

3

Adhesión y diferenciación de osteoblastos humanos sobre Ti c.p. granallado

3.1. Introducción

3.1.1. Ámbito

En los Capítulos 1 y 2 se ha expuesto la importancia de la calidad superficial de los implantes dentales de Ti c.p. en su osteointegración. Asimismo, se ha puesto de manifiesto la importancia que tiene la correcta caracterización de las superficies estudiadas, puesto que es la única forma posible para poder comparar estudios y poder determinar qué valores y qué tipos de rugosidades son las mejores para optimizar la respuesta biológica del implante.

Los objetivos del Capítulo anterior perseguían obtener superficies de Ti c.p. con un rango amplio de rugosidades, de tipos de rugosidades y de utilización de distintas naturalezas de partículas de proyección, puesto que siempre quedan restos de éstas sobre las superficies del implante, incluso después de su exhaustiva limpieza, pasivación y esterilización.

La obtención de estas superficies se llevó a cabo para poder ser evaluadas respecto a su respuesta biológica, con el objetivo final de determinar qué tipo de partículas (tamaño y naturaleza) es óptimo para mejorar la osteointegración de los implantes dentales y, de esta manera, estudiar a partir de ese momento sólo aquella(s) superficie(s) que se hubiese(n) determinado como la(s) mejor(es).

En este sentido, los únicos trabajos que han relacionado de forma rigurosa un pequeño rango de rugosidades con la osteointegración del implante han sido estudios *in vivo* en los cuales, por medio de estudios histomorfométricos (porcentaje de hueso neoformado en contacto con el implante) y biomecánicos (valores mecánicos de extracción del implante de su lugar de inserción en el hueso), se ha determinado la calidad de la osteointegración después de largos periodos de implantación en animales [WEN96]; [WIE99]. A la crítica hecha sobre estos estudios en el Capítulo anterior, correspondiente al estrecho rango de rugosidades estudiado, se une que las diferencias y las conclusiones extraídas de los estudios hacen referencia sólo a la influencia de la rugosidad sobre la osteointegración a largo plazo. No hay respuesta a la pregunta de qué influencia tiene la rugosidad en la osteointegración a corto plazo. Esta respuesta, a diferencia de la fijación a largo plazo, está relacionada en mayor medida a la topografía en el orden micrométrico que al diseño macroscópico del implante. Este hecho se ha relacionado con que las células osteoprogenitoras, los osteoblastos, pueden sentir específicamente los detalles microtopográficos de la superficie, por su morfología y por la interacción que otras entidades biológicas (agua y proteínas) tienen con esos diferentes detalles. Todo ello, finalmente, puede provocar que los osteoblastos promuevan de forma favorable la síntesis de hueso [BDL01] (Figura 3.1).

Además, los estudios *in vivo* limitan el número de superficies que se pueden estudiar debido al alto precio y a los condicionantes legales y éticos que implica trabajar con tantos animales [REC99]; [MOR99]. Teniendo en cuenta que en esta Tesis Doctoral, incluyendo la superficie del Ti c.p. sin granallar, el número inicial de diferentes superficies a estudiar es de 11, el ensayo *in vivo* se presenta inviable.

Por otra parte, a pesar de que es ampliamente aceptada la biocompatibilidad del Ti c.p. [RAT01], la adecuada respuesta *in vitro* hasta los últimos estados de maduración del tejido óseo [DLS90], y que los implantes dentales de este material, cuando es granallado, se emplean en la actualidad en la práctica clínica [BUS01]; [ESP01], no se ha estudiado la influencia que tienen sobre el comportamiento osteoblástico los cambios en la composición química superficial inducidos por el tratamiento. Este hecho puede ser relevante (Figura 3.1), sobre todo teniendo en cuenta la especial influencia que puede tener el tipo de “contaminación” inducido sobre las células individuales, ya que los restos de las

partículas, en muchos casos, son del orden del tamaño celular ($\approx 10 \mu\text{m}$) e inferiores (por ejemplo: Figura 2.14).

Es por todo esto que se planteó la caracterización de la respuesta de los tejidos duros al Ti c.p. granallado por medio de ensayos *in vitro*. Para ello, se han cultivado osteoblastos humanos sobre el titanio granallado y se ha determinado su adhesión y su diferenciación a corto plazo.

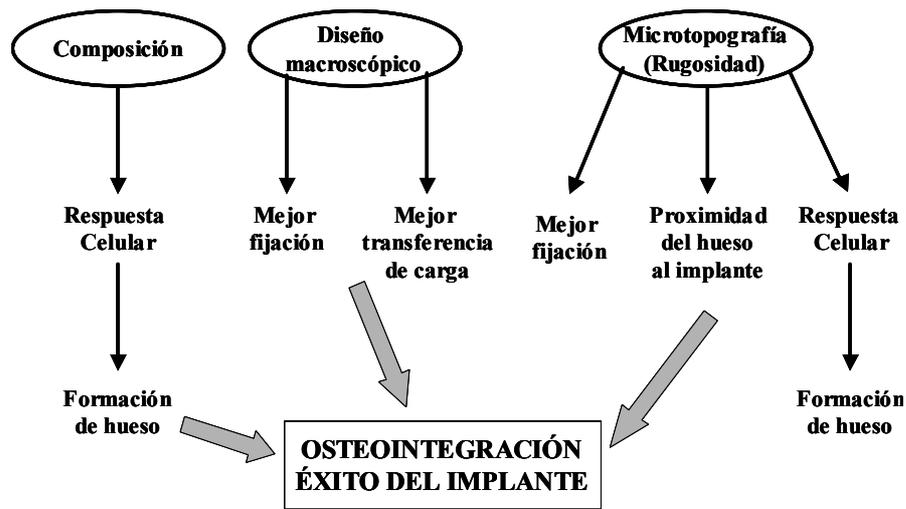


Figura 3.1 Representación de los factores que afectan a la osteointegración de un implante. El éxito del implante depende de la respuesta celular y tisular a la composición química de la superficie del implante, así como a los detalles estructurales de su superficie, a nivel microscópico (rugosidad) y macroscópico (diseño). Adaptado de [BDL01].

3.1.2. Influencia de la composición superficial

3.1.2.1. Sustrato-proteínas-células

La composición química de un implante determina una serie de características superficiales: la naturaleza de la carga superficial [HEP73], la energía superficial [CGB90], la presencia de bordes de grano [KIL94], la química y la estequiometría de los iones superficiales [HAM79], la cristalinidad de sales [MDM98] y óxidos [HBO93], y el potencial de corrosión [SCH01].

Las características superficiales del material tienen una profunda influencia en el éxito del implante ya que determinan la adsorción de proteínas, lípidos, azúcares, e iones presentes en los fluidos tisulares [TEN01] y, particularmente, la orientación de las moléculas adsorbidas [IST93]; [BHD96]. Así pues, la interacción entre el titanio y las moléculas

orgánicas, de entre las cuales, las proteínas son las más significativas, está regida por las propiedades tanto del metal como de las macromoléculas (Tabla 3.I).

Tabla 3.I. *Propiedades que determinan la adsorción proteica sobre el titanio. Traducido de [TEN01].*

Propiedades superficiales del Ti c.p.	Propiedades de las proteínas
Energía libre superficial	Hidrofobicidad global
Carga	Carga
Enlace iónico	Grupos funcionales
Potencial de corrosión Redox	Enlace iónico
Capacidad de enlace con el hidrógeno	Secuencias de enlace con el hidrógeno
Estructura de hidratación superficial	Enlace con el agua
Propiedades ácido/base (potencial Z)	pI
Impurezas superficiales	Secuencias de interacciones específicas
Topografía superficial	Estructura cuaternaria, terciaria y secundaria
Óxido (grosor, cristalinidad, cte. dieléctrica, ...)	Número de puentes disulfuro
Interacciones con moléculas orgánicas pequeñas	Tamaño

Los efectos de la composición química de la superficie son rápidos, de hecho, la adsorción de proteínas se produce en un intervalo de segundos a unos pocos minutos después de la introducción del biomaterial en el tejido vivo [MBN88]; [PKB88]; [PZT90], y la interacción con las pequeñas moléculas todavía es más rápida [KAS83]; [BAM88]; [KAS02], por lo que se ha de suponer que también influirá sobre la adsorción proteica.

Esta adsorción es trascendental para la posterior interacción de las células, puesto que éstas responderán en función de su relación con la capa de proteínas adsorbidas (tipo y orientación). En uno de los primeros estudios sobre este fenómeno, Howlett y col. [HEW94] demostraron que la adhesión de células osteoblásticas sobre distintos sustratos sintéticos, incluyendo el titanio, dependía de la presencia de la proteína vitronectina en la superficie. Este hecho se explica porque las células se unen a las superficies por medio de integrinas [ALB90], que son receptores celulares, ubicados en su membrana, que reconocen lugares específicos en las proteínas de unión. Uno de estos lugares específicos es la secuencia de aminoácidos RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) [BOR89] presente en la fibronectina y la vitronectina, entre otras. Más adelante, Gronowicz y col. [GRM96] demostraron que la naturaleza química del sustrato sintético era capaz de controlar la expresión de las integrinas asociadas a la adhesión celular, es decir, que los puntos focales de adhesión son también sensibles a la naturaleza química del sustrato. Sin embargo, a pesar de que estos estudios demuestran que las células se pueden unir al sustrato directamente, no es probable que sea como esto ocurre *in vivo*, donde la intervención de todo tipo de proteínas presentes en los fluidos corporales permitirá un inmediato recubrimiento de la superficie y, en consecuencia, se modificará el comportamiento de adhesión de las células. Así pues, es mucho más probable que la composición química del sustrato estructure la capa proteica de adsorción (Tabla 3.I), y sobre ésta tendrá lugar la adhesión celular.

Es en este sentido es indispensable evaluar el efecto del tratamiento de granallado sobre el Ti c.p., ya que los cambios de composición química que se pueden operar, aunque sean sutiles, pueden afectar en la respuesta celular desde los primeros instantes de interacción.

3.1.2.2. Respuesta osteoblástica

La adhesión a la superficie (número de células en la superficie y la fuerza de adhesión) es un factor crítico en la respuesta celular porque determina qué células poblarán la superficie, cuántas y cómo. Este primer paso queda determinado, tal y como se acaba de comentar, por la adhesión de las proteínas. Esto proveerá del primer conjunto de células hábiles para los siguientes pasos de proliferación y, la calidad de la adhesión, también influirá sobre la morfología y la diferenciación de los osteoblastos [ANS00]; [BDL01].

Se han llevado a cabo múltiples estudios *in vitro* para determinar el comportamiento de los osteoblastos sobre una larga serie de diferentes sustratos sintéticos (estado del arte en [ANS00]). La diversidad de las respuestas celulares a los distintos materiales que se han ensayado pone de manifiesto la capacidad celular en general, y osteoblástica en particular, de discriminar entre diferentes composiciones químicas. Así, por ejemplo, se ha establecido que los osteoblastos se adhieren mejor sobre titanio y sus aleaciones que, sobre otros metales y polímeros [SMS94] e, incluso, que sobre la hidroxiapatita [PHD91]; mientras que en otros estudios se ha demostrado que la diferenciación osteoblástica es superior sobre la hidroxiapatita, comparada con el Ti c.p. y otros biomateriales [OZK99].

Sin embargo, si los ensayos biológicos *in vitro* no se llevan a cabo con las debidas precauciones, no tienen capacidad para detectar diferencias en el comportamiento celular sobre sustratos con cambios sutiles en su composición química. En consecuencia, se pueden realizar malas interpretaciones respecto al comportamiento *in vivo* que los distintos materiales pueden desarrollar [CSS93]; [KSW94]; [SRB96]; [YMA96].

Cuando se diseña adecuadamente el ensayo, los estudios *in vitro* sí son capaces de detectar sutiles diferencias entre las composiciones de los materiales, ya sea directamente en la composición química de las aleaciones [LBB98], en los procesos de fabricación [HSW94] o por los diferentes procesos de esterilización [SKS94]; [VKD96] y de limpieza [ALK97] aplicados sobre una misma naturaleza de material.

Las precauciones necesarias para un buen ensayo y una buena interpretación de los resultados *in vitro* se centran en el tipo de células empleadas (línea y procedencia); la utilización de hormonas y factores de crecimiento, la selección del marcador de la

diferenciación celular, el adecuado análisis de la morfología celular, etc. Estos aspectos son analizados con más profundidad en la discusión de los resultados de este Capítulo.

