas con ácidos, un hallazgo que sugiere la presencia de osteoblastos secretores maduros. Según Zhao y cols.¹³⁶, la alta energía superficial de algunas superficies de implantes inducen a un crecimiento de los osteoblastos con una mayor diferenciación fenotípica caracterizada por un aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina y la producción de osteocalcina que sugiere que el incremento *in vivo* en la formación de hueso en algunas superficies modificadas de implantes es debida en parte a los efectos estimulantes de la elevada energía superficial sobre los osteoblastos ¹³⁶.

Los resultados del presente estudio de investigación doctoral demuestran que la rugosidad es el principal factor que influye en la actividad osteoblástica, así como en su expresión genética. El tratamiento de grabado ácido no proporciona a la superficie del implante dental mejoras sustanciales en la actividad osteoblástica. Además, el estudio demuestra que el tratamiento con arenado aumenta el ángulo de contacto y disminuye la energía superficial. Los valores de rugosidad de los tratamientos de arenado favorecen la adhesión osteoblástica y su posterior proliferación y diferenciación.

Asimismo, los residuos de alúmina pueden favorecer la actividad osteoblástica ³³. Un estudio reciente demuestra que las superficies de los implantes dentales con alúmina residual presentan una menor energía libre superficial que las superficies limpias. De esta forma, la alúmina residual acelera el crecimiento de tejido óseo, además de tener un efecto bactericida que reduce la cantidad de bacterias adheridas al titanio ³³.

DISCUSIÓN

El presente estudio de investigación doctoral también analizó la expresión genética de las células osteoblásticas SaOS-2 a los 3 y 21 días para las diferentes topografías estudiadas. La expresión del gen con respecto a la condición mecanizada M, fué considerada la condición de control. Se pudo observar que en todos los casos excepto en el Ostx a los 21 días se reflejaba una disminución de la expresión génica. El aumento se observó para la condición arenado+grabado y para la condición arenado.

Se observó también una disminución en la expresión génica de los genes OPG, Runx2, RANKL y Alpl en los discos de ataque ácido. Hay una expresión mayor con respecto al control de Ostx en los discos tratado con arenado y grabado. Para el gen RunX2 hay un aumento de expresión el día 21 con respecto al día 4 (Figura 14 de Resultados).

Las células osteoblásticas se expresan mediante dos elementos de transcripción génica, el factor de transcripción RUNX 2 y el factor de transcripción específico de osteoblastos (Osterix u OSX). Estos factores son esenciales e indispensables para la diferenciación osteoblástica, pudiendo jugar un papel fundamental en la osteogénesis ^{37,141-142}.

El efecto de la superficie arenada + grabada sobre la respuesta biológica de los osteoblastos humanos ha sido analizada en un estudio reciente ¹⁴³. La proliferación, mineralización y expresión genética de los osteoblastos humanos fueron caracterizados *in vitro*. Los resultados mostraron que los osteoblastos expuestos a este tipo de material de titanio con superficie arenada+grabada incrementaban su tasa de mineralización y expresión génica (ej. RUNX2) participando en las fases iniciales de la oseointegración ¹⁴³.

DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación doctoral tiene una serie de limitaciones y quizás sería conveniente realizar un estudio a tiempos más cortos de adhesión y proliferación de células osteoblásticas para comprender mejor el comportamiento de los osteoblastos a los diferentes tipos de superficies de los implantes ^{100,113}.

En cualquier caso, es difícil discriminar la influencia de todas las variables que intervienen sobre el comportamiento celular y genético de las células osteoblásticas en relación a la superficie de los implantes dentales como son su naturaleza química, topografía, estrés residual, energía superficial, potencial zeta y humectabilidad, entre las más importantes ¹⁰³⁻¹⁰⁴.

En la actualidad, el titanio y sus aleaciones son considerados todavía como el material de elección para la elaboración de los implantes dentales. Sus propiedades biológicas, mecánicas y químicas lo definen como un material excelente y biocompatible. Su resistencia a la corrosión, su comportamiento biomecánico y su efecto sobre los tejidos vivos han estimulado su investigación y su conocimiento científico ¹⁰⁷⁻¹⁰⁸.

Los diversos procedimientos o tratamientos físicos y químicos (mecanizado, arenado, grabado, anodizado, etc) para configurar la superficie ideal que consiga una oseointegración favorable y rápida ha impulsado la investigación en las últimas décadas. De esta forma, se pueden obtener sistemas de implantes con una gran aplicabilidad clínica para el tratamiento de los pacientes con pérdidas dentales ^{17,20,79,113}.

Las grandes variaciones que presentan las propiedades del titanio pueden afectar el comportamiento biológico. Este trabajo de investigación

DISCUSIÓN

doctoral pretende ayudar a comprender la influencia de las superficies en el comportamiento osteoblástico, pero se necesita más investigación para comprender la biología de la formación ósea y su integración con los implantes ¹⁴⁴.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

PRIMERA. Desde un punto de vista microscópico, las muestras de las superficies analizadas presentaron una superficie topográfica con diferentes tipos de rugosidad, especialmente las superficies tratadas con arenado y/o grabado.

SEGUNDA. La rugosidad de las superficies de los implantes dentales, especialmente las arenadas y arenadas+grabadas, constituye un aspecto muy importante porque su topografía tridimensional puede incrementar la respuesta osteoblástica.

TERCERA. La energía libre superficial y la humectabilidad constituyen también una propiedades esenciales de las superficies de los implantes dentales para conseguir una respuesta biológica celular favorable.

CUARTA. La viabilidad, proliferación y diferenciación celular osteoblástica fué favorecida por la rugosimetría de las superficies tratadas, arenadas y/o grabadas en comparación con la superficie mecanizada

QUINTA. La expresión genética de las células osteoblásticas para las diferentes topografías estudiadas demostró un incremento en las superficies arenadas y grabadas

SEXTA. La investigación experimental de las superficies de los implantes dentales debe seguir con nuevos estudios que ayuden a mejorar su respuesta biológica celular y su oseointegración.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Sinha, R.K.; Tuan RS. Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials. *Bone*. 1996;18:451-7.
2. Velasco-Ortega, E.; Alfonso-Rodríguez, C.A.; Monsalve-Guil, L.; España-López, A.; Jiménez-Guerra, A.; Garzón, I.; Alaminos, M.; Gil FJ. Relevant aspects in the surface properties in titanium dental implants for the cellular viability. *Mater Sci Eng C*. 2016;64:1-10.
3. Brånemark, P.I. Osseointegration and its experimental background. *J. Prosthet. Dent*. 1983, 50, 399–410.
4. 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;16:1-132.
5. Trindade, R.; Albrektsson, T.; Wennerberg A. Current concepts for the biological basis of dental implants: foreign body equilibrium and osseointegration dynamics. *Oral Maxillofac Surg Clin N Am*. 2015;27:175-83.
6. Branemark PI. *Tissue-Integrated Prosthesis. Osseointegration in Clinical Dentistry*. Quintessence Publ Co, Inc Batavia, IL, USA. 1985;99-115.
7. Nicolas-Silvente, A.I.; Velasco-Ortega, E.; Ortiz-Garcia, I.; Monsalve-Guil, L.; Gil, J.; Jimenez-Guerra A. Influence of the Titanium Implant Surface Treatment on the Surface Roughness and Chemical Composition. *Materials* 2020;13.
8. Rupp F, Liang L, Geis-Gerstorfer J, Scheideler L, Hüttig F. Surface characteristics of dental implants: A review. *Dent Mater*. 2018;34:40-57.
9. González-Sánchez Z, Areal-Quecuty V, Jiménez-Guerra A, Cabanillas-Balsera D, Gil-Mur J, Velasco-Ortega E, Pozo D. Titanium surface characteristics induce the specific reprogramming of toll-like receptor signaling in macrophages. *Int J Mol Sci* 2022, 23, 4285
10. Smeets R, Stadlinger B, Schwarz F, Beck-Broichsitter B, Jung O, Precht C, et al. Impact of Dental Implant Surface Modifications on Osseointegration. *Biomed Res Int*. 2016;2016.
11. Martinez Alvarez O, Barone A, Covani U, Fernández Ruíz A, Jiménez Guerra A MGL. Bone grafts and bone substitutes in implant dentistry. *Av Odontoestomatol*. 2018;34:111-9.
12. Heitzer M, Kniha K, Katz MS, Winnand P, Peters F, Möhlhenrich SC, Hölzle F MA. The primary stability of two dental implant systems in

BIBLIOGRAFÍA

- low density bone. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2022;51:1093-100.
13. Popkov AV, Popkov DA, Kononovich NA, Gorbach EN, Tverdokhlebov SI, Bolbasov EN DE. Biological activity of the implant for internal fixation. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018;12:2248-55.
14. Stricker A, Bergfeldt T, Fretwurst T, Addison O, Schmelzeisen R, Rothweiler R, Nelson K GC. Impurities in commercial titanium dental implants - A mass and optical emission spectrometry elemental analysis. *Dent Mater.* 2022;38:1395-403.
15. Papi P PG. The Use of a Novel Porcine Derived Acellular Dermal Matrix Mucoderm in Peri-Implant Soft Tissue Augmentation: Preliminary Results of a Prospective Pilot Cohort Study. *Biomed Res Int.* 2018;9.
16. Mastrangelo F, Parma-Benfenati S, Quaresima R. Biologic bone behavior during the osseointegration process: histologic, histomorphometric, and SEM-EDX evaluations. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2023;43:65-72
17. Lee UL, Yun S, Lee H, Cao HL, Woo SH, Jeong YH, Jung TG, Kim CM CP. Osseointegration of 3D-printed titanium implants with surface and structure modifications. *Dent Mater.* 2022;38:1648-60.
18. Zhu Y, Liang H, Liu X, Wu J, Yang C, Wong TM, Kwan KYH, Cheung KMC, Wu S YK. Regulation of macrophage polarization through surface topography design to facilitate implant to bone osteointegration. *Sci Adv.* 2021;2:14.
19. Barfeie A, Wilson J, Rees J. Implant surface characteristics and their effect on osseointegration. *Br Dent J* 2015; 218, 9.
20. Lopes HB, Freitas GP, Fantacini DMC, Picanço-Castro V, Covas DT, Rosa AL BM. Titanium with nanotopography induces osteoblast differentiation through regulation of integrin α V. *J Cell Biochem.* 2019;120:16723-32.
21. Agrawal, K. K., Chand, P., Singh, S. V., Singh, N., Gupta, P., Garg, R. K., Chaurasia, A., Anwar, M., & Kumar A. Association of interleukin-1, interleukin-6, collagen type I alpha 1, and osteocalcin gene polymorphisms with early crestal bone loss around submerged dental implants: A nested case control study. *J Prosthet Dent.* 2023;129:425–432.
22. Fiorin LG, Matheus HR, Ervolino E, Canciani E, Pellegrini G, Dellavia C, Maiorana C de AJ. Tamoxifen improves homeostasis in the peri-implant bone remodeling of osseointegrated titanium implants. *J Periodontal Res.* 2022;57:880-90.

BIBLIOGRAFÍA

23. Masa, R.; Pelsořci-Kovács, I.; Aigner, Z.; Oszkó, A.; Turzó, K.; Ungvári K. Surface free energy and composition changes and ob cellular response to CHX-, PVPI-, and ClO₂-treated titanium implant materials. *J Funct Biomater.* 2022;13:202.
24. Velasco-Ortega E, Fos-Parra I, Cabanillas-Balsera D, Gil J, Ortiz-García I, Giner M, et al. Osteoblastic cell behavior and gene expression related to bone metabolism on different titanium surfaces. *Int J Mol Sci.* 2023;24:1-14.
25. Gil J, Manero JM, Ruperez E, Velasco-Ortega E, Jiménez-Guerra A, Ortiz-García I, et al. Mineralization of titanium surfaces: Biomimetic implants. *Materials (Basel).* 2021;14:1-16.
26. Liu Y, Zhu Z, Pei X, Zhang X, Cheng X, Hu S, Gao X, Wang J, Chen J WQ. ZIF-8-Modified Multifunctional Bone-Adhesive Hydrogels Promoting Angiogenesis and Osteogenesis for Bone Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2020;12:36978-95.
27. Mariotti V, Fiorotto R, Cadamuro M, Fabris L SM. New insights on the role of vascular endothelial growth factor in biliary pathophysiology. *JHEP Rep.* 2021;3:100251.
28. Cackowski, F.C.; Anderson, J.L.; Patrene, K.D.; Choksi, R.J.; Shapiro, S.D.; Windle, J.J. Osteoclasts are important for bone angiogenesis. *Blood* 2010, 115, 140–149.
29. Deckers, M.M.; Van Beek, E.R.; Van Der Pluijm, G.; Wetterwald, A.; Der Wee-Pals, V.; Cecchini, M.G. Dissociation of angiogenesis and osteoclastogenesis during endochondral bone formation in neonatal mice. *J. Bone Min. Res.* 2002, 17, 998–1007.
30. Ferro F, Azzolin F, Spelat R, Bevilacqua L MM. Assessing the Efficacy of Whole-Body Titanium Dental Implant Surface Modifications in Inducing Adhesion, Proliferation, and Osteogenesis in Human Adipose Tissue Stem Cells. *J Funct Biomater.* 2022;27:206.
31. da S Feltran G, Bezerra F, da Costa Fernandes CJ, Ferreira MR ZW. Differential inflammatory landscape stimulus during titanium surfaces obtained osteogenic phenotype. *J Biomed Mater Res A.* 2019;107:1597-604.
32. Yang J, Shao SY, Chen WQ, Chen C, Zhang SM QJ. Cigarette Smoke Extract Exposure: Effects on the Interactions between Titanium Surface and Osteoblasts. *Biomed Res Int.* 2019;5:258-68.
33. Gil, J.; Pérez, R.; Herrero-Climent, M.; Rizo-Gorrita, M.; Torres-Lagares, D.; Gutierrez JL. Benefits of residual aluminium oxide for sand

BIBLIOGRAFÍA

blasting titanium dental implants: Osseointegration and bactericidal effects. *Materials*. 2022;15:178.

34. Weiss-Bilka HE, Meagher MJ, Gargac JA, Niebur GL, Roeder RK WD. Mineral deposition and vascular invasion of hydroxyapatite reinforced collagen scaffolds seeded with human adipose-derived stem cells. *Biomater Res*. 2019;23.

35. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol*. 2008;19:444-51.

36. Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C. Genetic control of bone formation. *Annu Rev Cell Developmental Biol*. 2009;25:629-48.

37. Crockett JC, Mellis DJ, Scott DI, Helfrich MH. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporos Int*. 2011;22:1-20.

38. Florencio-Silva R, Rodrigues da Silva Sasso G, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Physiology of bone tissue. *Immunoanalyse Biol Spécialisée*. 2015;7:17-24.

39. Barberi, J. Spriano S. Titanium and Protein Adsorption: An Overview of Mechanisms and Effects of Surface Features. *Materials (Basel)*. 2021;24:1590.

40. Bosco, M.C., Puppo, M., Blengio, F., Fraone, T., Cappello, P., Giovarelli, M. & Varesio L. Monocytes and dendritic cells in a hypoxic environment: spotlights on chemotaxis and migration. *Immunobiology*. 2008;213:733–749.

41. Wierzbicka-Patynowski, I. & Schwarzbauer JE. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J Cell Sci*. 2003;116:3269–3276.

42. Yang F, Zhang X, Huang H, Wu G, Lippuner K HE. Anticytokine Activity Enhances Osteogenesis of Bioactive Implants. *Tissue Eng Part A*. 2021;27:177-86.

43. Berglundh, T., Abrahamsson, I., Lang, N.P, Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14:251–262.

44. Bosshardt, D.D., Salvi, G.E., Huynh-Ba, G., Ivanovski, S., Donos, N, Lang NP. The role of bone debris in early healing adjacent to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in man. *Clin Oral Implants Res*. 2011;22:357-64.

BIBLIOGRAFÍA

45. Olszta, M.J., Cheng, X., Jee, S.S., Kumar, R., Kim, Y.Y., Kaufman, M.J., Douglas, E.P. & Gower LB. Bone structure and formation: a new perspective. *Mater Sci Eng Reports*. 2007;58:77-116.
46. Terheyden H, Lang NP, Bierbaum S, Stadlinger B. Osseointegration - communication of cells. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23:1127-35.
47. Yu, X., Huang, Y., Collin-Osdoby, P, Osdoby P. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) recruits osteoclast precursors by inducing chemotaxis, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, and collagen transmigration. *J Bone Miner Res*. 2003;18:1404–1418.
48. Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM XC. Osteoblast-osteoclast interactions. *Connect Tissue Res*. 2018;59:99-107.
49. Karmakar, S., Kay, J. & Gravallesse EM. Bone damage in rheumatoid arthritis: mechanistic insights and approaches to prevention. *Rheum Dis Clin North Am*. 2010;36:385– 404.
50. Pederson, L., Ruan, M., Westendorf, J.J., Khosla, S. & Oursler MJ. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proceedings Natl Acad Sciences USA*. 2008;105:20764–20769.
51. Emcakova I, Litvinec A, Mandys V, Potocky S, Plencner M, Doubkova M, Nanka O, Olejnickova V, Sankova B, Bartos M. N Coating Ti6Al4V implants with nanocrystalline diamond functionalized with BMP-7 promotes extracellular matrix mineralization in vitro and faster osseointegration in vivo. *Sci Rep*. 2022;12:52-64.
52. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys*. 2014;561:3-12.
53. da Silva Sasso GR, Florencio-Silva R, Sasso-Cerri E, Gil CD, de Jesus Simões M CP. Spatio-temporal immunolocalization of VEGF-A, Runx2, and osterix during the early steps of intramembranous ossification of the alveolar process in rat embryos. *Dev Biol*. 2021;478:133-43.
54. Komori T. Cell Death in Chondrocytes, Osteoblasts, and Osteocytes. *Int J Mol Sci*. 2018;17:20-45.
55. Miller SC, de Saint-Georges L, Bowman BM, Jee WSS. Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microsc*. 1989;3:953-61.
56. Mosley JR. Osteoporosis and bone functional adaptation: mechanobiological regulation of bone architecture in growing and adult bone, a review. *J Rehabil Res Dev*. 2000;37:189-99.
57. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how

BIBLIOGRAFÍA

- osteoblasts become osteocytes,. Dev Dyn. 2006;235:176-90.
58. Currey JD. The many adaptations of bone. J Biomech. 2003;36:1487-95.
59. Palumbo C, Ferretti M. Morphology and cell biology - two sides of the same coin: Importance of morphology in choosing Cre experimental models for targeting osteoblasts vs osteocytes. Bone 2023; 173:116790
60. Mullender MG, Van Der Meer DDR, Huiskes RPL. Osteocyte density changes in aging and osteoporosis. Bone. 1996;18:109-13.
61. Rochefort GY, Pallu S, y Benhamou CL. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. Osteoporos Int. 2010;21:1457-69.
62. Faloni APS, Sasso-Cerri E, Katchburian E, Cerri PS. Decrease in the number and apoptosis of alveolar bone osteoclasts in estrogen-treated rats. J Periodontal Res. 2007;42:193-201.
63. Niinomi M, Liu Y, Nakai M, Liu H, Li H. Biomedical titanium alloys with Young's moduli close to that of cortical bone. Regen Biomater. 2016;3:173-85.
64. Eliaz N. Corrosion of metallic biomaterials: A review. Materials (Basel). 2019;12:1-91.
65. Kligman S, Ren Z, Chung CH, Perillo MA, Chang YC, Koo H, et al. The impact of dental implant surface modifications on osseointegration and biofilm formation. J Clin Med. 2021;10.
66. Chrcanovic BR, Kisch J, Albrektsson T, Wennerberg A. A retrospective study on clinical and radiological outcomes of oral implants in patients followed up for a minimum of 20 years, Clin. Implant Dent. Relat. Res. 20 (2018) 199–207.
67. Schwartz Z, Nasazky E BB. Surface microtopography regulates osteointegration: the role of implant surface microtopography in osteointegration. Alpha Omegan. 2005;98:9-19.
68. Mamalis A, Silvestros S. Modified titanium surfaces alter osteogenic differentiation: A comparative microarray-based analysis of human mesenchymal cell response to commercial titanium surfaces. J Oral Implantol 2013, 39, 591-601.
69. Oteo Morilla S BMA. Influencia de las diferentes superficies de implantes en la periimplantitis. Av en Periodoncia e Implant Oral. 2017;29:59-66.
70. Luque Millán FJ, Ortiz García I, Matos Garrido N, Jiménez Guerra

BIBLIOGRAFÍA

- Á, España López A Velasco Ortega E. La evaluación topográfica de las superficies de los implantes de titanio. *Av Odontoestomatol.* 2018;121-9.
71. Albrektsson T WA. On osseointegration in relation to implant surfaces. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2019;21:4-7.
72. Coelho PG, Jimbo R, Tovar N, Bonfante EA. Osseointegration: hierarchical designing encompassing the micrometer, micrometer, and nanometer length scales. *Dental Materials* 2015; 31:37–52, 2015.
73. Dohan Ehrenfest DM, Coelho PG, Kang BS, Sul YT, Albrektsson T. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. *Trends in Biotechnology* 2010; 28:198–206.
74. Wennerberg A, Albrektsson T. Efectos de la topografía de la superficie de titanio en la integración ósea: una revisión sistemática. *Clin Oral Implants Res* 2009;20(4):172–84.
75. Andrukhov O, Huber R, Shi B, Berner S, Rausch-Fan X, Moritz A, et al. Proliferation, behavior, and differentiation of osteoblasts on surfaces of different microroughness. *Dent Mater* 2016;32:1374–84.
76. Pae A, Lee H, Kim HS, Kwon YD WY. Attachment and growth behaviour of human gingival fibroblasts on titanium and zirconia ceramic surfaces. *Biomed Mater.* 2009;4.
77. Brunski JB, Puleo DA NA. Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2000;15:15-46.
78. Schroeder A, Stich H, Straumann F, Sutter F. The accumulation of osteocementum around a dental implant under physical loading. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd* 1978;88:1051–8.
79. Baier RE, Meyer AE, Natiella JR, Natiella RR, Carter JM. Surface properties determine bioadhesive outcomes: methods and results. *J Biomed Mater Res* 1984;18:337–55.
80. Stanford, C.M.; Schneider, G.B.; Perinpanayagam, H.; Keller, J.C.; Midura, R. Biomedical implant surface topography and its effects on osteoblast differentiation, in vitro. In *Improving Bio-Implant Interface Reactions*; Ellingsen, J.E.L., Lyngstadaas, S.P. Boca Raton: CRC.2003
81. Boyan, B.D.; Sylvia, V.L.; Liu, Y.; Sagun, R.; Cochran, D.L.; Lohmann, C.H.; Dean, D.D.; Schwartz, Z. Surface roughness mediates its effects on osteoblasts via protein kinase A and phospholipase A2. *Biomaterials* 1999, 20, 2305–2310.
82. Hirano T.; Sasaki H.; Honma S.; Furuya Y.; Miura T.; Yajima Y.;