Hasta la fecha no se han llevado a cabo estudios sobre la influencia que la presencia de las distintas naturalezas químicas de las partículas de proyección puede tener sobre la respuesta celular. No obstante, investigadores reconocidos, como los profesores J. Lemmons y B. Boyan, han señalado en discusiones científicas públicas [BOS99] la importancia que estas heterogeneidades químicas pueden tener sobre la adhesión, proliferación y diferenciación de los osteoblastos. Ong y col. [OPR96] analizaron la respuesta de adsorción proteica y de mineralización al ser cultivados sustratos de Ti c.p. pulidos con carburo de silicio o con óxido de aluminio con células óseas de rata. Los resultados no encontraron diferencias significativas en la respuesta para ambos tipos de materiales. Por otra parte Naji y Harmand [NAH91] comprobaron la osteocompatibilidad de recubrimientos tanto de óxido de aluminio como de carburo de silicio sobre sustratos metálicos.

3.1.3. Estudios *in vitro* y rugosidad superficial

Se han publicado una gran cantidad de estudios que demuestran que la topografía (textura y rugosidad) de los sustratos influye en distintos parámetros de la respuesta celular. Las referencias a los mismos se detallan a lo largo de este Capítulo.

Se sabe de la influencia de la textura (disposición regular de detalles topográficos) sobre la orientación y la movilidad celular desde principios del siglo XX; fenómeno que se ha venido llamando “guiado por contacto” [HAR11]; [WEI34]; [WEI45] y que, en la actualidad, sigue siendo motivo de estudio [ZAD04]. Se pueden consultar un número significativo de trabajos sobre el estado del arte en este tema [DUN82]; [CUC92]; [MWR93]; [CUW97]. Chesmel y col. [CCB95] demostraron que las células óseas también manifiestan este comportamiento.

Sin embargo, como ya se ha comentado en el Capítulo anterior, el granallado no confiere textura a las superficies de titanio, sino una configuración isotrópicamente rugosa. Por lo tanto, también en el caso del análisis de la respuesta celular *in vitro* sobre implantes dentales de Ti c.p. granallados, la principal variable de estudio es la rugosidad.

Los trabajos sobre la influencia de la rugosidad evalúan, por una parte, la respuesta de los fibroblastos y los queratinocitos [ICP87]; [BRU88]; [MGW93]; [CSW94]; [NMK94]; [CRL99]; [LWO01], por ser las células principalmente implicadas en el cierre gingival, es decir, en la curación de los tejidos blandos; y por otra parte, de los osteoblastos, como principales células implicadas en la regeneración y el crecimiento óseo y, por lo tanto, en la osteointegración.

3.1.4. Osteoblastos sobre titanio granallado

Todos los trabajos coinciden en concluir que la rugosidad superficial tiene un efecto directo sobre la adhesión, proliferación, diferenciación, producción de matriz extracelular, calcificación, y producción de citoquinas y de factores de crecimiento de los osteoblastos *in vitro*; así como en la respuesta de las células a agentes reguladores locales y sistémicos. Los trabajos de estado del arte de Boyan [BDL01];[BLD01] y Anselme [ANS00] exponen con detalle estos resultados para distintos materiales y tipos de rugosidad.

En lo que respecta, específicamente, a superficies de Ti c.p. granalladas, Bowers y col. [BKR92] y Martin y col. [MSH95] demostraron que la adhesión de osteoblastos de la línea MG63 era superior en las superficies de Ti c.p. granalladas que en las que no lo estaban. Para el rango de rugosidades que estudiaron ($R_a = 0,14-1,15 \mu\text{m}$, perfilometría de contacto) concluyeron que la mayor adhesión se produjo para el Ti c.p. granallado con Al_2O_3 y $R_a = 0,87 \mu\text{m}$. Keller y col. [KSW94] confirmaron estos resultados con osteoblastos de explantes de rata, y Deligianni y col. [DKL01] con osteoblastos humanos, aunque sobre la aleación Ti6Al4V.

Es importante mencionar la diferencia que en la literatura en inglés se hace de los términos “*attachment*” y “*adhesion*”. El primero hace referencia, únicamente, al número de células que se unen al sustrato en las primeras horas de cultivo, mientras que el segundo se utiliza para incorporar la idea de la fuerza de adhesión entre esas mismas células y el sustrato [ANS00]; [BDL01]. Sin embargo, en esta Tesis Doctoral se emplea el término “adhesión” como medida del número de células adheridas al sustrato por considerarse un término que en castellano describe mejor que “unión” o “fijación” o “atadura” o “acoplamiento” el tipo de interacción que manifiestan los osteoblastos en cultivo al ubicarse sobre el sustrato metálico. La “*adhesion*” inglesa, se traduce entonces como “fuerza de adhesión”.

Así, la fuerza de adhesión, de acuerdo con Boyan y col. [BHK95]; [SMD96], también es mayor en superficies de Ti c.p. granalladas hasta $R_a = 7 \mu\text{m}$ (microscopía confocal láser), que en las que no lo están. La evaluación de este hecho es cualitativa, pero se puso de manifiesto por la necesidad de realizar más de una tripsinización para completar el arrancamiento de las células en el metal granallado y por las diferencias observadas por MEB en la matriz extracelular y la adhesión de ésta al sustrato. Sin embargo, en otros estudios [KHK92]; [ABN00] se obtuvieron resultados contrarios al cuantificar un menor número de contactos focales de los osteoblastos sobre discos de Ti c.p. y Ti6Al4V granallados, comparados con pulidos, electropulidos y atacados con ácido. Richards y col. [ROR97] encontraron este mismo comportamiento con fibroblastos. Anselme y col.

[ABN00] han propuesto, además, que la fuerza de adhesión se correlaciona mejor con los parámetros híbridos de rugosidad que con los de altura.

La influencia que la rugosidad de las superficies granalladas de Ti c.p. tiene sobre la proliferación celular es menos controvertida. Múltiples trabajos han confirmado que el titanio granallado, rugoso en general, reduce la proliferación osteoblástica al aumentar el valor de la rugosidad [MSH95]; [DGN96]; [LBB98]; [ABN00]; [DSC02]. Schwartz y col. [SMD96], en un estudio sobre Ti c.p. granallado con condrocitos, también demostraron que los efectos de la rugosidad sobre la proliferación son sensibles al estado de maduración de las células, de manera que la disminución de la proliferación se hace tanto más significativa cuanto más inmadura esté la célula.

En cultivos osteoblásticos, la disminución de la proliferación se correlaciona con un aumento en la diferenciación [SLO90]; [LIS92]; [LIS93]. Este hecho, en combinación con los resultados de los trabajos comentados en el párrafo anterior, sugiere que la rugosidad de la superficie también puede regular la expresión fenotípica de los osteoblastos, la cual, de hecho, es una de las principales respuestas celulares como indicador de la capacidad de un determinado sustrato sintético para permitir una rápida y adecuada osteointegración. Martin y col. [MSW95], en un trabajo pionero con osteoblastos de la línea MG63, demostraron que sobre Ti c.p. granallado ($R_a = 3-4 \mu\text{m}$, microscopía confocal láser) la actividad de fosfatasa alcalina y la producción de osteocalcina (los dos marcadores de la diferenciación osteoblástica más empleados) era superior que en el material no granallado. Posteriormente, estos resultados se han confirmado siempre en una larga serie de estudios del mismo grupo de investigación, el de Boyan, Dean y Schwartz [BHD96]; [SMD96]; [LBB98]; [BBK98]; [LSS99]; [BLS01]; [BLL02]; así como otros autores [DGN96]; [DKL01]; [DSC02] han encontrado resultados análogos para osteoblastos humanos. Sin embargo, en ningún caso, se ha diseñado un estudio para identificar el valor de rugosidad óptimo. En los estudios de Boyan, Dean y Schwartz se ha evaluado esta respuesta para Ti c.p. granallado hasta obtener valores de rugosidad de $R_a \approx 7 \mu\text{m}$ (microscopía confocal láser). En este rango, los osteoblastos MG63 se diferencian tanto más cuanto mayor es la rugosidad. De la misma manera que la proliferación, la diferenciación celular sobre el Ti c.p. es dependiente del estado de maduración de las células [SMD96].

Los últimos estados finales de maduración del tejido óseo sobre Ti c.p. rugoso, la producción de matriz extracelular y la calcificación del tejido, han sido poco estudiados *in vitro*. Groessner-Schreiber y Tuan [GRT91] cultivaron osteoblastos embrionarios de pollo en Ti c.p. liso y rugoso, obteniendo mayor producción de matriz extracelular (síntesis de colágeno) y mayor calcificación sobre los discos rugosos que sobre los lisos. Martin y col. [MSH95] también comprobaron que la producción de matriz por parte de osteoblastos MG63 era sensible a la rugosidad del Ti c.p. granallado. Sin embargo, el efecto difería en

función del componente de la matriz estudiado. Mientras la síntesis de colágeno aumentaba con la rugosidad, la sulfatación de proteoglicanos disminuía. También la respuesta de estos factores es dependiente del estado de maduración de las células [SMD96]. Por último, Cooper y col. [CMW99] determinaron que las superficies de Ti c.p. granalladas con óxido de titanio presentaban patrones de mineralización adecuados al cultivar sobre ellos osteoblastos primarios de mandíbula bovina.

Por último, la producción de factores de regulación locales (factores de crecimiento y citoquinas), así como la respuesta de los osteoblastos a éstos y a los de regulación sistémicos (hormonas) también se ve afectada por la rugosidad del Ti c.p. granallado, tal y como ha demostrado en una serie de trabajos, referidos a continuación, el grupo de Boyan, Dean y Schwartz.

La producción de prostaglandina E_2 (PGE_2) [LBB98] por parte de osteoblastos MG63, así como la del factor transformador de crecimiento $\beta 1$ ($TGF-\beta 1$) [KSH96], se incrementan sobre las superficies rugosas de Ti c.p. y Ti6Al4V, comparadas con lisas de las mismas naturalezas. Este hecho sugiere que la rugosidad superficial puede mediar en la regulación autocrina y paracrina de la osteogénesis, puesto que estos dos factores están involucrados en este proceso [CHR84]; [BOM90]. El tipo de factores que liberan las células, y su respuesta a ellos, también difiere en función de su estado de maduración [GHA88]; [NDB91]; [SSK92].

La rugosidad superficial modula la respuesta de los osteoblastos MG63 a hormonas sistémicas. Cuando las células se cultivan sobre superficies de titanio y son tratadas con $1,25-(OH)_2D_3$, su respuesta a la hormona se modifica con respecto a la que se produce normalmente sobre los discos de plástico de cultivo [BBK98]. La adición de $1,25-(OH)_2D_3$, de manera genérica, causa un decremento en la proliferación osteoblástica y un incremento en la actividad de la fosfatasa alcalina, así como en la producción de osteocalcina, es decir, en la diferenciación. Sin embargo, la actividad de la fosfatasa alcalina y la producción de osteocalcina se incrementan dependiendo de la dosis aplicada, siendo en el caso de las superficies más rugosas (cuya superficie estaba recubierta de hidroxiapatita) un efecto sinérgico entre la rugosidad y la presencia de $1,25-(OH)_2D_3$. La producción de PGE_2 y $TGF-\beta 1$ también se ven afectadas. Los resultados refuerzan la hipótesis de que el aumento de la rugosidad superficial conlleva un aumento de la diferenciación osteoblástica. Por lo tanto, cuando los osteoblastos se cultivan en superficies rugosas con la adición de $1,25-(OH)_2D_3$, aquellas responden al metabolito de la vitamina D de una forma que es equivalente a la de un osteoblasto más diferenciado. Ong y col. [OCC97] demostraron que las superficies rugosas de titanio aumentan la respuesta celular a la proteína morfogenética 2 (BMP-2). En los cultivos tratados con este factor de regulación local la actividad de la fosfatasa alcalina se incrementa sobre las superficies rugosas con la misma dependencia que

lo hace la producción de osteocalcina al añadir 1,25-(OH)₂D₃. Este resultado sugiere, de nuevo, que la rugosidad superficial provoca un fenotipo celular más diferenciado, y la célula más diferenciada, por lo tanto, responde a los factores de crecimiento y a las hormonas en una forma apropiada de acuerdo a su estado de maduración.

Schwartz y col. [SLS01]; [SLV01] han propuesto, como conclusión de un gran número de publicaciones, los diferentes mecanismos por los que la rugosidad, así como la vitamina 1,25-(OH)₂D₃, pueden modular las respuestas de proliferación, diferenciación y producción de factores locales de los osteoblastos (Figura 3.2). Este mecanismo se inicia con el reconocimiento celular por medio de integrinas receptoras [GRM96]; [KCG00] de las proteínas que, espontáneamente, recubren al sustrato activando potencialmente la fosfolipasa C, incrementando el nivel de diacilglicerol [HMB89] y activando la proteinquinasa C [SGS98]; [SLS01]. Todo ello desencadena la expresión génica [AKI96]; [CSM98], la regulación de la proliferación, la diferenciación y la producción de factores locales. Este mismo camino de señalización se estimula también por la acción de la 1,25-(OH)₂D₃ sobre un receptor específico de membrana para este compuesto. Estos mismos autores han propuesto otros caminos de señalización y regulación a través, principalmente, de la acción de las proteinquinasas A [LSS99]; [SLS01] y mitogenoactivada [MLV01], activadas por la producción de la prostaglandina E₂ [LSS99]. Un último camino de regulación es el que corresponde a la acción de las ciclooxigenasas [BLS01].