BIBLIOGRAFÍA

- Yoshinari M. Proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on zirconia and titanium with different surface topography. *Dent Mater J* 2015; 34: 872-880.
83. Boyan BD, Cheng A, Olivares-Navarrete R, Schwartz Z. Implant surface design regulates mesenchymal stem cell differentiation and maturation. *Adv Dent Res*. 2016;28:10-7.
84. Yang Y, Knust S, Schwiderek S, Qin Q, Yun Q, Grundmeier G, et al. Protein adsorption at nanorough titanium oxide surfaces: The importance of surface statistical parameters beyond surface roughness. *Nanomaterials*. 2021;11:1-15.
85. Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. *Acta Orthop Scand* 1981; 52: 155-70.
86. Branemark PI, Breine U, Adell R, Hanson BO, Lindstrom J, Olsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1969; 3: 81 - 110.
87. Lee JB, Jo YH, Choi JY, Seol YJ, Lee YM KY. The effect of ultraviolet photofunctionalization on a titanium dental implant with machined surface: An in vitro and in vivo study. *Mater (Basel)*. 2019;12:1-14.
88. Piattelli A, Misch C, Pontes E, Iezzi G, Scarano A, Degidi M. Dental implant surfaces. A review. En: Misch C. *Contemporary Implant Dentistry*. 3a Ed. San Luis: Mosby Elsevier. 2008. 599-620.
89. Velasco E, Pato J, Segura JJ, Medel R, Poyato M, Lorrio JM. La investigación experimental y la experiencia clínica de las superficies de los implantes dentales. II. *Dentum* 2009; 9: 108-13.
90. Bigerelle M, Anselme K. Statistical correlation between cell adhesion and proliferation on biocompatible metallic materials. *J Biomed Mat Res A* 2005; 72A: 36-46
91. Zhang F, Zhang CF, Yin MN, Ren LF, Lin HS, Shi GS. Effect of heat treatment on H₂O₂/HCl etched pure titanium dental implant: An in vitro study *Med Sci Monit* 2012; 18: 265-72.
92. Velasco E, Monsalve-Guil L, Jiménez A, Ortiz I, Moreno-Muñoz J, Nuñez-Marquez E, Pegueroles M, Pérez RA, Gil FJ. Importance of the roughness and residual stresses of dental implants on fatigue and osseointegration behavior. In vivo study in rabbits. *J Oral Impl* 2016; 42:469-476
93. Blanco López P, Monsalve Guil L, Matos Garrido N, Moreno Muñoz

BIBLIOGRAFÍA

- J, Nuñez Márquez E, Velasco Ortega E. Osseointegration of titanium implant with several rough surfaces. *Av Odontoestomatol*. 2018;34:141-9.
94. Orsini G, Assenza B, Scarano A, Piattelli M, Piattelli A. Surface analysis of machined versus sandblasted and acid-etched titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000; 15: 779-84.
95. Babbush CA, Kent JN, Misiek DJ. Titanium Plasma-sprayed (TPS) Screw Implants for the reconstruction of the edentulous mandible. *J Oral Maxillofac Surg*. 1986;44:274-82.
96. Xie J, Baumann MJ, McCabe LR. Osteoblasts respond to hydroxyapatite surfaces with immediate changes in gene expresión. *J Biomed Mater Res* 2004; 71: 108-17.
97. Gil, F.J.; Planell, J.A.; Padrós, A.; Aparicio, C. The effect of shot blasting and heat treatment on the fatigue behavior of titanium for dental implant applications. *Dent. Mater.* 2007, 23, 486–491.
98. Velasco Ortega E, Pato Mourelo J, Lorrio Castro JM, Cruz Valiño JM PFM. El tratamiento con implantes dentales postextracción. *Av Perio Impl Oral*. 2007;19:35-42.
99. Albrektsson T, Canullo L, Cochran D, De Bruyn H. Peri-Implantitis: A complication of a foreign body or a man-made “disease”. facts and fiction. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2016;18:840–849.
100. Pegueroles M, Gil FJ, Planell JA, Aparicio C. The influence of blasting and sterilization on static and time-related wettability and surface-energy properties of titanium surfaces. *Surf Coat Tech* 2008; 202: 3470–3479.
101. Aparicio C, Rodríguez D, Gil FJ. Variation of roughness and adhesion strength of deposited apatite layers on titanium dental implants. *Mater. Sci. Eng. C* 2011, 31, 320–324.
102. Hoque E, Showva NN, Ahmed M, Rashid AB, Sadique SE, El-Bialy T, Xu H. Titanium and titanium alloys in dentistry: current trends, recent developments, and future prospects. *Helyon* 2022; 8:11300.
103. Hatamle M.M., Wu,X., Alnazzawi, A., Watson J., Watts D. Surface characteristics and biocompatibility of cranioplasty titanium implants following different surface treatments. *Dent Mater* 2018; 34: 676-683.
104. Mutombo K. Research and Development of Ti and Ti alloys: past, present and future. *IOP Conf. Ser. Mater Sci Eng* 2018; 430:012007.
105. Serrano B, Sanz-Sánchez I, Serrano K, Montero E, Sanz M. One-year outcomes of dental implants with a hybrid surface macro-design

BIBLIOGRAFÍA

placed in patients with history of periodontitis: A randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2022; 49:90-100.

106. Bravo E, Serrano B, Ribeiro-Vidal H, Virto L, Sánchez IS, Herrera D, Sanz M. Biofilm formation on dental implants with a hybrid surface microtopography: An in vitro study in a validated multispecies dynamic biofilm model. *Clin Oral Implants Res* 2023; 34: 475-485.

107. Velasco-Ortega E, Ortiz-García I, Jiménez-Guerra J, Monsalve-Guil L, Muñoz-Guzón F, Gil FJ. Comparison between sandblasted-acid etched and oxidized titanium dental implants: *In vivo* study. *Journal of Molecular Sciences* 2019; 20:13.

108. Velasco-Ortega E, Ortiz-García I, Jiménez-Guerra A, Núñez-Márquez E, Moreno-Muñoz J, Rondón-Romero JL, Cabanillas-Balsera D, Gil J, Muñoz-Guzón F, Monsalve-Guil L. Osseointegration of sandblasted and acid-etched implant surfaces. A histological and histomorphometric study in the rabbit. *Int J Mol Sci* 2021, 2, 8507.

109. Pegueroles M, Aparicio C, Bosio M, Engel E, Gil FJ, Planell JA, Altankov G. Spatial organization of osteoblast fibronectin-matrix on titanium surface—effects of roughness, chemical heterogeneity, and surface free energy. *Acta Biomater* 2010; 6: 291–301.

110. Gittens RA, Scheideler L, Rupp F, Hyzy SL, Geis-Gerstorfer J, Schwartz Z, Boyan BD. A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects. *Acta Biomaterial* 2014; 10:2907-2918.

111. Wang Q, Zhou P, Liu S, Attarilar S, Ma RL, Zhong, Y., et al., Multi-scale surface treatments of titanium implants for rapid osseointegration: a review. *Nanomaterials* 2020; 10:1244.

112. Sawase T, Jimbo R, Baba K, Shibata Y, Ikeda T, Atsuta M. Photo-induced hydrophilicity enhances initial cell behavior and early bone apposition. *Clin Oral Impl Res* 2008;19: 491-496.

113. Jayaraman M, Meyer U, Buhner M, UJoos H.P. Wiesmann. Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* 2004, 25, 625–631.

114. Lange R, Luthen F, Beck U, Rychly U, Baumann A, Nebe B. Cell-extracellular matrix interaction and physico-chemical characteristics of titanium surfaces depend on the roughness of the material. *Biomol Eng* 2002; 19: 255–261.

115. Elias CN, Meirelles L. Improving osseointegration of dental implants. *Expert Rev Med Dev* 2010; 7:241-256.

BIBLIOGRAFÍA

116. Rodriguez-González R, Monsalve-Guil L, Jimenez-Guerra A, Velasco-Ortega E, Moreno-Muñoz J, Nuñez-Marquez E, Pérez RA, Gil J, Ortiz-Garcia I. Relevant aspects of titanium topography for osteoblastic adhesion and inhibition of bacterial colonization. *Materials* 2023; 16: 3553.
117. Li X, Huang Q, Elkhooly T, Liu Y, Wu H, Feng Q, Liu L, Fang Y, Zhu W, Hu T. Effects of titanium surface roughness on the mediation of osteogenesis via modulating the immune response of macrophages. *Biomed. Mater.* 2018; 13:045013.
118. Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* 1999; 20: 2311-2321.
119. Siebers M.C, der Brugge P.J, Walboomers XF, Jansen JA. Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review. *Biomaterials* 2005, 26, 137-146.
120. Garcia, A.J. Get a grip: Integrins in cell-biomaterial interactions. *Biomaterials* 2005; 26: 7525-7529.
121. Train T, Murmura,G, Sinjari, B, Perfetti G, Scarano A, D’Arcangel C, Caputi S. The surface anodization of titanium dental implants improves blood clot formation followed by osseointegration. *Coatings* 2018; 8: 252.
122. Lotz EM, Berger M.B, Schwartz Z, Boyan B.D. Regulation of osteoclasts by osteoblast lineage cells depends on titanium implant surface properties. *Acta Biomater* 2018; 68: 296-307.
123. Lukaszewska-Kuska M, Wirstlein P, Majchrowski R, Dorocka-Bobkowska B. Osteoblastic cell behaviour on modified titanium surfaces. *Micron* 2018; 105:55-63.
124. Stoilov M, Stoilov L, Enkling N, Stark H, Winter J, Marder M, Kraus D. Effects of different titanium surface treatments on adhesion, proliferation and differentiation of bone cells: an *in vitro* study. *J Funct Biomater* 2022; 13: 143.
125. von Wilmowsky C, Moest T, Nkenke E, Stelzle F, Schlegel KA. Implants in bone: Part, I. A current overview about tissue response, surface modifications and future perspectives. *Oral Maxillofac Surg* 2014; 18: 243-257.
126. Lee HJ, Lee J, Lee JT, Hong JS, Lim BS, Park HJ, Kim YK, ,King TI. Microgrooves on titanium surface affect peri-implant cell adhesion and soft tissue sealing; an *in vitro* and *in vivo* study. *J Periodontal Implant Sci* 2015;45:120-126.

BIBLIOGRAFÍA

127. Huang S, Lin Y, Lin Zhou L. Fibronectin-coated microgroove titanium surface promotes the behaviors of human gingival fibroblasts. *Dent Mater J* 2023. 10.4012
128. Kensity J, Dobrzyński M, Wiench R, Grzech-Leśniak K, Matys J. fibroblasts adhesion to laser-modified titanium surfaces. a systematic review. *Materials* 2021;14:7305.
129. Palkowitz AL, Tuna T, Bishti S, Böke F, Steinke N, Müller-Newen G, et al. Biofunctionalization of dental abutment surfaces by crosslinked ecm proteins strongly enhances adhesion and proliferation of gingival fibroblasts. *Adv Healthc Mater* 2021; 10:2100132.
130. Wang XX, Hayakawa S, Tsuru K, Osaka A. A comparative study of in vitro apatite deposition on heat-, H₂O₂-, and NaOH-treated titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A* 2001, 54, 172-178.
131. Aparicio C, Manero, JM, Cond F, Pegueroles, M, Planell JA, Vallet-Reg M, Gil, F.J. Acceleration of apatite nucleation on microrough bioactive titanium for bone replacing implants. *J Biomed. Mater Res A* 2007; 82: 521–529.
132. Wieland M, Hanggi P, Hotz W, Textor M, Keller BA, Spencer ND. Wavelength-dependent measurement and evaluation of surface topographies: Application of a new concept of window roughness and surface transfer function. *Wear* 2000, 237, 231-252.
133. Kardos, T.B. Cellular responses to metal ions released from implants. *J Oral Implantol* 2014; 40: 294-298.
134. Feller L, Jadwat Y, Khammiss RA, Meyerov, R, Schechter I, Lemmer J. Cellular responses evoked by different surface characteristics of intraosseous titanium implants. *BioMed Res Int* 2015:171945.
135. Jemat A, Ghazali MJ, Razali M, Otsuka Y. Surface modifications and their effects on titanium dental implants. *Biomed Res Int* 2015, 791725.
136. Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rup F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, Boyan BD. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res* 2005; 74: 49-58.
137. Lai Y, Huang J, Cu Z, G M, Zhang K, Chen Z, Chi L. Recent advances in TiO₂ -based nanostructured surfaces with controllable wettability and adhesion. *Small* 2016; 12: 2203-2224.
138. Caicedo M, Jacobs JJ, Hallab NJ. Inflammatory bone loss in joint replacements: The mechanisms. *J Mus Med* 2010; 27, 209.

BIBLIOGRAFÍA

139. Ponsonnet L, Reybier K, Jaffrezic K, Comte V, Lagneau C, Lissac M, Martelet C. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. *Mater Sci Eng C* 2003; 23:551–560.
140. Martelet C. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. *Mater Sci Eng C* 2003; 12: 345–355.
141. James A.W. Review of signaling pathways governing MSC osteogenic and adipogenic differentiation. *Scientifica* 2013, 684736.
142. Crockett JC, Rogers MJ, Coxon FP, Hocking LJ, Helfrich MH. Bone remodelling at a glance. *J. Cell Sci.* 2011, 124, 991-998.
143. Romero-Gavilán F, Cerqueira A, García-Arnáez I, Azkargorta M, Elortza F, Gurruchaga M, Goñi I, Suay J. Proteomic evaluation of human osteoblast responses to titanium implants over time. *J Biomed Mater Res A* 2023; 111:45-59.
144. Gyorgyey A, Janova L, Adam A, Kopniczky J, Toth KL, Deak A, Panayotov I, Cuisinier F, Dekany I, Turzo K. Investigation of the *in vitro* photocatalytic antibacterial activity of nanocrystalline TiO₂ and coupled TiO₂/Ag containing copolymer on the surface of medical grade titanium. *J Biomater Appl* 2016; 31: 55-67.



Article

Osteoblastic Cell Behavior and Gene Expression Related to Bone Metabolism on Different Titanium Surfaces

Eugenio Velasco-Ortega ¹, Isabel Fos-Parra ¹, Daniel Cabanillas-Balsera ¹, Javier Gil ^{2,*}, Iván Ortiz-García ¹, Mercè Giner ³, Jesús Bocio-Núñez ⁴, María-José Montoya-García ⁵ and Álvaro Jiménez-Guerra ¹

¹ Faculty of Dentistry, University of Seville, c/ Avicena s/n, 41009 Sevilla, Spain

² Bioengineering Institute of Technology, Universitat Internacional de Catalunya, 08195 Sant Cugat del Vallés, Spain

³ Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica, Universidad de Sevilla, 41009 Sevilla, Spain

⁴ Bone Metabolism Unit, UGC Medicina Interna, Hospital Universitario Virgen Macarena, Avda. Dr. Fedriani s/n, 41009 Sevilla, Spain

⁵ Departamento de Medicina, Universidad de Sevilla, Avda. Dr. Fedriani s/n, 41009 Sevilla, Spain

* Correspondence: xavier.gil@uic.es

Abstract: The surface topography of titanium dental implants has a great influence on osseointegration. In this work, we try to determine the osteoblastic behavior and gene expression of cells with different titanium surfaces and relate them to the physicochemical properties of the surface. For this purpose, we have used commercial titanium discs of grade 3: as-received corresponds to machined titanium without any surface treatment (MA), chemically acid etched (AE), treated via sand blasting with Al₂O₃ particles (SB) and a sand-blasting treatment with acid etching (SB+AE). The surfaces have been observed using scanning electron microscopy (SEM) and the roughness, wettability and surface energy with dispersive and polar components have been characterized. Osteoblastic cultures were performed with SaOS-2 osteoblastic cells determining cell viability as well as alkaline phosphatase levels for 3 and 21 days, and osteoblastic gene expression was determined. The roughness values of the MA discs was 0.02 μm, which increases to 0.3 μm with acid attack and becomes the maximum for the sand-blasted samples, reaching values of 1.2 μm for SB and SB+AE. The hydrophilic behavior of the MA and AE samples with contact angles of 63° and 65° is superior to that of the rougher samples, being 75° for SB and 82° for SB+AE. In all cases, they show good hydrophilicity. GB and GB+AE surfaces present a higher polar component in the surface energy values, 11.96 and 13.18 mJ/m², respectively, than AE and MA, 6.64 and 9.79 mJ/m², respectively. The osteoblastic cell viability values at three days do not show statistically significant differences between the four surfaces. However, the viability of the SB and SB+AE surfaces at 21 days is much higher than that of the AE and MA samples. From the alkaline phosphatase studies, higher values were observed for those treated with sand blasting with and without acid etching compared to the other two surfaces, indicating a greater activity in osteoblastic differentiation. In all cases except in the Osterix (Ostx) —osteoblast-specific transcription factor—a decrease in gene expression is observed in relation to the MA samples (control). The most important increase was observed for the SB+AE condition. A decrease in the gene expression of Osteoprotegerine (OPG), Runt-related transcription factor 2 (Runx2), Receptor Activator of NF-κB Ligand (RANKL) and Alkaline Phosphatase (Alp) genes was observed in the AE surface.

Keywords: titanium; surfaces; osteoblasts; gene expression; roughness and wettability; cell viability



Citation: Velasco-Ortega, E.; Fos-Parra, I.; Cabanillas-Balsera, D.; Gil, J.; Ortiz-García, I.; Giner, M.; Bocio-Núñez, J.; Montoya-García, M.-J.; Jiménez-Guerra, Á. Osteoblastic Cell Behavior and Gene Expression Related to Bone Metabolism on Different Titanium Surfaces. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 3523. <https://doi.org/10.3390/ijms24043523>

Academic Editor: Christian Morszeck

Received: 30 November 2022

Revised: 5 January 2023

Accepted: 7 February 2023

Published: 9 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

It has been studied by several authors that the topography of titanium surfaces and their alloys affect bone formation, protein adsorption and osteoblast interaction with the biomaterial. The expression of a specific pattern of integrin receptors on the osteoblast membrane has been observed [1,2]. Bone formation is initiated by type 1 collagen generated from osteoblasts, being the most abundant protein in the extracellular matrix. Collagen

1 provides a scaffold for the deposition of the mineral component of bone apatite, which gives it mechanical strength. The organic structure provides elasticity [3]. Bone homeostasis is governed by several signaling pathways that will trigger cell differentiation [4]. These strategies are due to fibroblast cell growth factors (FGF), bone morphogenetic protein (BMP) and Wnt signaling expression [4,5]. Osteoblast cells express two transcription elements: Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and osteoblast-specific transcription factor (Osterix or OSX). These factors are critical and indispensable for osteoblast differentiation [6,7]. Some authors determined that RUNX2 and OSX have a fundamental role in osteogenesis but not in cell differentiation [8,9].

Osteogenesis and angiogenesis are mechanisms that are related to bone growth, remodeling and repair [7,9–11]. Osteoclast cells activate angiogenesis through the expression of proangiogenic factors, including vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) [11–13]. This factor functions with receptor activator of nuclear factor kappa-B receptor ligand (RANKL) to promote osteoclastogenesis [11]. Deckers et al. confirmed that angiogenesis is caused by osteoblast quiescence and not so much by osteoclast cell activity [12]. In addition, Cackowski et al. demonstrated that osteoclast activity increased angiogenesis and osteoclast cell inactivity elicited osteoprotegerin (OPG), decreasing angiogenesis. Increasing osteoclastic activity with parathormone (PTH) produced an increase in angiogenesis [13].

It has been possible to determine the influence on osteoblast adhesion, proliferation and differentiation with different implant topographies in both in vitro and in vivo studies [14–16]. One of the most significant results was how commercially pure and roughened titanium favored the expression of alkaline phosphatase (ALP) and collagen type in the same way titanium with large crystalline grain size behaved [17]. The roughness' influence on osteoblastic cell behavior, especially differentiation, is caused by the action of protein kinase A and PL A2 [18], and by integrin-generated signaling [15]. Other aspects favoring differentiation on rough surfaces were the subsequent expression of cytokines and growth factors mediated by osteoblastic cells. It could be seen in in vitro studies performed on rough titanium with osteosarcoma cells (MG-63) that an increase in TGF- β and IL-1 β occurred [15,19–22]. A decrease in proliferation was observed on titanium surfaces with roughness greater than 2.5 $\mu\text{m Ra}$ due to a prostaglandin-mediated response. An increase in cellular phenotypic markers of differentiation (ALP activity, osteocalcin) could also be observed.

These aspects play a fundamental role in the generation of new osteoblastic cells and in the osteoconduction mechanism. In addition, titanium roughness leads to an increase in the osteoblastic differentiation process through variations in transcriptional regulation or gene expression of key osteogenic factors due to morphological variations of the cells caused by the topography of the titanium surface. It is now important to determine the influence of titanium topography on bone formation. There are many variables involved and the topography and physicochemical properties of the surface are key. At present, there is a serious problem with peri-implantitis: there is an important loss of bone that in many cases causes the loss of the dental implant. It is important to be able to obtain a titanium surface which eliminates bacteria growing and stimulates bone regeneration.

The aim of this work is to study the osteoblastic behavior and its gene expression in different topographies of titanium dental implants. The aim and originality of this work is to determine the influence of roughness and its surface properties on bone metabolism. In this way, it will be possible to discriminate the contribution of the different variables since, at present, only studies of rough surfaces have been carried out via shot blasting with alumina particles without combining them with other treatments, such as etching.

2. Results

The topographies of the different surfaces studied can be seen in Figure 1. It can be observed that the machining discs (MA) have the reliefs of the machining but the typical valleys and pits of the discs treated with abrasive particle projection (SB) and abrasive particle projection with acid etching (SB+AE) are not appreciated. In the latter case, it is

observed that the acid attack of the mixed treatment produces a very small variation in the topography. The most important contribution of the macroroughness is due to sand blasting and the acid attack produces a more microstructural attack. This fact can be verified by observing the topography of the discs in which only the acid attack (AE) has occurred.

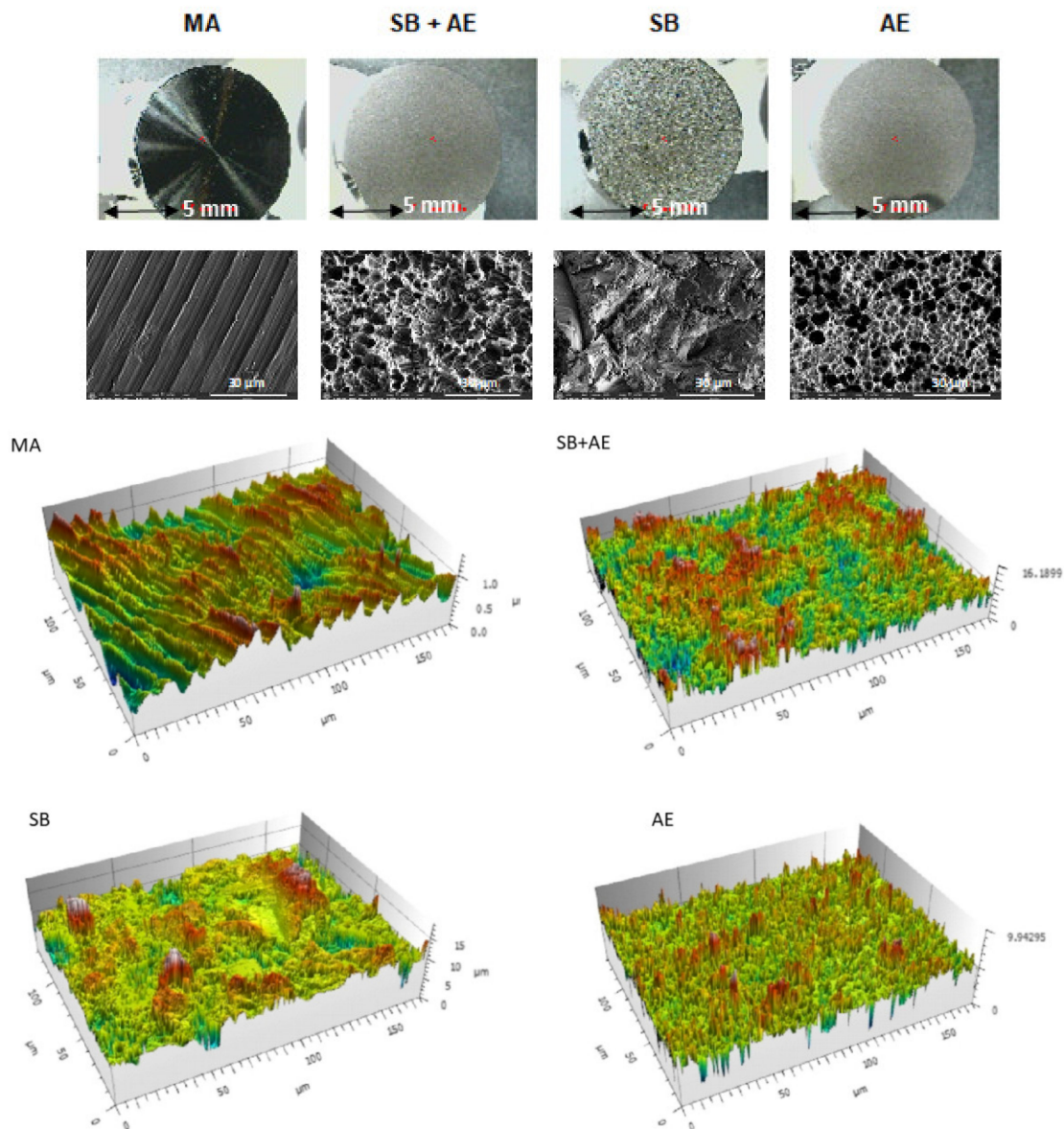


Figure 1. Macroscopic surfaces, topography observed using a scanning electron microscope and profilometry of the different surfaces obtained (MA: machined; SB+AE: sand blasted with acid etching; SB: sand blasted; and AE: acid etched samples).