Todos los resultados de estos trabajos sugieren que las modificaciones de la superficie del Ti c.p., con respecto a su microtopografía, pueden influir en la respuesta clínica ya que pueden modular la respuesta celular (Figura 3.1). De hecho, tal y como se introdujo en el Capítulo anterior, se ha comprobado en diferentes estudios *in vivo* que, efectivamente, estos cambios pueden afectar la cantidad y calidad del hueso formado alrededor de los implantes de Ti c.p. granallado.

Los estudios *in vitro*, sin embargo, son los únicos que nos pueden ayudar a tener información sobre cuáles son los primeros eventos de reacción entre el implante y las células osteoprogenitoras. Consecuentemente, los resultados de estudios *in vitro* a corto plazo, obtenidos al cultivar osteoblastos sobre los distintos sustratos, nos ayudan a identificar y seleccionar aquellos más convenientes en vista a la rápida curación y regeneración del huésped, lo cual, además, puede utilizarse para inferir su posible respuesta a más largo plazo. Todo ello sin necesidad de involucrar la participación de animales y, sobre todo, en nuestro caso, sin tan altos costes de investigación, al tener una gran cantidad de diferentes superficies a analizar. Asimismo, los estudios *in vitro* son los únicos que permiten identificar el mecanismo biológico involucrado en las diferentes respuestas con respecto a las diferentes características topográficas.

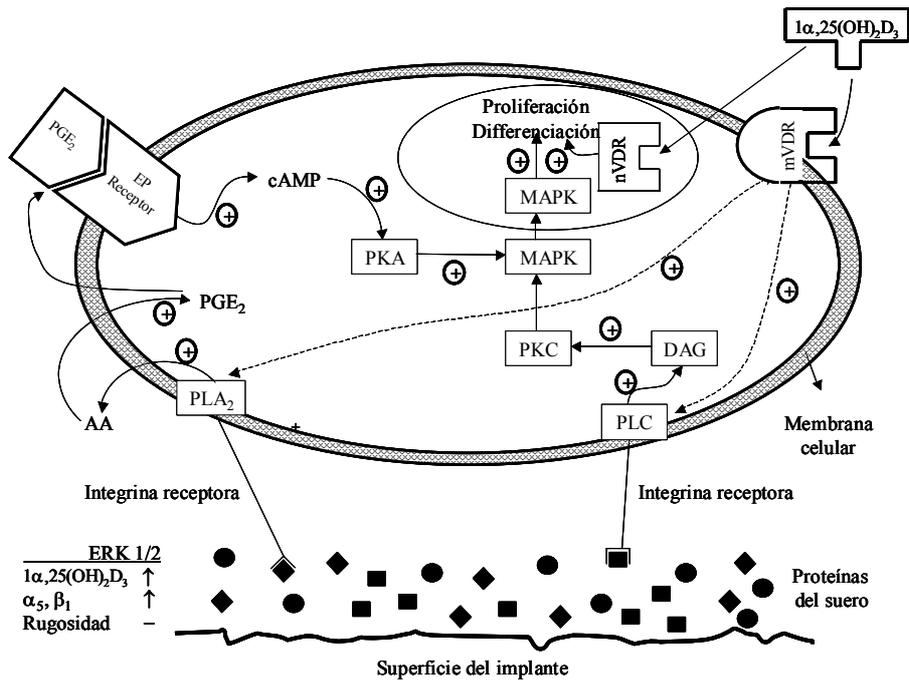


Figura 3.2 Esquema que muestra la interacción de los caminos de señalización que median la respuesta de las células osteoblásticas en función de la rugosidad y de la 1α,25-(OH)₂D₃. PLA₂: fosfolipasa A₂, PLC: fosfolipasa C, DAG: diacilglicerol, PKC: proteinquinasa C, cAMP: monofosfato de adenosina cíclico, PKA: proteinquinasa A, AA: ácido araquidónico, PGE₂: prostaglandina E₂, MAPK: proteinquinasa mitogenoactivada, y ERK1/2: quinasa regulada por señales extracelulares. Adaptado de [SLV01].

3.2. Objetivos

En el Capítulo anterior de esta Tesis Doctoral se han caracterizado las propiedades topográficas (rugosidad) y la contaminación superficial del Ti c.p. granallado con distintas naturalezas (TiO_2 , ZrO_2 , Al_2O_3 y SiC) y tamaños (125-1400 μm) de partículas de proyección. Se han obtenido superficies de titanio con distintos valores de rugosidad ($R_a = 0,33 \div 7,39 \mu\text{m}$; $P_c = 56,5 \div 202,6 \text{ cm}^{-1}$) y con las superficies químicamente heterogéneas, puesto que en todos los casos han quedado restos de las partículas de proyección sobre las superficies metálicas.

Los objetivos de este Capítulo son:

- 1.- Evaluar la influencia que la rugosidad del Ti c.p. tiene sobre la adhesión y la diferenciación a corto plazo de osteoblastos humanos.
- 2.- Evaluar la influencia que la naturaleza de las partículas de proyección del granallado tienen sobre la adhesión y la diferenciación a corto plazo de osteoblastos humanos.
- 3.- Identificar la(s) combinación(es) de tamaño y naturaleza de las partículas de proyección del granallado que pueden mejorar la osteointegración de los implantes dentales de Ti c.p.

3.3. Materiales y Métodos

3.3.1. Materiales

3.3.1.1. Material base y partículas de proyección del granallado

Los estudios celulares *in vitro* se han llevado a cabo sobre discos de 6 mm de diámetro de Ti c.p. grado III granallados con las mismas partículas descritas en los Apartados 2.3.1.1. y 2.3.1.2., es decir, ZrO_2 , TiO_2 , Al_2O_3 y SiC.

Como control negativo (CN) del estudio se ha empleado el plástico de cultivo, poliestireno ($R_a = 0,013 \pm 0,002 \mu m$; perfilómetro de contacto), en discos de 6,4 mm de diámetro.

3.3.1.2. Células

Las células empleadas han sido osteoblastos de origen humano (paciente varón de 55 años sin enfermedades metabólicas asociadas), procedentes de explantes de hueso esponjoso de mandíbula.

Los explantes se obtienen de trocear el hueso en tamaños de, aproximadamente, 5 mm^2 y se incuban en medio de cultivo *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) (Gibco, EE.UU.) suplementado con suero bovino fetal (FCS) (Sera-lab, Reino Unido) al 20%, penicilina-streptomina (Biological Industries, Israel) al 1% y, piruvirato L-glutamina (Gibco, EE.UU.) también al 1 %.

Las células para los ensayos son del quinto pase que han crecido en frascos de cultivo de 3 ml hasta la densidad deseada. Las células se lavan con *Dulbecco's phosphate buffered saline* (PBS) (Gibco, EE.UU.) y se despegan utilizando tripsina-EDTA al 0,25 % (Biological Industries, Israel).

Previamente, y durante la realización del ensayo, se llevaron a cabo controles de especificidad mediante marcaje histoquímico de la fosfatasa alcalina intracelular (SIGMA, EE.UU.). En todos los casos las células se tiñeron intensamente demostrando su adecuado fenotipo osteoblástico.

3.3.2. Métodos

3.3.2.1. Obtención de los discos

Los discos se obtuvieron al granallar la superficie de los mismos con las mismas condiciones descritas en el Apartado 2.3.2.1., obteniéndose las mismas características topográficas, tanto cuantitativa (Tabla 2.VII) como cualitativamente (Figuras 2.10-2.23); así como las mismas características de contaminación superficial (Tabla 2.VIII). Por lo tanto, los grupos estudiados son:

Ti:	titanio mecanizado sin granallar.
ZR2:	granallado con partículas de óxido de circonio de tamaños 125-250 μm .
ZR6:	granallado con partículas de óxido de circonio de tamaños 425-600 μm .
TI6:	granallado con partículas de óxido de titanio de tamaños 290-570 μm .
AL2:	granallado con partículas de óxido de aluminio de tamaños 212-300 μm .
AL6:	granallado con partículas de óxido de aluminio de tamaños 425-600 μm .
AL9:	granallado con partículas de óxido de aluminio de tamaños 1000-1400 μm .
SI2:	granallado con partículas de carburo de silicio de tamaños 212-300 μm .
SI6:	granallado con partículas de carburo de silicio de tamaños 425-600 μm y pasivado con solución de HCl.
SI6-HF:	granallado con partículas de carburo de silicio de tamaños 425-600 μm y pasivado con solución de HF/HNO ₃ .
SI9:	granallado con partículas de carburo de silicio de tamaños 1000-1400 μm .
CN:	poliestireno de cultivo. Control negativo para la citotoxicidad.

Todos los discos se esterilizaron mediante óxido de etileno a 37 °C de temperatura, 760 mbar de presión, durante 5 h. A continuación se mantienen durante 18 h con aireación forzada y 24 h más de aireación normal.

3.3.2.2. Adhesión y diferenciación celular

El protocolo experimental está basado en la norma NF S90-702 y en los estudios descritos por Clover y Gowen [CLG94].

3.3.2.2.1. Cultivo

Se distribuyeron los 72 discos objeto del estudio en una placa de 96 pocillos (Figura 3.3) de 6,4 mm de diámetro, de acuerdo al siguiente esquema:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CN	CN	CN	CN	CN	CN					
B	ZR2	ZR6	TI6	AL2	AL6	AL9	SI2	SI6	SI6-HF	SI9	Ctr medio
C	ZR2	ZR6	TI6	AL2	AL6	AL9	SI2	SI6	SI6-HF	SI9	Ctr medio
D	ZR2	ZR6	TI6	AL2	AL6	AL9	SI2	SI6	SI6-HF	SI9	Ctr medio
E	ZR2	ZR6	TI6	AL2	AL6	AL9	SI2	SI6	SI6-HF	SI9	
F	ZR2	ZR6	TI6	AL2	AL6	AL9	SI2	SI6	SI6-HF	SI9	
G	ZR2	ZR6	TI6	AL2	AL6	AL9	SI2	SI6	SI6-HF	SI9	
H	Ti	Ti	Ti	Ti	Ti	Ti					

Se sembraron 6 discos de cada material con una suspensión celular de 12100 células/cm², es decir 4000 células/pocillo, y se incubaron a 37 °C con medio completo IMDM (*Iscore Modified Dulbecco's Medium*) (Sebak, Austria) en atmósfera húmeda al 5,5 % de CO₂.

Al cabo de 24 horas, se cambió el medio de cultivo por 200 µl de IMDM más 3% de suero delipidado con carbón activado (SIGMA, EE.UU.) conteniendo vitaminas K₁ (10⁻⁸ M) (SIGMA, EE.UU.), C (50 µg/ml) (SIGMA, EE.UU.) y 1α,25-(OH)₂D₃ (10⁻⁸ M) (SIGMA, EE.UU.), para la inducción de producción máxima de osteocalcina. En la columna 12 se añadió medio de cultivo como control de las soluciones.

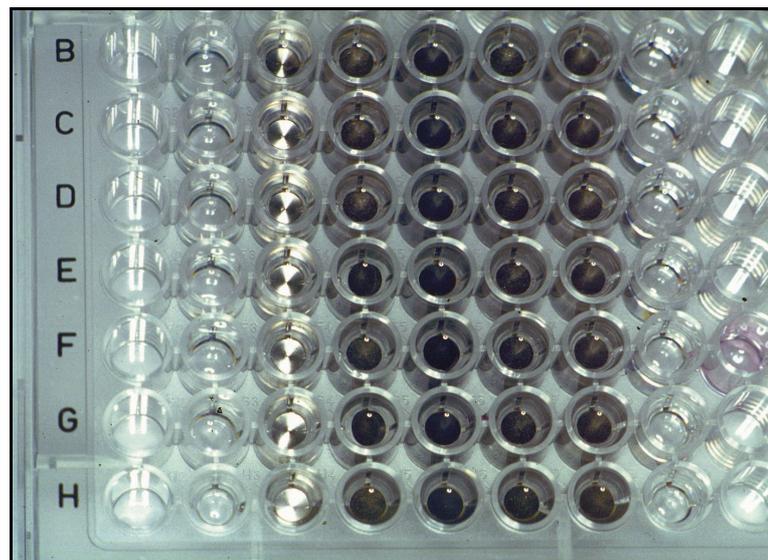


Figura 3.3 Imagen de la distribución de muestras en los distintos pocillos de la placa de cultivo empleada.

Después de 72 horas de incubación, se recolectó el medio de cultivo de cada pocillo en tubos eppendorf de 1,8 ml, que se congelaron a -20 °C hasta el momento de la determinación de la producción de osteocalcina.