The roughness of the different surfaces was determined via interferometric microscopy in order to obtain the different parameters that characterize the roughness, as can be seen in Table 1. The MA discs show the lowest values of R_a . This roughness is defined as the average pico–valley roughness and the values can be considered a smooth surface. The discs that have been treated with sand-blasting SB and SB+AE have the highest R_a values and there are no statistically significant differences between them. These results show the small contribution to roughness of acid attack. The AE discs show a roughness higher than MA and lower than that corresponding to the SB and SB+AE discs. The roughness of SB and SB+AE discs presented statistically significant differences compared with the AE discs ($p < 0.005$).

Table 1. Mean \pm standard error of the mean of the surface roughness parameter Ra for the different types of Ti implants. (* and ** means statistically differences significance).

Ti-Disc	MA	SB+AE	SB	AE
Ra (μm)	0.026 \pm 0.008	1.235 \pm 0.020 *	1.162 \pm 0.492 *	0.303 \pm 0.112 **

The topographies observed at higher magnifications using FESEM showed that the discs treated with MA had a wavy surface with grooves due to the machining machine. The surfaces of the other discs were rougher and more irregular, especially the samples that had been sand blast treated. In particular, the SB discs revealed large peaks and valleys of varying geometry with numerous planes, while the surfaces of the other Ti discs were less sharp. The discs exposed to SB+AE procedures showed the highest roughness and a heterogeneous micropitting surface. The discs subjected to AE exhibited micropitting of different sizes. The surfaces observed in the electron microscopy images matched those of the 3D representations obtained from optical interferometry in the lower panel of Figure 1.

The water contact angles (CA), and the calculated values for the surface free energy (SFE) and its compounds following the Owens and Wendt approach are shown in Tables 2 and 3. Overall, the grit-blasting treatment decreased surface wettability, i.e., increased CA. This effect was particularly pronounced for those surfaces grit-blasted with residual particles of Al_2O_3 .

Table 2. Apparent contact angles for the three liquids used on the different c.p. Ti surfaces. Values are mean \pm standard error of the mean. Statistical differences vs. smooth surfaces for each column are indicated by single and double asterisk symbols ($p < 0.05$).

Surface	Water CA' [$^\circ$]	Di-Iodomethane CA' [$^\circ$]	Formamide CA' [$^\circ$]
MA	61.9 \pm 5.0	48.0 \pm 2.9 *	51.0 \pm 1.6
SB+AE	81.9 \pm 5.1 *	36.2 \pm 3.0 **	36.0 \pm 1.3 *
SB	76.7 \pm 6.5 *	56.9 \pm 1.7	58.9 \pm 2.0
AE	63.3 \pm 8.1	37.6 \pm 4.0 **	33.9 \pm 5.0 *

Table 3. Water contact angle, surface free energy and its components for the different Ti surfaces. Values are mean \pm standard error of the mean. Statistical differences vs. smooth surfaces for each column are indicated by single and double asterisk symbols ($p < 0.05$).

Surface	Surface Free Energy (mJ/m^2)		
	Total Surface Free Energy	Dispersive Component	Polar Component
MA	42.98 \pm 1.70	33.19 \pm 1.94 *	9.79 \pm 2.93 *
SB+AE	42.48 \pm 1.88	29.30 \pm 1.22 *	13.18 \pm 1.20 **
SB	42.95 \pm 1.69	30.99 \pm 0.85 *	11.96 \pm 0.90 **
AE	47.08 \pm 2.92 *	41.10 \pm 2.34 *	6.64 \pm 3.15 *

When comparing dispersive or polar components of SFE, there was a general trend in polar components to decrease when the samples contained alumina (Table 3) [19]. Statistically significant differences in the polar components of rough surfaces with alumina with respect to control and clean surfaces were determined for the samples treated with the largest particles.

Figure 2 shows the cell viability for two time points, 3 and 21 days, using osteoblastic cells. The viability measure has been obtained by determining that its reduction is proportional to the increased osteoblastic cell viability of the different surface types. The control has been taken as the MA disc since it is the as-received one, showing how all three surfaces improve viability with respect to MA. A similar viability can be observed for the three days in the titanium discs with surface treated with alumina shot blasting and acid etching. No

statistically significant differences were observed between SB, SB+AE and AE cell viability at 3 days with a $p < 0.001$. Differences were observed with MA of the other surfaces with a $p < 0.001$. At 21 days, we have the best viability value for the surfaces that have only been treated with shot blasting. Figure 3 shows the osteoblastic cells on the different surfaces after 3 and 21 days.

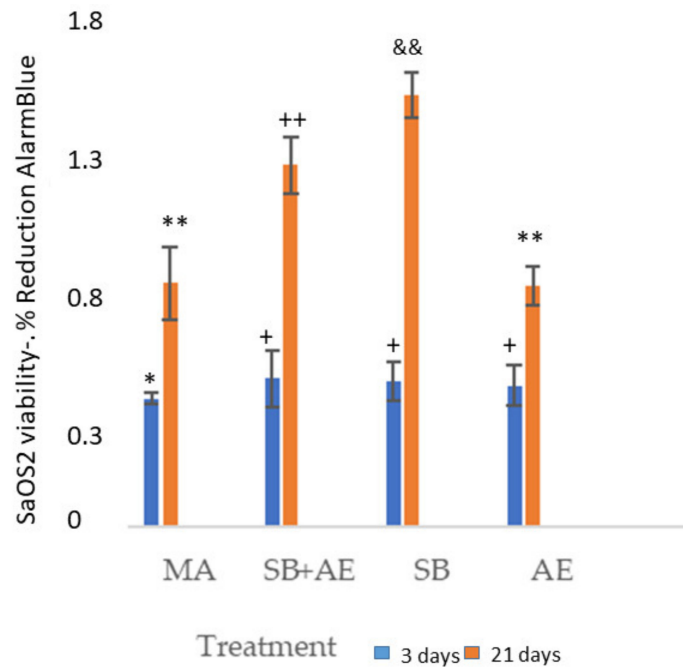


Figure 2. SaOS-2 osteoblastic cells viability at 3 and 21 days for the different topographies studied. Each symbol indicates the statistical differences' significance $p < 0.001$.

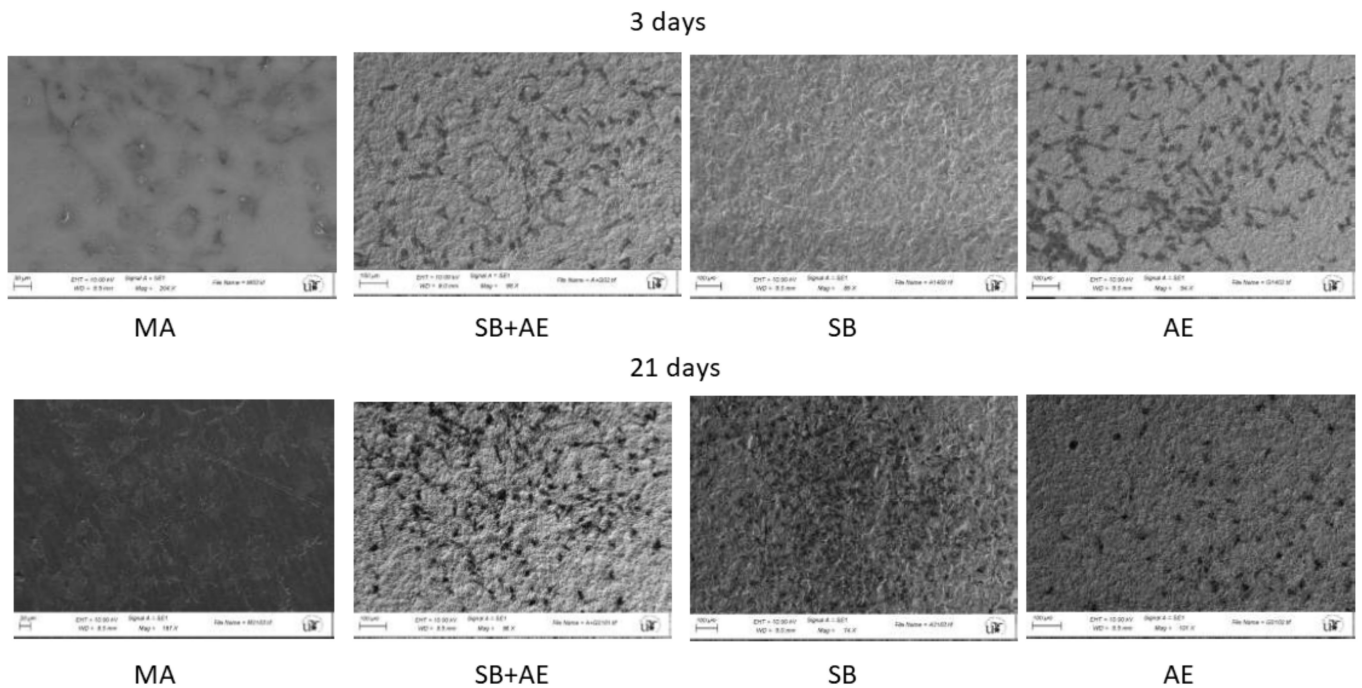


Figure 3. SaOS-2 osteoblastic cells observed by SEM at 3 and 21 days for the different topographies studied.

In Figure 4, the osteoblasts on the MA surface (a) and on the surface (SB+AE) can be observed at higher magnifications. It can be observed that the morphology of the cells is

flat, with greater activity on the rough SB+AE surface where there is greater dorsal activity with filopodia and some whitish nuclei on the surface, which could be attributed to the permineralization activity of the osteoblastic cell.

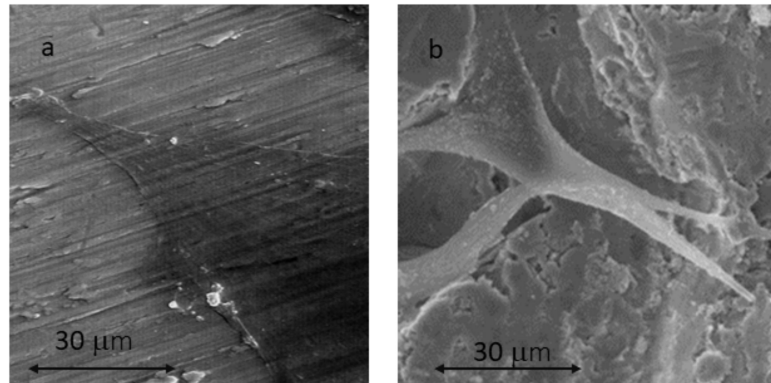


Figure 4. SaOS-2 osteoblastic cells observed using SEM at 21 days for MA surface (a) and SB+AE surface (b).

Figure 5 shows the results of alkaline phosphatase, indicating the differentiation of osteoblastic cells experiencing the increase in this enzyme. It can be seen that on day 3, the cells are not fully differentiated and the values of pNPP are lower than on day 21. The surfaces with the greatest differentiation are the discs that have been subjected to shot blasting with or without acid etching treatment.