3.3.2.2.2. Recuento celular

La adhesión celular se evaluó por medio del recuento de las células que había sobre la superficie de los discos tras las primeras 24 h de cultivo.

Se realizó una doble tripsinización de los cultivos (Biological Industries, Israel) y se realizó el recuento celular en cámara de Malassez (Marienfeld, Alemania) (Figura 3.4) con un microscopio invertido con ocular micrométrico (1 cm³) y con el objetivo de x10, campo de 0,01 cm². Se leyeron 5 campos en cada pocillo y se obtuvo el valor medio.

Los resultados se han expresado en n° células/0,01 cm².

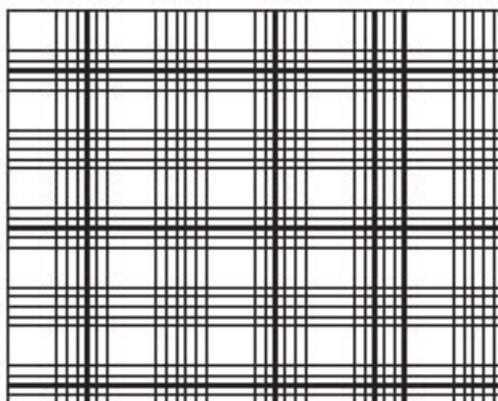


Figura 3.4 Representación de la configuración de campos de una cámara de Malassez para el recuento celular [PW-PST].

3.3.2.2.3. Citotoxicidad

El porcentaje de citotoxicidad de los distintos tratamientos ensayados se ha calculado a través de los valores medios del recuento celular y de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ citotoxicidad} = \left(\frac{(CN - \text{Tratamiento evaluado})}{CN} \right) \cdot 100$$

Las desviaciones correspondientes a los valores de citotoxicidad se han calculado aplicando las reglas de propagación de errores a partir de los valores de desviación estándar de las medias de los recuentos celulares.

3.3.2.2.4. Proteínas totales

Las proteínas totales se calcularon para poder normalizar la concentración de osteocalcina con respecto al valor de proteínas totales.

Se recolectaron las células de cada pocillo y tras su centrifugación (CR3.12, Jouan, Francia) a 1000 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se añadieron 100 μ l de Tween[®] 20 (SIGMA, EE.UU.) al 0,1 %, en agua destilada para llevar a cabo la rotura de las células.

Se tomó una alícuota de 50 μ l con la que se determinó la concentración de proteínas (μ g de proteínas/ml de solución) mediante el *kit* de proteínas totales [SIGMA, EE.UU.], basado en el micrométodo de Lowry [LRF51] modificado por Peterson [PET77]. La lectura de la absorbancia se realizó a 450 nm en un lector de multiplacas (Lucy2, Anthos, Austria).

3.3.2.2.5. Producción de osteocalcina

La diferenciación celular se evaluó por medio de la determinación de la concentración de osteocalcina en el medio tras el tiempo de cultivo. La determinación se llevó a cabo para 4 pocillos de cada tratamiento (posiciones C, D, E y F para ZR2, ZR6, TI6, AL2, AL6, A19, SI2, SI6, SI6-HF y SI9; y posiciones 3, 4, 5 y 6 para CN y Ti).

El día de la determinación de los niveles de producción de osteocalcina las muestras se descongelaron a temperatura ambiente.

Se prepararon los estándares de osteocalcina para obtener la recta de calibración. Las concentraciones para la calibración fueron 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 y 16 ng de osteocalcina/ml. Cada muestra se valoró por duplicado.

Se procedió a la determinación de los ng de osteocalcina/ml de solución de acuerdo a las indicaciones del *Kit* EIA (Takara Bio Inc., Japón) para la determinación de la producción de osteocalcina tipo-gla (γ -carboxilada). La lectura de las absorbancias se determinó a 450 nm con el lector de multiplacas (Lucy2, Anthos, Austria).

Los resultados de producción de osteocalcina se han expresado como ng de osteocalcina/ μ g de proteínas totales.

3.3.2.3. Morfología celular

Un disco de cada serie (posición G para ZR2, ZR6, TI6, AL2, AL6, Al9, SI2, SI6, SI6-HF y SI9; y posición 7 para CN y Ti) se fijó con glutaraldehído (Agar Scientific, Reino Unido) al 2,5 % en tampón cacodilato (Agar Scientific, Reino Unido) durante 2 horas a 4 °C. Posteriormente se lavaron con tampón cacodilato 0,1 M en agua destilada. A continuación se deshidrataron, se llevaron al punto crítico, se metalizaron con oro y se visualizaron por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB) (XL30, Philips, Holanda).

3.3.2.4. Estadística

Para evaluar si las diferencias entre los valores medios obtenidos eran estadísticamente significativas con respecto al control negativo, se han calculado las tablas ANOVA de un factor y se ha aplicado el test de comparaciones múltiples de Dunnett con significación en las diferencias para $p < 0,05$.

Para evaluar si las diferencias entre los distintos valores obtenidos eran estadísticamente significativas, se han calculado las tablas ANOVA de un factor y se ha aplicado, en el caso del recuento celular, el test de comparaciones múltiples de Fisher; y en el caso de la producción de osteocalcina, el de Tukey. En ambos casos con significación en las diferencias para $p < 0,05$. El empleo del test de Tukey, en lugar del de Fisher, se fundamenta en que las muestras para la producción de osteocalcina no eran todas del mismo tamaño, puesto que en algunos grupos, por problemas prácticos, se perdió una lectura. En este caso, el test de Tukey es más robusto que el de Fisher y se recomienda su uso. Asimismo, se ha evaluado el test de comparaciones múltiples de Dunnett, con el objetivo de identificar la significación estadística de las diferencias de todos los tratamientos con respecto al grupo control. También en este caso, se ha establecido como valor de significación $p < 0,05$.

Todos estos tests se han llevado a cabo con la ayuda de un software apropiado (MINITAB™ Release 13.1, Minitab Inc., EE.UU.).

3.4. Resultados

3.4.1. Adhesión y citotoxicidad

Los valores de adhesión osteoblástica se resumen en la Tabla 3.II y están expresados como el valor medio de las células/0,01 cm² para cada tipo de tratamiento. En la misma Tabla 3.II se reflejan los valores de citotoxicidad calculados a partir de los recuentos celulares para la determinación de la adhesión.

Tabla 3.II Valores de adhesión osteoblástica y de citotoxicidad sobre discos de Ti c.p. para los distintos tipos de granallado. DE: desviación estándar. DEM: desviación estándar de la media.

	Adhesión [n° cél./0,01 cm ²]	DE Adh.	DEM Adh.	Citotoxicidad [%]	DEM Citot.
CN	20,62	4,83	1,97	0,00	0,00
Ti	19,17	2,40	0,98	7,03	11,34
ZR2	23,58	3,87	1,58	-14,35	13,61
ZR6	24,82	5,81	2,37	-20,36	16,89
TI6	24,57	6,38	2,61	-19,15	17,68
AL2	31,57	10,62	4,34	-53,10	28,18
AL6	51,43	6,25	2,55	-149,41	46,05
AL9	39,62	4,76	1,94	-92,14	22,21
SI2	26,72	7,78	3,18	-29,58	20,96
SI6	38,53	7,27	2,97	-86,85	25,58
SI6/HF	27,82	8,75	3,57	-34,91	23,11
SI9	36,48	10,04	4,10	-76,91	29,40

En la Figura 3.5 se representan gráficamente los resultados obtenidos para la adhesión de los osteoblastos y en la Figura 3.6 se ilustra la representación gráfica para los resultados de citotoxicidad.

Los resultados demuestran que para todos los grupos estudiados, excepto para los discos sin granallar (grupo Ti), la adhesión es superior al grupo control, por lo que los valores de citotoxicidad son negativos. Este grupo, sin embargo, tampoco presenta un valor de citotoxicidad superior al 25 %, por lo que no se considera citotóxico.

Los grupos que presentan diferencias estadísticamente significativas (Test de Dunnett, $p < 0,05$) con respecto al control negativo son AL6, AL9, SI6, SI9 (Figura 3.5); es decir, los mejores resultados se han obtenido con los discos granallados con partículas de Al₂O₃ o SiC; y de tamaños 425-600 μm o 1000-1400 μm , siempre pasivados con HCl. De entre ellos, sólo los discos AL6 (Al₂O₃; 425-600 μm) presentan un valor superior a todos los demás con diferencias estadísticamente significativas (Test de Fisher, $p < 0,05$) (Figura 3.5; Tabla 3.III). La diferencia que estos discos tienen con respecto al resto se hace más evidente al comparar los valores de citotoxicidad (Figura 3.6).

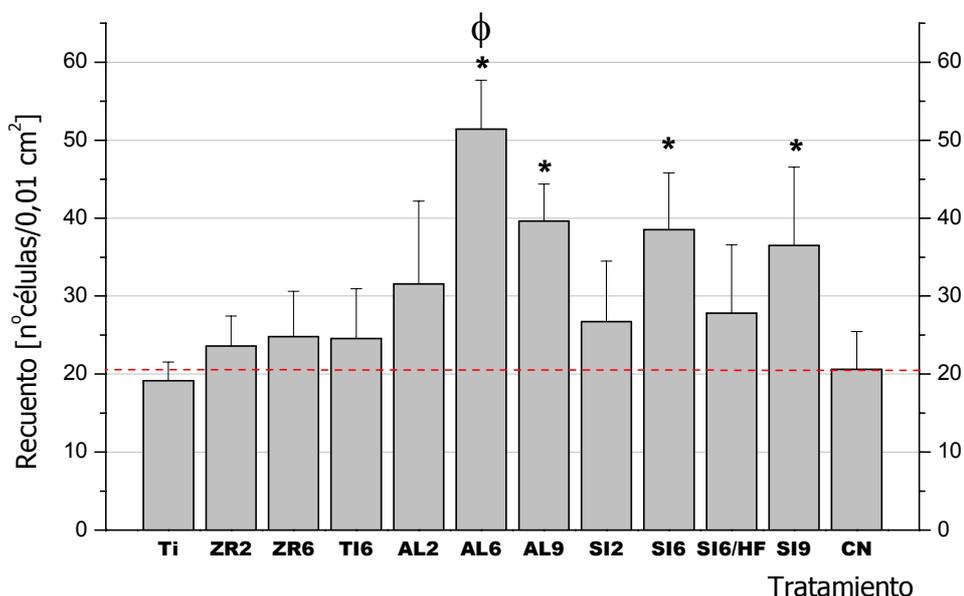


Figura 3.5 Resultados de la adhesión osteoblástica. (*) indica diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo CN ($p < 0,05$; test de Dunnett). (ϕ) indica diferencia estadísticamente significativa con respecto a todo el resto de grupos ($p < 0,05$; test de Fisher).

Los osteoblastos se adhieren menos sobre los discos granallados con óxido de circonio que sobre los discos granallados con óxido de aluminio o carburo de silicio, para el mismo rango de tamaños de partículas, con diferencias estadísticamente significativas (Test de Fisher, $p < 0,05$) (Tabla 3.III).

Comparando los resultados de adhesión entre discos granallados con óxido de aluminio y con carburo de silicio, para los distintos tipos de tamaños de partícula, los osteoblastos se adhieren con preferencia sobre los discos granallados con óxido de aluminio (AL2 vs SI2; AL6 vs SI6; y AL9 vs SI9) (Figura 3.5).

Finalmente, los osteoblastos sobre discos granallados con carburo de silicio y pasivados con HF/HNO₃ (grupo SI6/HF) se han adherido en menor medida (con diferencias estadísticamente significativas) que los discos granallados con el mismo tipo y tamaño de partículas, pero pasivados con HCl (grupo SI6) (Tabla 3.III).

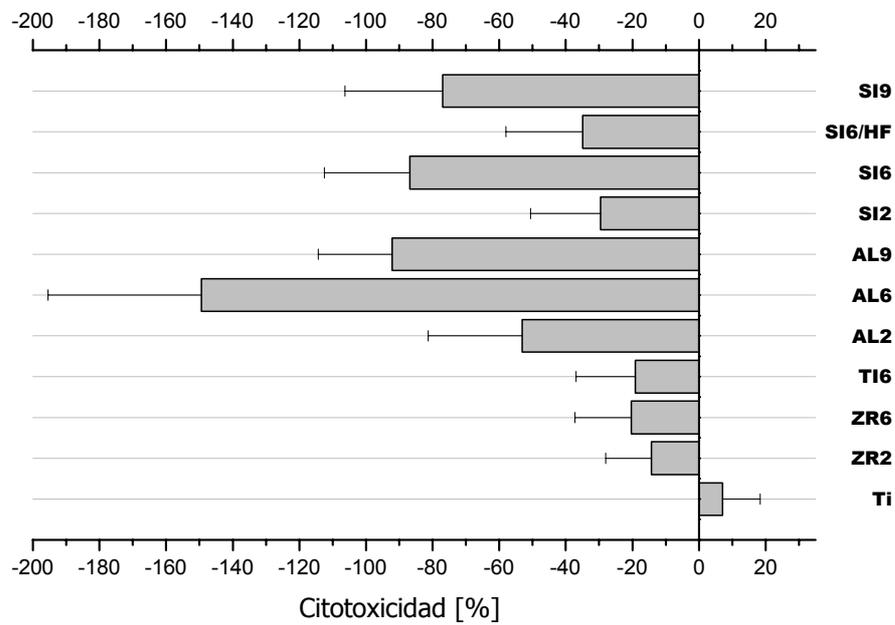


Figura 3.6 Resultados de citotoxicidad para todos los tratamientos estudiados. Los resultados negativos indican ausencia de citotoxicidad.

Tabla 3.III Resultados de adhesión osteoblástica, ordenados de menor a mayor, con la significación estadística de las diferencias: Grupos unidos con una misma barra no tienen diferencias estadísticamente significativas (Test de Fisher; $p < 0,05$). DE: desviación estándar.

	Adhesión \pm DE [n° cél./0,01 cm ²]
Ti	19,17 \pm 2,40
CN	20,62 \pm 4,83
ZR2	23,58 \pm 3,87
TI6	24,57 \pm 6,38
ZR6	24,82 \pm 5,81
SI2	26,72 \pm 7,78
SI6/HF	27,82 \pm 8,75
AL2	31,57 \pm 10,62
SI9	36,48 \pm 10,04
SI6	38,53 \pm 7,27
AL9	39,62 \pm 4,76
AL6	51,43 \pm 6,25

3.4.2. Diferenciación

Los resultados de producción de osteocalcina se resumen en la Tabla 3.IV y se representan gráficamente en la Figura 3.7.

Tabla 3.IV Valores de producción de osteocalcina para los osteoblastos sobre discos de Ti c.p. con los distintos tipos de granallado. DE: desviación estándar.

	Diferenciación [ng osteocalcina/ μg proteínas]	
	DE	DE
CN	0,353	0,190
Ti	0,428	0,049
ZR2	0,249	0,084
ZR6	0,413	0,275
TI6	0,201	0,039
AL2	0,456	0,075
AL6	0,475	0,307
AL9	0,387	0,156
SI2	0,501	0,286
SI6	0,608	0,222
SI6/HF	0,382	0,212
SI9	0,452	0,209

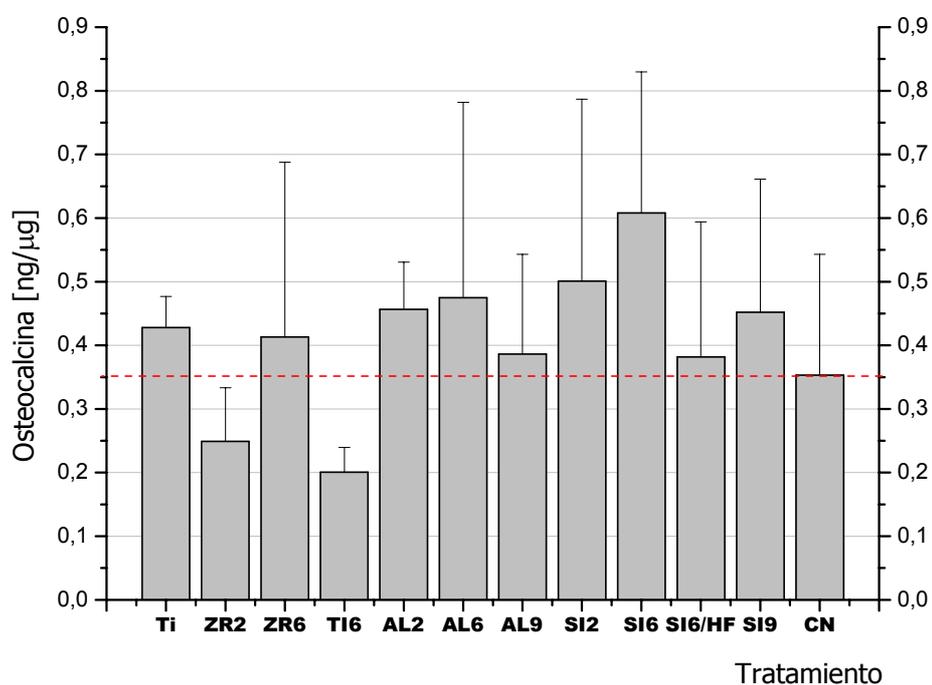


Figura 3.7 Resultados de la diferenciación de los osteoblastos sobre las diferentes superficies estudiadas.

No se ha obtenido ninguna diferencia estadísticamente significativa, ni entre los distintos grupos con respecto al grupo control, ni entre un grupo con respecto a los otros Figura 3.7. Sin embargo, cabe destacar que los grupos ZR2 y TI6 presentan valores medios de diferenciación inferiores a CN (Tabla 3.IV; Figura 3.7).

Asimismo, es destacable que para una misma naturaleza de partícula, los valores de diferenciación superiores se han obtenido para los osteoblastos cultivados sobre discos granallados con partículas de entre 425 y 600 μm (ZR6 vs ZR2; AL6 vs AL2 y AL9; y SI6 vs SI2 y SI9).

De la misma manera que para los resultados de adhesión, los valores de diferenciación son inferiores para Si6/HF que para SI6, indicando la influencia que el diferente tratamiento de pasivado tiene sobre la respuesta celular.

Finalmente, si se comparan los resultados entre los discos granallados con óxido de aluminio y con carburo de silicio, para un mismo tamaño de partícula, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas, la producción de osteocalcina es superior en los osteoblastos sobre discos granallados con carburo de silicio.

3.4.3. Morfología celular

Las Figuras 3.8-3.10 muestran osteoblastos sobre superficies de titanio mecanizadas. Las células tienen morfología plana, en íntimo contacto con el material, en algunos casos conectadas entre sí (Figura 3.9), y sin actividad dorsal.

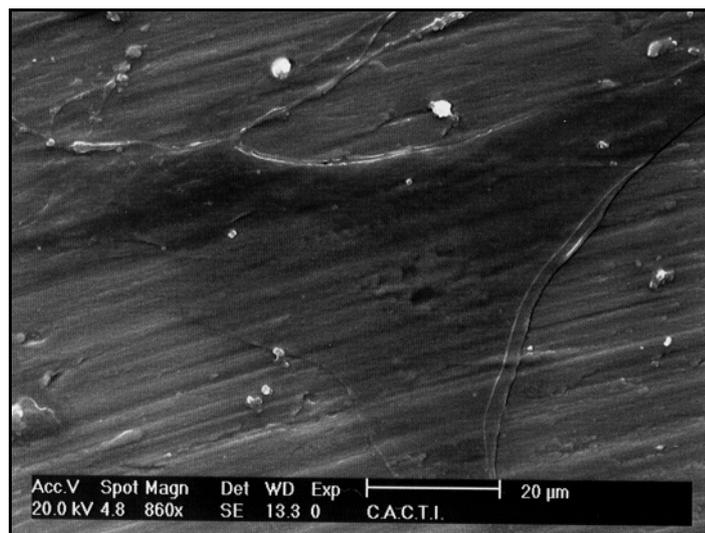


Figura 3.8 Micrografía MEB de un osteoblasto sobre una superficie de Ti c.p. mecanizada ($\times 860$).

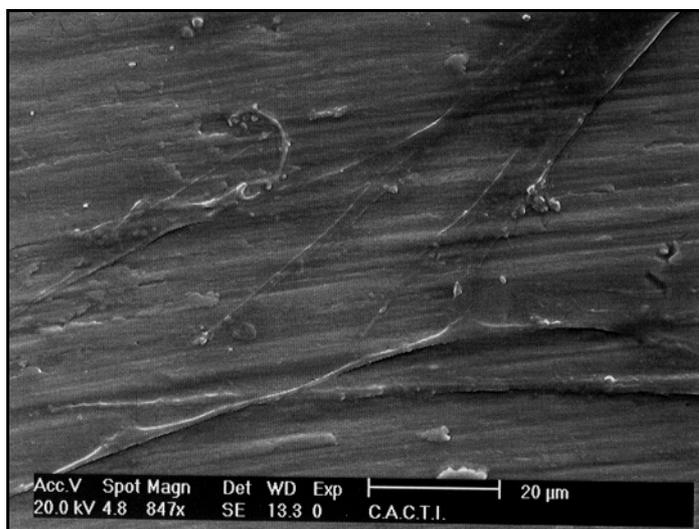


Figura 3.9 Micrografía MEB de un osteoblasto sobre una superficie de Ti c.p. mecanizada (x847).

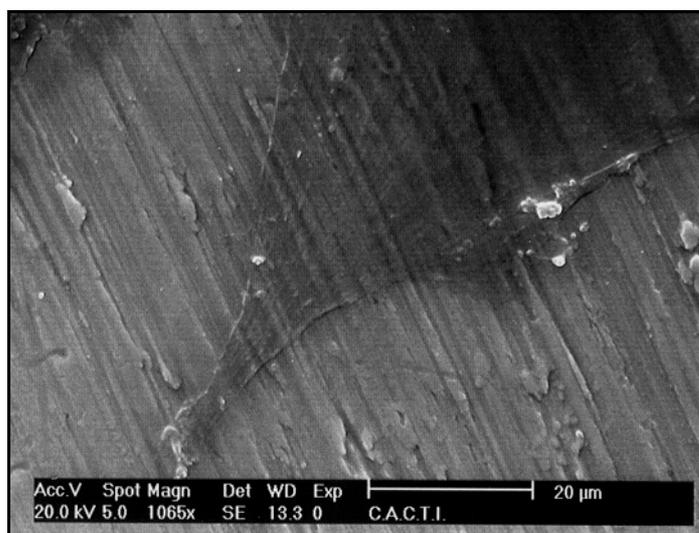


Figura 3.10 Micrografía MEB de un osteoblasto sobre una superficie de Ti c.p. mecanizada (x1065).

Los osteoblastos sobre las superficies granalladas con TiO_2 (Figuras 3.11-3.12) presentan una morfología similar a la mostrada sobre los sustratos mecanizados, siendo mayoritariamente planos uniéndose entre sí y al sustrato por medio de expansiones lamelares y alguna extensión citoplasmática de pequeño diámetro (filopodios), que también se imbrican en la superficie.

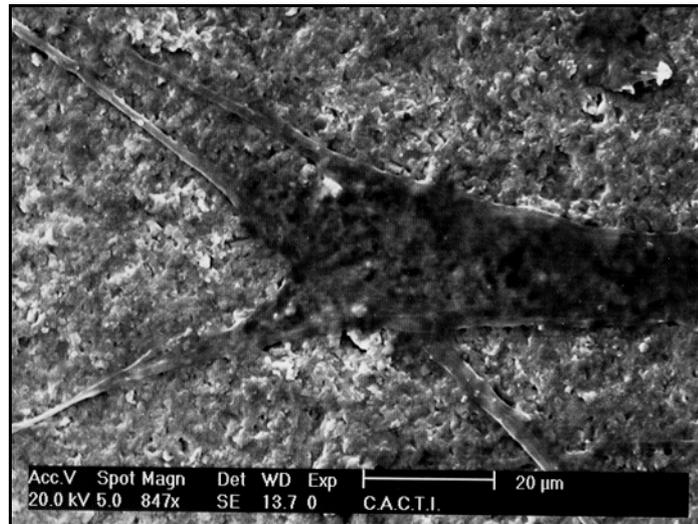


Figura 3.11 Micrografía MEB de un osteoblasto sobre una superficie de Ti6 ($\times 847$).

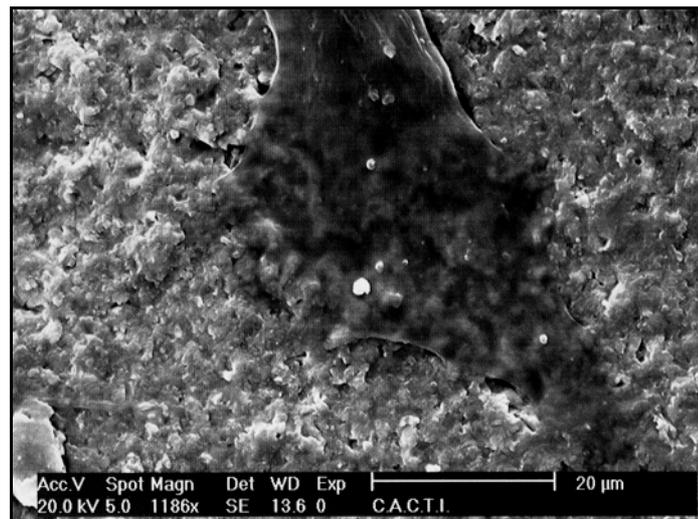


Figura 3.12 Micrografía MEB de un osteoblasto sobre una superficie de Ti6 ($\times 1146$).