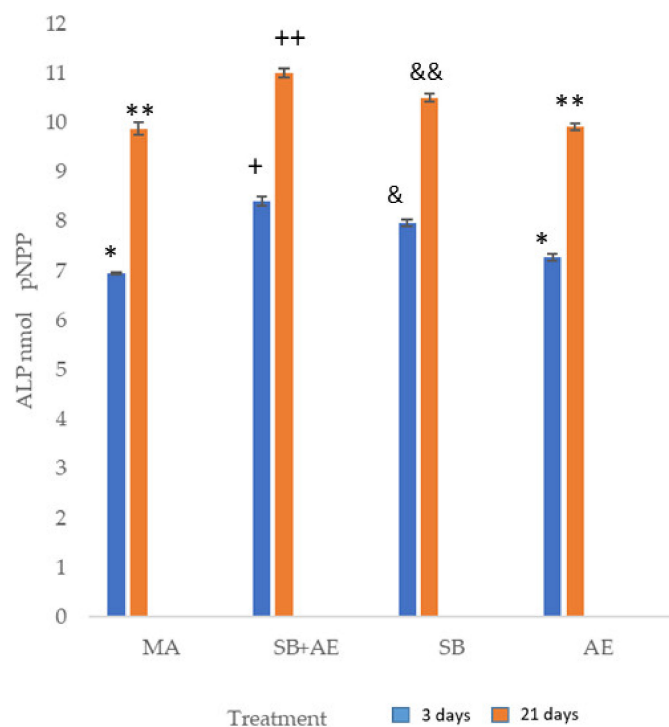


Figure 5. Alkaline phosphatase of SaOS-2 osteoblastic cells at 3 and 21 days for the different topographies studied. Each symbol indicates the statistical differences' significance $p < 0.001$.

Figure 6 shows the gene expression with respect to the M condition, which we consider to be the control condition. It can be seen that in all cases except in the *Ostx*, a decrease in gene expression is observed. The increase was observed for the SB+AE condition. A decrease in gene expression of *OPG*, *Runx2*, *RANKL* and *Alpl* genes was observed in the acid attack discs. There is a higher expression with respect to the *Ostx* control in the discs

treated with shot blasting and acid etching. For the RunX2 gene, there is an increase in expression on day 21 with respect to day 4.

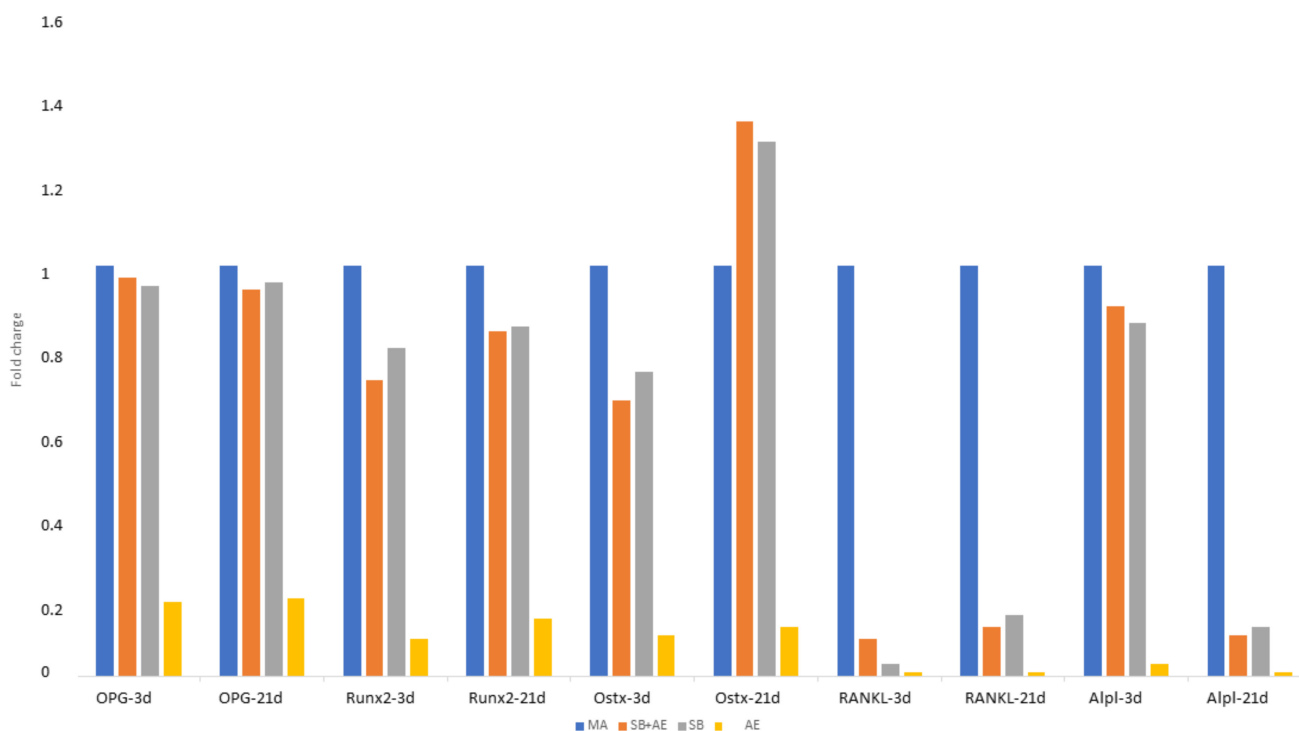


Figure 6. Gene expression of SaOS-2 osteoblastic cells at 3 and 21 days for the different topographies studied.

3. Discussion

Currently, dental implants with a machined or polished surface are not used because roughness favors osteoblastic activity, increasing the degree of osseointegration. Roughness causes a very important increase (between 5 and 8 times that of the real machined surface), increasing the bone–titanium junction and consequently increasing the mechanical fixation. Some so-called hybrid implants have been developed, which have the polished part in the area of the connection and the first two or three coils of the dental implant. This design was created to try to avoid the formation of biofilm in peri-implantitis processes since the bacterial colonization is lower in the polished parts of the dental implant [16–18].

The acid attack is a methodology that slightly increases the roughness of the dental implant. However, as we have been able to verify in the results, the increase is small. It would be a mistake to treat it with acids of higher concentration since the roughness will increase vertically but not horizontally (distance between peaks) and this increase in depth does not favor osseointegration. In addition, the increase in concentration could produce an incorporation of hydrogen in the titanium, causing the formation of hydrides and causing hydrogen embrittlement, drastically reducing the mechanical properties. In this case, the implant should be subjected to a hydrogen elimination heat treatment consisting of heating at 150 °C for 1 h [20,21].

The sand-blasting treatment with alumina particles is the most common treatment for dental implants as it allows the optimization of the roughness of the dental implant to the affinity of the osteoblastic cells. The size of the abrasive particles, the nature of these particles, the impact pressure, and the distance between the gun and the surface can be modulated to obtain the optimal roughness. As we have seen, the subsequent acid attack does not significantly increase the roughness, but it does create a microroughness in the macroroughness obtained by sand blasting, which will improve the biological behavior. Increasing the particle size, the abrasiveness of the particles, the impact pressure or decreasing the distance between the gun and the surface would increase the roughness.

In any case, higher roughness would facilitate bacterial colonization. This is the reason why the optimum roughness (Ra) values should range from 0.9 to 1.9 μm [16,18].

These topographic changes have their influence on the contact angles; as we have been able to observe, the granulated materials increase the contact angle and the polar component of the surface energy, aspects that favor the biological behavior. In addition, sand-blasting treatments cause a compressive tensional state on the surface that significantly improves the resistance of the dental implant to fatigue, as has been demonstrated by various authors. This state of surface compression, which causes a delay in the nucleation of a crack on the surface due to cyclic masticatory loads, is not present in machined or acid-etched implants. For this reason, these implants will have a worse mechanical behavior in the long term [20].

The discs do not present porosities since the discs are made of cold-worked titanium, which is the same material used to manufacture dental implants. Therefore, it is only the roughness that influences the biological behavior and it has been observed that the roughness established via sand blasting and acid attack is the one that gives a higher viability of the osteoblastic cells. This roughness has been observed to vary the degrees of hydrophilicity and the polar and dispersive components of the surface energy that favors osteoblastic viability and bone gene expression. The effect of alumina debris on the surface has been demonstrated in several studies [20–23]. In a study [22] with the same type of discs and surfaces, it was observed that the X-ray energy dispersive microanalyses showed the presence of aluminum and oxygen in the SB samples due to the use of Al_2O_3 as abrasive particle for the sand-blasting treatment. These particles are embedded on the surface of the dental implant. This also occurs in the SB+AE samples, although the amount of alumina decreases slightly due to the partial dissolution of the particles.

It is well-known how the roughness of titanium affects wettability, protein adsorption on the surface and surface energy in both the polar and dispersive components, as well as the zeta potential. These physicochemical properties are key factors for cell migration, proliferation and differentiation [22]. The mechanism of osseointegration is based on the interactions of the osteoblastic cells with the surface of the biomaterial and the generation of collagen scaffolds in which the apatite and other organic components will be deposited for the formation of the so-called bone matrix and, consequently, the formation of new bone tissue. We can assure that the adhesion of osteoblasts and their cellular activity together with the formation of the extracellular matrix of cells (ECM) are key for the subsequent stages of proliferation and differentiation to complete the osseointegration process [24–28].

It should be noted that the roughness of SB+AE favors osteoblastic cell behavior but also favors bacterial colonization [19,20,22]. Roughness favors biofilm formation and a compromise roughness must be reached for good cell viability and the worst for bacterial adhesion.

It can be said that osseointegration presents four distinct stages. The first corresponds to the wettability of blood with titanium. In this case, depending on the topography and physicochemical characteristics, it will have a more hydrophilic or hydrophobic character. It is interesting to note that the contact angle is not stable over time because the proteins in the blood solution adsorb on the titanium surface. This is the second stage of osseointegration, which corresponds to the nonspecific adsorption of proteins. The adsorption of proteins on titanium causes the liquid nature with respect to the solid to change as the proteins from the blood are adsorbed. It can be seen how the contact angle increases and the hydrophobicity consequently increases with time. This second stage is critical since it will depend on the proteins that are adsorbed and will provoke the bacterial migration of osteoblasts or fibroblasts depending on the type of proteins that have been adsorbed. This fact means that this second stage of non-specific adsorption of proteins tries to be changed by the specific adsorption of proteins and that the specificity is in precursor proteins of the osteoblastic cells. The third stage will be cell migration with the three proper and sequential activities: adhesion, proliferation and differentiation; the fourth is the formation of bone tissue that will cause metal–implant fixation and, consequently, osseointegration. Therefore,

adsorption of adhesive matrix proteins from the surrounding medium, followed by the recognition of these proteins by cells [29,30], triggers specific cellular responses [31,32].

It has been studied how biomaterial properties, such as wettability [33], surface electrical charge [34], chemistry and surface topography [35], play a key role in the establishment of cell–biomaterial contacts [36]. Although there are controversial results [37], the fact that the surface topography strongly influences the behavior of adherent cells is widely accepted in the literature [31–35], and, in particular, for titanium surfaces [29,37]. It has been possible to observe how fibroblasts adhere on titanium following the machining grooves in an aligned manner and avoiding chaotic adhesion on the metal surface. This fact has made it possible to make dental implant collars in which the grooves are placed in circles, and it has been possible to observe the annular growth of the soft tissue imitating the natural configuration that occurs in natural teeth. This sensitivity of fibroblasts to these topographies allows for guided cell growths that, in this case, act as a biological seal to prevent bacterial infiltration [38]. Osteoblasts also have a sensitivity with machining groove topographies but with much less intensity, and guided growth is more difficult in the case of fibroblasts [39–42].

Unfortunately, the mechanisms explaining the response of osteoblasts with topography are still not very clear and the important role played not only by roughness values but also by surface energy values, especially polar contribution, can be confirmed. It has been confirmed that concave valleys of a Ti surface accumulate a higher density of negatively charged hydroxyls and highly polar groups are located at convex peaks [43,44]. The possibility of air pockets at the bottom of the topography in the early stages of contact with the protein solution, due to dynamic effects during wetting, is a possible explanation for the preferential accumulation of protein at the top of the topographic features.