La morfología celular sobre el resto de los sustratos rugosos es significativamente distinta a la obtenida sobre los sustratos mecanizados y Ti6. Las células sobre sustratos granallados con ZrO_2 (Figuras 3.13-3.14), Al_2O_3 (Figuras 3.15-3.18) y SiC pasivado con HCl (Figuras 3-19-3.22) o con HF/ HNO_3 (Figuras 3.23-3.25), cualquiera que sea el tamaño de partícula empleado, son células compactas y extendidas, que muestran abundantes filopodios íntimamente adheridos a la superficie sintética, con actividad dorsal, y presencia de restos de matriz extracelular.

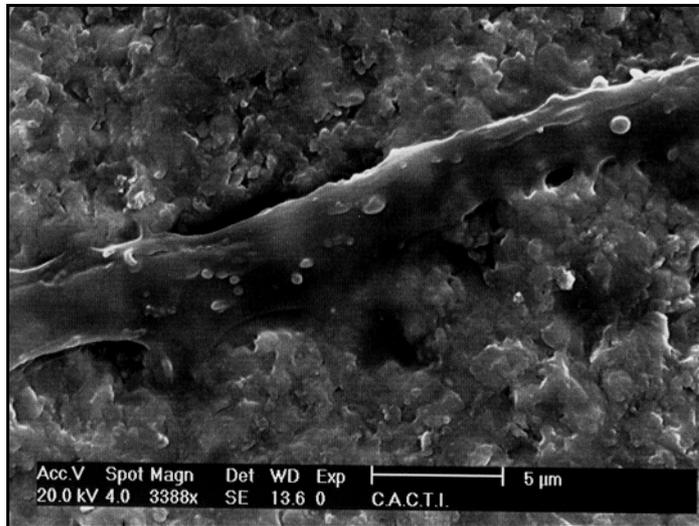


Figura 3.13 *Micrografía MEB de un osteoblasto sobre una superficie de ZR2 (x3382).*

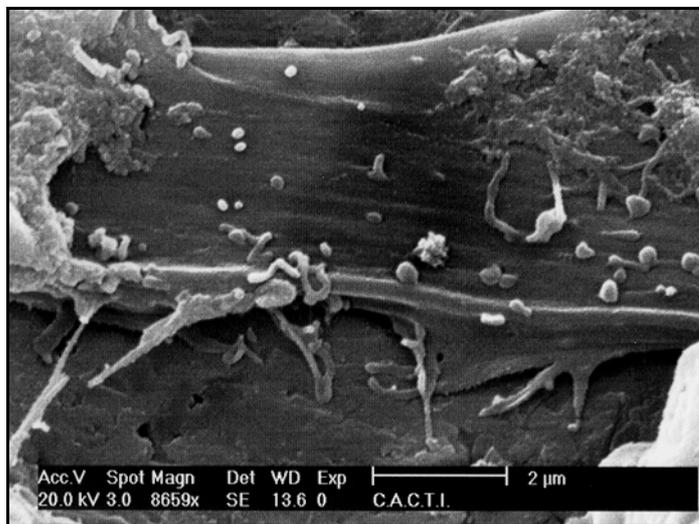


Figura 3.14 *Micrografía MEB de un osteoblasto sobre una superficie de ZR6 (x8659).*

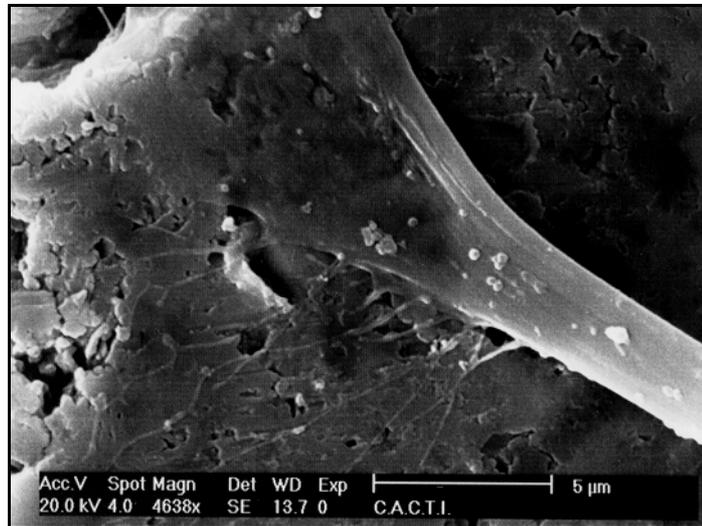


Figura 3.15 *Micrografía MEB de un osteoblasto sobre una superficie de AL2 (x4638).*

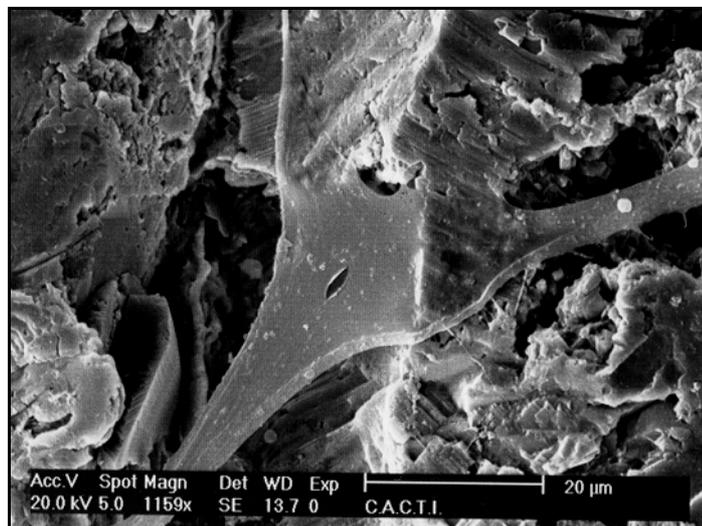


Figura 3.16 *Micrografía MEB de un osteoblasto sobre una superficie de AL6 (x1159).*

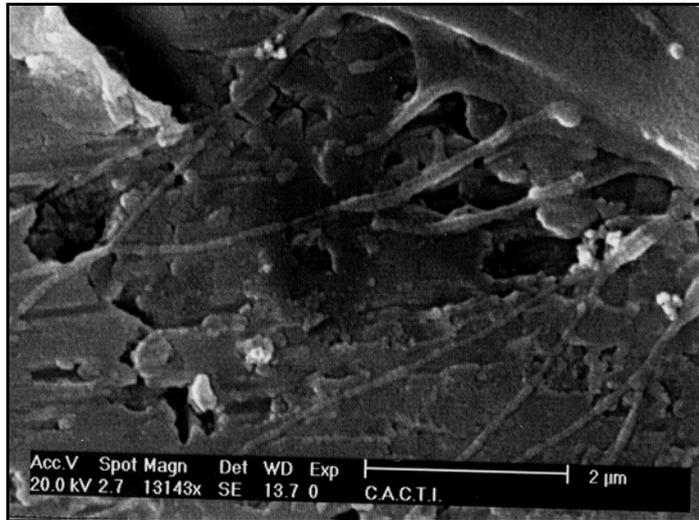


Figura 3.17 Micrografía MEB de un osteoblasto sobre una superficie de AL6 ($\times 13143$).

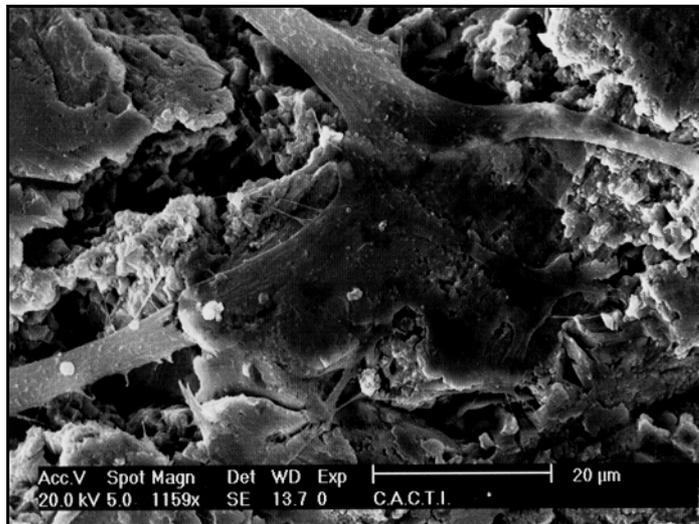


Figura 3.18 Micrografía MEB de un osteoblasto sobre una superficie de AL9 ($\times 1159$).

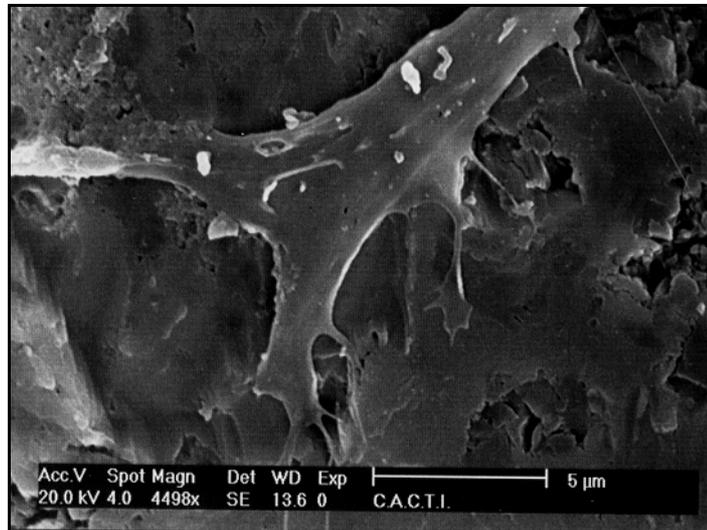


Figura 3.19 Micrografía MEB de un osteoblasto sobre una superficie de SI2 ($\times 4498$).

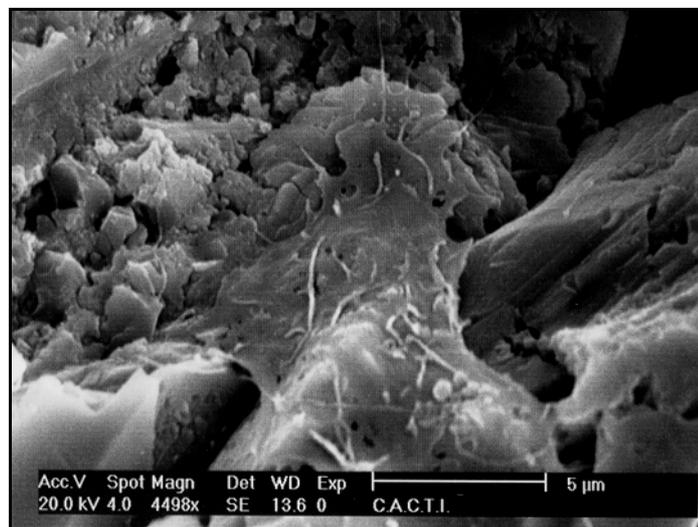


Figura 3.20 Micrografía MEB de un osteoblasto sobre una superficie de SI6 ($\times 4498$).

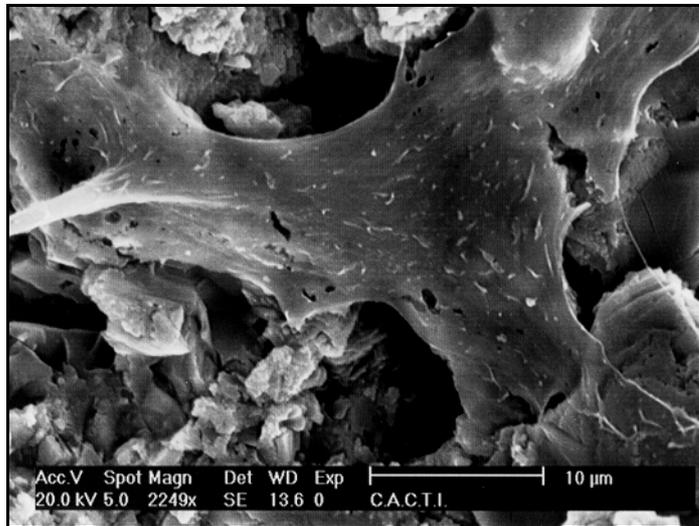


Figura 3.21 Micrografía MEB de un osteoblasto sobre una superficie de SI6 ($\times 2249$).