It should be noted that in sand-blasting treatments with abrasive particles, some are included in the surface. These abrasive particles—usually alumina—influence the wettability and surface energies in both the dispersive and polar components and probably influence the distribution of adsorbed fibronectin on the SB and SB+AE surfaces. In addition, these alumina particles may have affected the total amount of adsorbed protein through their influence on wettability and SFE [41,42]. Similar adsorption patterns were observed in some papers [43,44] for other proteins, such as albumin and fibrinogen, i.e., one globular and one fibrillar protein. They did not observe any correlation between jet particle size, i.e., surface roughness, and corresponding changes in ELA [43–45]. All these factors lead to the conclusion that the observed heterogeneity in protein adsorption must be attributed to a property or characteristic of the Ti sand-blasted surface, independent of the protein structure or the way the roughness is formed [17].

Indeed, our results agree with the studies of [19,21,46,47], which showed that cells cultured on rougher surfaces tended to show more differentiated osteoblast attributes than cells cultured on smoother surfaces. ALP activity was much higher (p -value < 0.001) on SB+AE and SB surfaces than on all M or AE throughout the experimental period (Figure 3). Significant differences were observed among all samples reaching the maximum ALP activity between 3 and 21 days of culture.

According to the results of Zhao et al. [48], SB and SB+AE surfaces showed higher viability of osteoblastic cells compared to machine-made and acid-etched surfaces. These authors established that surfaces with high surface energy (especially the polar component) may favor the selection of cells at a more advanced stage of differentiation; this fact is confirmed by our research. On the other hand, Lai et al. [49] demonstrated that the higher surface energy of titanium surfaces improved cell metabolism in the initial phase of the cell response and could act by influencing the expression of adhesion-associated molecules. However, no significant differences in the gene expression of CK14, integrin 6, integrin 4, vinculin, TGF-1 or TGF-3 were observed between epithelial cells (HSC-2) cultured on MA, SB and SB+AE [27]. Hallab et al. [50] demonstrated that ELA is a more relevant surface characteristic than surface roughness for cell adhesion strength and proliferation, and that the surface energy components of the different materials tested were shown to be related to

cell adhesion strength: a poor correlation was observed between the dispersive component of ELA and adhesion strength when compared to the polar component of ELA. Similar correlations were observed by Martelet and Ponsonet et al. [33,51].

The higher alkaline phosphatase levels of the SB and SB+AE samples indicate increased cellular activity compared to the MA and AE surfaces, a finding that suggests the presence of mature secretory osteoblasts. According to Zhao et al. [48], high surface energy increased osteocalcin production. These results are in agreement with those of Xavier et al. [52], who showed that calcified nodule formation was significantly reduced on machined and acid-etched surfaces. One explanation for this reduction could be the release of titanium constituent ions, which interfere negatively in the mineralization process.

From the results, it can be observed that roughness is the main factor influencing osteoblastic activity, as well as its genetic expression. Acid-etching treatment does not provide the dental implant surface with substantial improvements in osteoblastic activity. Shot-blasting treatment has been shown to increase the contact angle and decrease the surface energy. The roughness values of shot-blasting treatments favor osteoblast adhesion and subsequent proliferation and differentiation. Likewise, alumina residues favor osteoblastic activity, as described by Gil et al. [22].

The present work has a series of limitations and perhaps it would be appropriate to carry out a study at shorter times of adhesion and proliferation of osteoblastic cells to better understand the behavior at short times [26,53]. In any case, it is difficult to discriminate the influence of all the variables on the cellular and genetic behavior of osteoblastic cells: chemical nature, topography, residual stress, surface energy, zeta potential, and wettability, among the most important ones. Györgyey et al. [53] showed that the large variations that the properties of titanium can affect biological behavior. This work is intended to help understand the influence of surfaces on osteoblastic behavior, but further research is needed to understand the biology of bone formation and its integration with implants.

4. Materials and Methods

Commercially pure grade 3 titanium discs were studied. The dimensions of the discs were a thickness of 4 mm and a diameter of 12 mm. The materials were donated by the Galimplant Dental Implant Company (Sarria, Spain). The surface treatments performed are those that correspond to those performed for commercial dental implants. They were classified into four groups according to surface treatment.

Machined (MA). The discs show the mechanical abrasion typical of the machining of dental implants without subsequent surface treatment.

Sand blasted and acid etching (SB+AE). The discs were blasted with alumina particles of 250 to 450 μm at a pressure of 2.5 bar and at a gun–surface distance of 100 mm. They were then washed with distilled water and treated via immersion in a 1:1 acid mixture of concentrated HCl and HNO_3 for 45 s.

Sand blasted (SB). Only the exposed sand-blasting process was performed on the SB+AE. In this batch, the acid etching was not performed, only the sand blasted with alumina. It could be determined that about 3% of the abrasive alumina particles were included in the rough titanium surface, as is usual in dental implants sand blasted with alumina.

Acid etching (AE). Acid etching was performed with a mixture of 1:1 concentrated HCl and HNO_3 acids for 45 s.

The cleaning of the samples for the surface characterization studies: roughness and machinability was carried out with methyl alcohol for 15 min in ultrasound and then in acetone for 5 min. Drying is carried out with hot air flow.

The topography of the discs was observed using scanning electron microscopy (SEM) with a Zeiss Neon40 FE SEM (Carl Zeiss NTS GmbH, Jena, Germany). Sputtering was not necessary to enhance the electrical conductivity. An electronic acceleration potential of 5KV was used. The working distance was 7 mm.

Roughness was determined using ten samples for each surface studied. Three places for each sample were analyzed (4 surfaces \times 10 samples/surface \times 3 places/sample). A

Wyko NT1100 interferometric microscope (Veeco Instruments, Plainview, New York, USA) using white light and beam orthogonal to the surface was used. Constant magnification was used with a 5× magnification objective. Roughness was determined on a scan area of 1 × 0.5 mm and 10 values were obtained for each surface in different areas. The arithmetic mean height (Ra), surface asymmetry (Rsk), which measures the asymmetry of the profile height distribution, and surface kurtosis (Rku), which represents the sharpness of the height distribution or “peakedness” of the profile [23,24], were studied. The results were analyzed using Wyko Vision 232TM software 3Xb (Veeco Instruments Plainview, New York, USA).

The wettability of the four surface types was determined using the static contact angle technique following the sessile drop technique under static conditions and at a temperature of 25 °C [25]. Six samples for each treatment were analyzed.

These measurements were carried out with an OCA15 Plus Instrument (Dataphysics, Filderstadt, Germany). The drop volume was 3 µL and the dosing rate was 1 µL/min. The fluids used were ultrapure distilled water (Millipore Milli-Q, Merck Millipore Corporation, Burlington, MA, USA) and diiodomethane (Sigma-Aldrich, Barcelona, Spain).

Determination of the surface free energy was calculated with the Owens and Wendt equation [26].

$$\gamma_L(1 + \cos \theta) = 2 \left(\left(\gamma_L^d \gamma_S^d \right)^{\frac{1}{2}} + \left(\gamma_L^p \gamma_S^p \right)^{\frac{1}{2}} \right) \quad (1)$$

where γ^d and γ^p are dispersive and polar components, respectively. γ_L corresponds to the of the liquid surface tension and θ is the contact angle between the liquid (L) and the solid (S).

Data was analyzed with SCA 20 software 3240 (Dataphysics Filderstadt, Germany.). Three measurements were carried out for three different samples in each series.

Osteoblastic cells (SaOS-2; ATCC, Manassas, VA, USA) were used for in vitro studies. They were cultured in Dulbecco’s modified Eagle medium (DMEM) and McCoy’s modified 5A medium. To these two solutions, we added 10% fetal bovine serum (FBS) and 50 µg/mL L-glutamine and penicillin/streptomycin at a concentration of 2 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Cultures were grown at 37 °C (body temperature) in a 5% CO₂ incubator under humidified conditions.

Confluent cells were separated from the culture via incubation with TrypLE (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 1 min. The cell dilution was centrifuged and placed in a new culture medium. Subsequently, the titanium discs were seeded on the different surfaces with a cell concentration of 5000 cells per each of the discs studied/disc and incubated at 37 °C. After 3 and 21 days of incubation, the cells were lysed with 200 µL/well of M-PER® (Pierce, Rockford, IL, USA). Cell proliferation was determined on the different topographies of the titanium discs using the LDH cytotoxicity detection kit (Roche Applied Science, Mannheim, Switzerland). The number of proliferating cells is proportional to the release of lactate dehydrogenase (LDH) and this lactate was determined spectrophotometrically at 492 nm with a conventional ELx800 microplate detector (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

Alkaline phosphatase (ALP) activity of osteoblastic cells was determined using Sensolyte pNPP alkaline phosphatase colorimetric assay (Anaspec, Fremont, CA, USA). For ALP determination, a wavelength of 405 nm was used and detection was performed with a conventional ELx800 microplate reader (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

The evaluation of osteoblastic gene expression was performed with the determination of total RNA at different culture times, which was extracted using the RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA was quantified using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Montchanin, DE, USA). One hundred nanograms were retrotranscribed to cDNA using the QuantiTect reverse transcription kit (Qiagen). The cDNA products were diluted to 1 ng/µL and used as real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) templates. Primers were selected from the Universal ProbeLibrary (Roche Applied Science) to amplify osteoblast differentiation specific genes. Primers for genes presenting more than one transcript were selected from common regions.

SYBR Green RT-qPCR analyses were performed using the QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany) on a StepOnePlus real-time PCR machine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The specificity of each RT-qPCR reaction was determined using melting curve analysis.

5. Conclusions

The viability of osteoblastic cells and alkaline phosphatase levels indicating cell differentiation are higher on titanium surfaces that have been sandblasted with and without acid etching. This improved cell behavior is due in part to the higher polar component of the free surface energy. In all cases except in the Ostx, a decrease in gene expression is observed in relation to the control samples. The most important increase was observed for the sand blasted with acid etching surface. A decrease in the gene expression of OPG, Runx2, RANKL and Alpl genes was observed in the acid etching surface. These results suggest that the treatments used in the present study may support favorable biological responses in vivo.

Author Contributions: Conceptualization, E.V.-O. and J.G.; methodology, I.F.-P. and I.O.-G.; software, D.C.-B. and M.G.; formal analysis, J.G. and D.C.-B.; investigation, J.B.-N., Á.J.-G., M.G. and E.V.-O.; resources, M.-J.M.-G. and D.C.-B.; data curation, Á.J.-G. and M.G.; writing—original draft preparation, I.F.-P., J.G.; writing—review and editing, E.V.-O. and I.O.-G.; visualization, D.C.-B., M.G. and D.C.-B.; supervision, E.V.-O. and J.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The work was supported by the Spanish Government and the Ministry of Science and Innovation of Spain by research projects RTI2018-098075-B-C21 and RTI2018-098075-B-C22 (co-funded by the European Regional Development Fund (ERDF), a way to build Europe). Catedra de investigacion en implantologia oral de la Universidad de Sevilla-Galimplant.

Informed Consent Statement: For this type of study, formal consent is not required.

Data Availability Statement: The authors can provide details of the research upon reasonable request.

Acknowledgments: The authors are grateful to Galimplant dental implants for technical support.