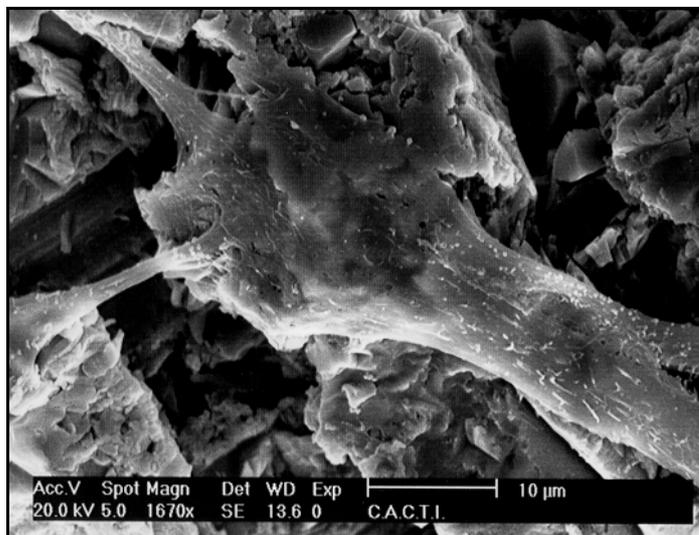


Figura 3.22 Micrografía MEB de un osteoblasto sobre una superficie de SI9 ($\times 1670$).

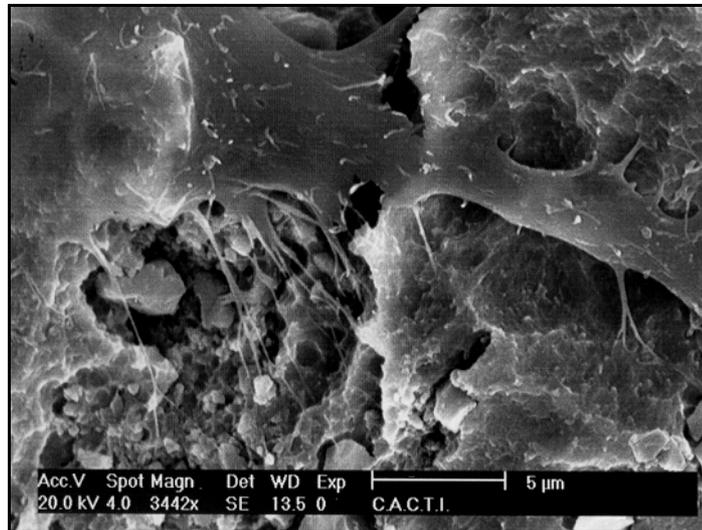


Figura 3.23 Micrografía MEB de un osteoblasto sobre una superficie de SI6-HF ($\times 3442$).

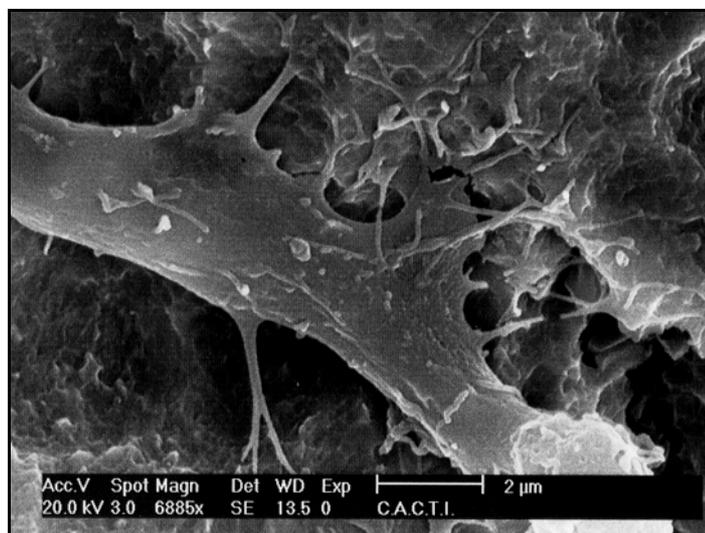


Figura 3.24 Micrografía MEB de un osteoblasto sobre una superficie de SI6-HF ($\times 6885$).

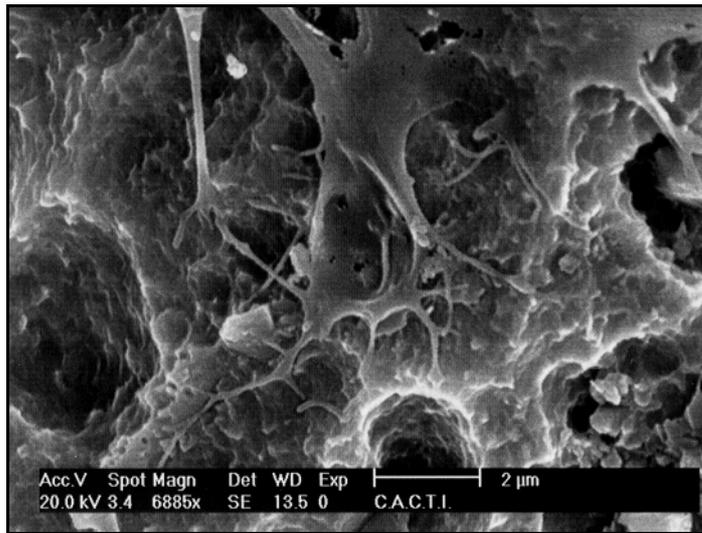


Figura 3.25 *Micrografía MEB de un osteoblasto sobre una superficie de SI6-HF (x6885).*

3.5. Discusión

3.5.1. Adhesión y citotoxicidad

La introducción de un implante en una herida ocasionada por trauma o por efecto de la intervención quirúrgica expone la superficie del material a los fluidos corporales y todos los componentes que están presentes en él (Tabla 3.V). Estas moléculas interactúan rápidamente con la superficie, la condicionan y modifican la adhesión celular, formando un coágulo y estabilizando el hematoma, a partir de lo cual se promueve la migración de células osteoprogenitoras a la zona dañada [BDL01]. Es por esto que, tal y como se detallaba en la introducción de este Capítulo, la adhesión celular se produce sobre una capa de proteínas adsorbidas en la superficie. La naturaleza, conformación y orientación de estas proteínas estará condicionada por la composición química de la superficie [IST93] ya que ésta modifica una serie de propiedades fisicoquímicas de transcendencia para la interacción con las proteínas (Tabla 3.I).

Tabla 3.V *Proceso de integración de un implante en el hueso. Traducido de [BDL01].*

Tiempo	Proceso	Células involucradas
0-2 días	Formación del coágulo	Plaquetas
	Estabilización de hematoma	Células inmunológicas
2-3 días	Organización del hematoma	Células mesenquimales
	Aparición de las células mesenquimales	Células osteocondroprogenitoras
3-10 días	Proliferación de ostoprogenitores y diferenciación osteoblástica	Preosteoblastos Osteoblastos
	Producción de factores locales	
	Regulación de autocrinas y paracrinas	
	Desaparición del hematoma	
	Síntesis de osteoide	
1-3 semanas	Maduración del osteoide	Osteoblastos
	Calcificación	
3-4 semanas	Maduración del tejido óseo	Osteocitos
+ 4 semanas	Remodelación del tejido óseo	Osteocitos Osteoblastos Osteoclastos

La rugosidad también condicionará la adsorción proteica ya que no sólo cambia la topografía sino también, y por causa de ello, propiedades fisicoquímicas superficiales muy importantes, como la tensión superficial. Cuando la rugosidad se obtiene con un granallado, el tratamiento también induce la obtención de una capa superficial de tensiones residuales de compresión en el metal y heterogeneidades químicas [MKW95]. Ambas influenciarán, de nuevo, la tensión superficial y otras propiedades físicas, químicas y mecánicas [MKW95]; [LWL97]. Por lo tanto, la rugosidad modulará la adsorción de proteínas y, en consecuencia, la adhesión celular, no sólo en función de los valores cuantitativos de los parámetros, sino también en función del método aplicado para conseguirla.

Con respecto a los valores cuantitativos de la rugosidad y del tipo de la misma, Boyan y Schwartz [BOS99] detallan que para que la célula responda a la microrugosidad es necesario que ésta perciba los detalles de la rugosidad y, por lo tanto, las dimensiones deben ser del orden de las células [BRU86] (Figura 3.26). De acuerdo a la experiencia de estos autores, los osteoblastos identifican una superficie como rugosa cuando la altura de los picos es mayor de $2 \mu\text{m}$, y la altura de los picos y/o las distancias entre los picos no excede la longitud de la célula, aproximadamente $10 \mu\text{m}$ [OCC97]. Estas células pueden ser también sensibles a los detalles de la topografía en el orden nanométrico, pero los parámetros que intervienen están, en la actualidad, todavía por determinar [CUW99]; [DCR03]; [ZAD04].

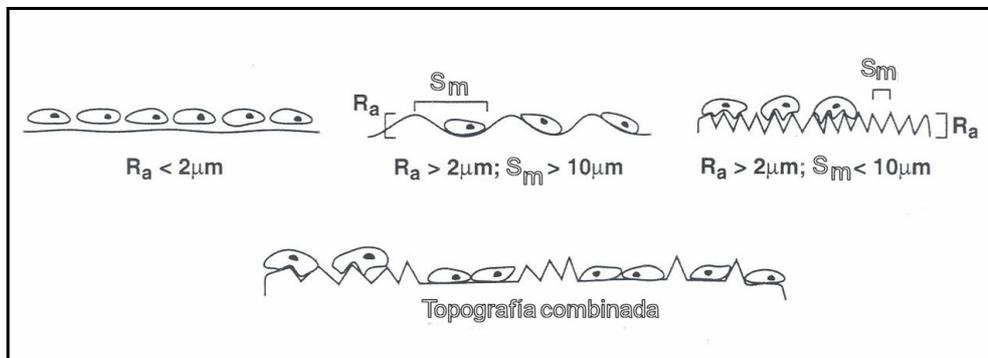


Figura 3.26 Representación del efecto de la rugosidad superficial sobre la morfología de los osteoblastos. Cuando los osteoblastos están cultivados sobre superficies lisas ($R_a < 2 \mu\text{m}$), éstas asumen una morfología fibroblástica plana. Si son cultivados sobre superficies con R_a 's $> 2 \mu\text{m}$, pero las distancias entre picos ($S_m = 1/HSC$) son mayores que la longitud de las células ($\approx 10 \mu\text{m}$), la superficie es percibida como lisa. Si $R_a > 2 \mu\text{m}$ y $1/HSC < 10 \mu\text{m}$, las células son incapaces de aplanarse y extenderse. Se anclan en la superficie por medio de contactos focales entre las extensiones citoplasmáticas y los múltiples picos de la topografía. Esto fuerza a la célula a asumir una morfología más osteoblástica. En superficies con una topografía mixta, el comportamiento del cultivo reflejará un comportamiento medio combinado entre las dos morfologías. Adaptado de [BOS99].

Todos estos factores pueden tener una influencia significativa en la adhesión de los osteoblastos, un primer paso crítico en la respuesta celular porque determina qué células y cuántas poblarán la superficie, para después producir y mineralizar su matriz extracelular [BLD01]. A partir de la adhesión celular se producen los siguientes pasos de proliferación, lo que indica que el número inicial de células disponibles condiciona el resto del proceso de regeneración del tejido óseo. Para una misma capacidad de proliferación, el número total de células que se dispondrán en cada momento para producir hueso será mayor cuanto mayor sea el número inicial de células adheridas, indicando una mayor capacidad de regeneración. Adicionalmente, las células por sí mismas también tendrán un papel predominante ya que, inmediatamente, modifican las superficies a las que se adhieren a

través de la producción de matriz extracelular, factores de crecimiento y otros mediadores [CPV93]; [MUN95]. Esto resulta en una regulación autocrina que es dependiente de la superficie. Asimismo, puede afectar a las células vecinas a través de mecanismos de regulación paracrina y a las células más distantes a través de la cesión de factores reguladores a los fluidos extracelulares [BGC92].

En consecuencia, es deseable un mayor número de células adheridas, siempre y cuando expresen sus factores de diferenciación adecuadamente, lo cual, asimismo, expresa el grado de aceptación celular al sustrato sintético, es decir, su ausencia de citotoxicidad, o dicho de otro modo, su citocompatibilidad.

Los resultados obtenidos en este Capítulo (Tablas 3.II-3.IV; Figuras 3.5 y 3.6) demuestran que la adhesión y, por lo tanto, la citotoxicidad de los osteoblastos humanos sobre Ti c.p. granallado dependen del valor de rugosidad obtenido, del tipo de rugosidad y de la naturaleza de las partículas de proyección empleadas. Además, estas variables interactúan produciendo sinergias que favorecen o dificultan la adhesión celular dependiendo del caso.