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

References

1. Singer, I.; Scott, S.; Kawaka, D.W.; Kazazis, D.M.; Gailit, J.; Ruoslahti, E. Cell surface distribution of fibronectin and vitronectin receptor depends on substrate composition and extracellular matrix accumulation. *J. Cell. Biol.* **1988**, *106*, 2171–2182. [[CrossRef](#)]
2. Sinha, R.K.; Tuan, R.S. Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials. *Bone* **1996**, *18*, 451–457. [[CrossRef](#)]
3. Phan, T.; Xu, J.; Zheng, M. Interaction between osteoblast and osteoclast: Impact in bone disease. *Histol. Histopathol.* **2004**, *19*, 1325–1344.
4. Lin, G.L.; Hankenson, K.D. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *J. Cell. Biochem.* **2011**, *112*, 3491–3501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Javed, A.; Chen, H.; Ghori, F.Y. Genetic and transcriptional control of bone formation. *Oral Maxillofac. Surg. Clin. N. Am.* **2010**, *22*, 283–293. [[CrossRef](#)]
6. Chau, J.; Leong, W.F.; Li, B. Signaling pathways governing osteoblast proliferation, differentiation, and function. *Histol. Histopathol.* **2009**, *24*, 1593–1606. [[PubMed](#)]
7. James, A.W. Review of signaling pathways governing MSC osteogenic and adipogenic differentiation. *Scientifica* **2013**, *2013*, 684736. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Qi, H.; Aguiar, D.J.; Williams, S.M.; La Pean, A.; Pan, W.; Verfaillie, C.M. Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3305–3310. [[CrossRef](#)]
9. Crockett, J.C.; Rogers, M.J.; Coxon, F.P.; Hocking, L.J.; Helfrich, M.H. Bone remodelling at a glance. *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 991–998. [[CrossRef](#)]
10. Thiollay, S.; Halpern, J.; Holt, G.E.; Schwartz, H.S.; Mundy, G.R.; Matrisian, L.M. Osteoclast-derived matrix metalloproteinase-7, but not matrix metalloproteinase-9, contributes to tumor-induced osteolysis. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 6747–6755. [[CrossRef](#)]
11. Kanczler, J.; Oreffo, R. Osteogenesis and angiogenesis: The potential for engineering bone. *Eur. Cell. Mater.* **2008**, *15*, 100–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Deckers, M.M.; Van Beek, E.R.; Van Der Pluijm, G.; Wetterwald, A.; Der Wee-Pals, V.; Cecchini, M.G. Dissociation of angiogenesis and osteoclastogenesis during endochondral bone formation in neonatal mice. *J. Bone Min. Res.* **2002**, *17*, 998–1007. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Cackowski, F.C.; Anderson, J.L.; Patrene, K.D.; Choksi, R.J.; Shapiro, S.D.; Windle, J.J. Osteoclasts are important for bone angiogenesis. *Blood* **2010**, *115*, 140–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Stanford, C.M.; Brand, R.A. Toward an understanding of implant occlusion and strain adaptive bone modeling and remodeling. *J. Prosth. Dent.* **1999**, *81*, 553–561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Schneider, G.; Burrige, K. Formation of focal adhesions by osteoblasts adhering to different substrata. *Exp. Cell Res.* **1994**, *214*, 264–269. [[CrossRef](#)]
16. Stanford, C.M.; Schneider, G.B.; Perinpanayagam, H.; Keller, J.C.; Midura, R. Biomedical implant surface topography and its effects on osteoblast differentiation, in vitro. In *Improving Bio-Implant Interface Reactions*; Ellingsen, J.E.L., Lyngstadaas, S.P., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2003.
17. Boyan, B.D.; Lohmann, C.H.; Dean, D.D.; Sylvia, V.L.; Cochran, D.L.; Schwartz, Z. Mechanisms involved in osteoblast response to implant surface morphology. *Annu. Rev. Mater. Res.* **2001**, *31*, 357–371. [[CrossRef](#)]
18. Boyan, B.D.; Sylvia, V.L.; Liu, Y.; Sagun, R.; Cochran, D.L.; Lohmann, C.H.; Dean, D.D.; Schwartz, Z. Surface roughness mediates its effects on osteoblasts via protein kinase A and phospholipase A2. *Biomaterials* **1999**, *20*, 2305–2310. [[CrossRef](#)]
19. Aparicio, C.; Rodriguez, D.; Gil, F.J. Variation of roughness and adhesion strength of deposited apatite layers on titanium dental implants. *Mater. Sci. Eng. C* **2011**, *31*, 320–324. [[CrossRef](#)]
20. Gil, F.J.; Planell, J.A.; Padrós, A.; Aparicio, C. The effect of shot blasting and heat treatment on the fatigue behavior of titanium for dental implant applications. *Dent. Mater.* **2007**, *23*, 486–491.
21. Pegueroles, M.; Aparicio, C.; Bosio, M.; Engel, E.; Gil, F.J.; Planell, J.A.; Altankov, G. Spatial Organization of Osteoblast Fibronectin-Matrix on Titanium Surface—Effects of Roughness, Chemical Heterogeneity, and Surface Free Energy. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 291–301. [[CrossRef](#)]
22. Gil, J.; Pérez, R.; Herrero-Climent, M.; Rizo-Gorrita, M.; Torres-Lagares, D.; Gutierrez, J.L. Benefits of residual aluminium oxide for sand blasting titanium dental implants: Osseointegration and bactericidal effects. *Materials* **2022**, *15*, 178.
23. Velasco, E.; Monsalve-Guil, L.; Jimenez, A.; Ortiz, I.; Moreno-Muñoz, J.; Nuñez-Marquez, E.; Pegueroles, M.; Perez, R.; Gil, F.J. Importance of the Roughness and Residual Stresses of Dental Implants on Fatigue and Osseointegration Behavior. In Vivo Study in Rabbits. *J. Oral Investig.* **2016**, *42*, 469–476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Nicolas-Silvente, A.; Velasco-Ortega, E.; Ortiz-García, I.; Monsalve-Guil, L.; Gil, F.J.; Jimenez-Guerra, A. Influence of the Titanium implants surface treatment on the surface roughness and chemical composition. *Materials* **2020**, *13*, 314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Masa, R.; Pelsóczy-Kovács, I.; Aigner, Z.; Oszkó, A.; Turzó, K.; Ungvári, K. Surface Free Energy and Composition Changes and Ob Cellular Response to CHX-, PVPI-, and ClO₂-Treated Titanium Implant Materials. *J. Funct. Biomater.* **2022**, *13*, 202. [[CrossRef](#)]
26. Pegueroles, M.; Gil, F.J.; Planell, J.A.; Aparicio, C. The influence of blasting and sterilization on static and time-related wettability and surface-energy properties of titanium surfaces. *Surf. Coat. Tech.* **2008**, *202*, 3470–3479. [[CrossRef](#)]
27. Jayaraman, M.; Meyer, U.; Buhner, M.; UJoos, H.P. Wiesmann. Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* **2004**, *25*, 625–631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Lange, R.; Luthen, F.; Beck, U.; Rychly, U.; Baumann, A.; Nebe, B. Cell-extracellular matrix interaction and physico-chemical characteristics of titanium surfaces depend on the roughness of the material. *Biomol. Eng.* **2002**, *19*, 255–261. [[CrossRef](#)]
29. Wilson, C.J.; Clegg, R.E.; Leavesley, D.I.; Percy, M.J. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: A review. *Tissue Eng.* **2005**, *11*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Puleo, D.A.; Nanci, A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* **1999**, *20*, 2311–2321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Siebers, M.C.; der Brugge, P.J.; Walboomers, X.F.; Jansen, J.A. Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review. *Biomaterials* **2005**, *26*, 137–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Garcia, A.J. Get a grip: Integrins in cell-biomaterial interactions. *Biomaterials* **2005**, *26*, 7525–7529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ponsonnet, L.; Reybier, K.; Jaffrezic, K.; Comte, V.; Lagneau, C.; Lissac, M.; Martelet, C. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. *Mater. Sci. Eng. C* **2003**, *23*, 551–560. [[CrossRef](#)]
34. Boyan, B.D.; Batzer, R.; Kieswetter, K.; Liu, Y.; Cochran, D.L.; Szmuckler-Moncler, S.; Dean, D.D.; Schwartz, Z. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to 1 alpha,25-(OH) (2) D-3. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *39*, 77–85. [[CrossRef](#)]
35. Schwartz, Z.; Martin, J.Y.; Dean, D.D.; Simpson, J.; Cochran, D.L.; Boyan, B.D. Effect of titanium surface roughness on chondrocyte proliferation, matrix production, and differentiation depends on the state of cell maturation. *J. Biomed. Mater. Res.* **1996**, *30*, 145–155. [[CrossRef](#)]
36. Anselme, K.; Bigerelle, M.; Noel, B.; Dufresne, E.; Judas, D.; Iost, A.; Hardouin, P. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *49*, 155–166. [[CrossRef](#)]
37. Richards, R.G. The effect of surface roughness on fibroblast adhesion in vitro. *Injury* **1996**, *27*, 38–43. [[CrossRef](#)]
38. Martin, J.Y.; Schwartz, Z.; Hummert, T.W.; Schraub, D.M.; Simpson, J.; Lankford, J.; Dean, D.D.; Cochran, D.L.; Boyan, B.D. Effect of Titanium Surface-Roughness on Proliferation, Differentiation, and Protein-Synthesis of Human Osteoblast-Like Cells (Mg63). *J. Biomed. Mater. Res.* **1995**, *29*, 389–401. [[CrossRef](#)]

39. Eisenbarth, E.; Linez, P.; Biehl, V.; Velten, D.; Breme, J.; Hildebrand, H.F. Cell orientation and cytoskeleton organisation on ground titanium surfaces. *Biomol. Eng.* **2002**, *19*, 233–237. [[CrossRef](#)]
40. Chesmel, K.D.; Clark, C.C.; Brighton, C.T.; Black, C. Cellular-Responses to Chemical and Morphologic Aspects of Biomaterial Surfaces 2. the Biosynthetic and Migratory Response of Bone Cell-Populations. *J. Biomed. Mater. Res.* **1995**, *29*, 1101–1110. [[CrossRef](#)]
41. Wieland, M.; Hanggi, P.; Hotz, W.; Textor, M.; Keller, B.A.; Spencer, N.D. Wavelength-dependent measurement and evaluation of surface topographies: Application of a new concept of window roughness and surface transfer function. *Wear* **2000**, *237*, 231–252. [[CrossRef](#)]
42. Bigerelle, M.; Anselme, K. Statistical correlation between cell adhesion and proliferation on biocompatible metallic materials. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2005**, *72*, 36–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Wang, X.X.; Hayakawa, S.; Tsuru, K.; Osaka, A. A comparative study of in vitro apatite deposition on heat-, H₂O₂-, and NaOH-treated titanium surfaces. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2001**, *54*, 172–178. [[CrossRef](#)]
44. Aparicio, C.; Manero, J.M.; Conde, F.; Pegueroles, M.; Planell, J.A.; Vallet-Regí, M.; Gil, F.J. Acceleration of apatite nucleation on microrough bioactive titanium for bone replacing implants. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2007**, *82*, 521–529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Kardos, T.B. Cellular responses to metal ions released from implants. *J. Oral Implantol.* **2014**, *40*, 294–298. [[CrossRef](#)]
46. Feller, L.; Jadwat, Y.; Khammissa, R.A.; Meyerov, R.; Schechter, I.; Lemmer, J. Cellular responses evoked by different surface characteristics of intraosseous titanium implants. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 171945. [[CrossRef](#)]
47. Jemat, A.; Ghazali, M.J.; Razali, M.; Otsuka, Y. Surface Modifications and Their Effects on Titanium Dental Implants. *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 791725. [[CrossRef](#)]
48. Zhao, G.; Schwartz, Z.; Wieland, M.; Rupp, F.; Geis-Gerstorfer, J.; Cochran, D.L.; Boyan, B.D. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J. Biomed. Mater. Res.* **2005**, *74*, 49–58. [[CrossRef](#)]
49. Lai, Y.; Huang, J.; Cui, Z.; Ge, M.; Zhang, K.; Chen, Z.; Chi, L. Recent Advances in TiO₂ -Based Nanostructured Surfaces with Controllable Wettability and Adhesion. *Small* **2016**, *12*, 2203–2224. [[CrossRef](#)]
50. Caicedo, M.; Jacobs, J.J.; Hallab, N.J. Inflammatory bone loss in joint replacements: The mechanisms. *J. Mus. Med.* **2010**, *27*, 209.
51. Martelet, C. Relationship between Surface Properties (Roughness, Wettability) of Titanium and Titanium Alloys and Cell Behaviour. *Mater. Sci. Eng. C* **2003**, *12*, 345–355.
52. Moura, L.B.; Velasques, B.D.; Silveira LF, M.; Martos, J.; Xavier, C.B. Therapeutic approach to pulp canal calcification as sequelae of dental avulsion. *Eur. Endodont. J.* **2017**, *2*, 1–5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Gyorgyey, A.; Janovak, L.; Adam, A.; Kopniczky, J.; Toth, K.L.; Deak, A.; Panayotov, I.; Cuisinier, F.; Dekany, I.; Turzo, K. Investigation of the in vitro photocatalytic antibacterial activity of nanocrystalline TiO₂ and coupled TiO₂/Ag containing copolymer on the surface of medical grade titanium. *J. Biomater. Appl.* **2016**, *31*, 55–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.