En la Figura 3.27 se representan los valores medios de adhesión en función de la rugosidad (R_a) del Ti c.p. granallado, y se han unido con líneas discontinuas los valores para el Ti c.p. granallado con el mismo tipo de partículas pero diferentes tamaños (a); y con el mismo tamaño de partículas de proyección pero diferente naturaleza (b). El mismo tipo de representación se muestra en la Figura 3.28, pero la adhesión osteoblástica se representa en función del inverso de HSC, es decir, $1/HSC$. HSC es el número de picos por unidad de longitud (Ver Apartado 2.3.2.3.2), por lo que $1/HSC$ representa la distancia entre picos. Tanto HSC como P_c son parámetros que cuantifican el espaciado de la rugosidad de una superficie. En el Capítulo anterior se seleccionó P_c junto con R_a para completar la cuantificación de la rugosidad de las superficies granalladas. P_c es un parámetro que describe con más detalle la superficie puesto que, no sólo evalúa las distancias entre picos, sino también la longitud de los valles. No obstante, aquí se ha seleccionado $1/HSC$, en lugar de $1/P_c$, porque nos permite discutir una mejor comparación con los comentarios de Boyan y Schwartz [BOS99] (Figura 3.26) referentes a la microrugosidad percibida por las células.

Al analizar la adhesión en función tanto de R_a como de $1/HSC$, parece claro que al aumentar la rugosidad, aumenta la adhesión. Sin embargo, analizando con más detalle, se demuestra que esta dependencia existe, pero depende también del tipo de naturaleza de las partículas de proyección y/o del tipo de rugosidad obtenido.

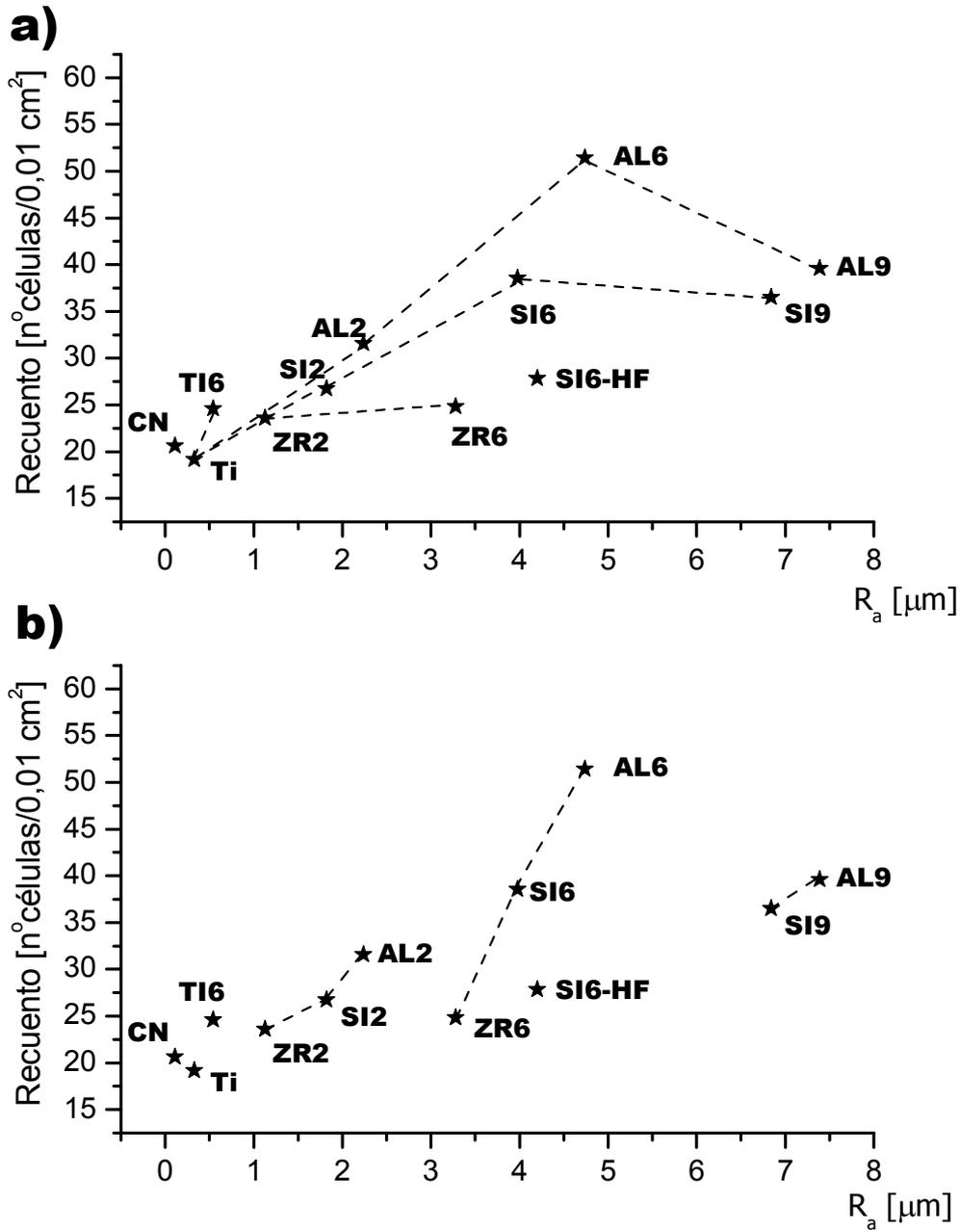


Figura 3.27 Representación gráfica de la influencia de R_a del Ti c.p. granallado sobre la adhesión osteoblástica, en función de: (a) el tamaño de las partículas de proyección, (b) la naturaleza de estas partículas. Las barras representativas de las desviaciones estándar se han omitido con el objetivo de facilitar la visualización de los resultados.

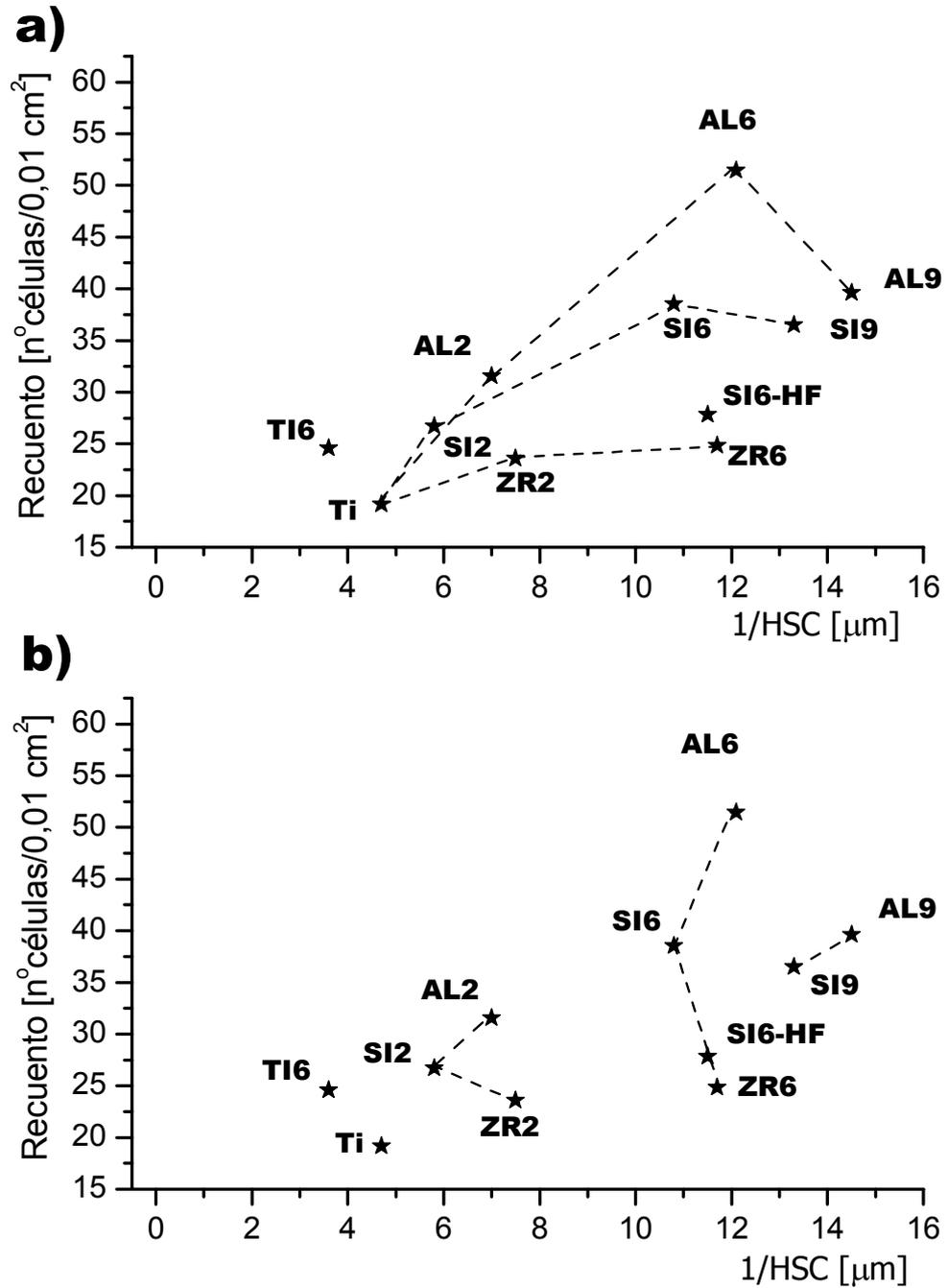


Figura 3.28 Representación gráfica de la influencia de la distancia entre picos ($1/HSC$) del Ti c.p. granallado sobre la adhesión osteoblástica, en función de: (a) el tamaño de las partículas de proyección, (b) la naturaleza de estas partículas. Las barras representativas de las desviaciones estándar se han omitido con el objetivo de facilitar la visualización de los resultados.

La tendencia al aumento de adhesión al aumentar la rugosidad sólo se produce para aquellos discos de Ti c.p. que fueron granallados con partículas de Al_2O_3 o de SiC. Además, el aumento sólo se mantiene hasta valores de rugosidad del orden de $R_a \approx 4\text{-}5 \mu\text{m}$; $P_c \approx 70\text{-}80 / \text{cm}$; $1/\text{HSC} \approx 11\text{-}12 \mu\text{m}$ (Tabla 2.VII), es decir, cuando el granallado se efectuó con partículas de tamaños entre $425\text{-}600 \mu\text{m}$ (AL6, SI6). Para granallados con partículas superiores y, por lo tanto, para rugosidades superiores, ya no hay diferencias estadísticamente significativas y, además, los valores medios de adhesión celular tienden a la baja (Tabla 3.III; Figura 3.27). Este interesante resultado indica que, en este estudio, los osteoblastos humanos se adhieren de forma óptima, o cuanto menos llegan a un estado de saturación, cuando el granallado da como resultado un valor de rugosidad para el Ti c.p. de $R_a \approx 4\text{-}5 \mu\text{m}$. Los picos obtenidos al unir valores de adhesión para discos granallados con la misma naturaleza de partícula y distintos tamaños (Figura 3.27-a) ponen de manifiesto este resultado. Dicho de otro modo, aumentar la rugosidad superficial del Ti c.p. granallado por encima de estos valores, no mejora la adhesión osteoblástica. Los valores de adhesión obtenidos con estos cuatro tipos de tratamiento (AL6, AL9, SI6 y SI9) son los únicos cuya diferencia con respecto al grupo control ha sido estadísticamente significativa (Test de Dunnett, $p < 0,05$) (Figura 3.5).

Estas conclusiones estarían en contradicción con los comentarios de Boyan y Schwartz [BOS99] referentes a las dimensiones que ha de tener la rugosidad del sustrato para que las células sean sensibles a la misma, ya que la distancia entre picos es superior a $10 \mu\text{m}$ (Figura 3.26). Sin embargo, estos autores son confusos respecto a la definición de los parámetros a considerar para evaluar esta influencia. Así, mientras que argumentan que la altura de los picos ha de ser entre $2\text{-}10 \mu\text{m}$, esta cuantificación la refieren al parámetro R_a . Este parámetro, tal y como se ha explicado, no evalúa este concepto si no el de valor medio de las distancias del perfil a la línea media. Por lo tanto, no cuantifica la altura de los picos, valor que estaría mejor representado por R_z o R_y . Por otra parte, tampoco hacen ningún comentario de con qué método de caracterización de la rugosidad se debe evaluar este parámetro, y como también se ha demostrado en el Capítulo anterior, dependiendo de la metodología, el valor de los parámetros puede verse significativamente modificado. Por último, Boyan y Schwartz [BOS99] exponen que el tamaño de un osteoblasto es de $10 \mu\text{m}$, pero las micrografías obtenidas en este estudio confirman que las dimensiones de un osteoblasto humano son superiores, siendo las extensiones citoplasmáticas, o filopodios, las que se acercan más a estos valores dimensionales (Figuras 3.8-3.25). Por todo ello, mientras que es claro que las células osteoblásticas son sensibles a la morfología superficial, tanto cualitativa como cuantitativamente, puesto que, con unos determinados valores y una determinada forma, facilita la adhesión de las mismas, modificando adecuadamente su morfología y, consecuentemente, su actividad fisiológica; los valores concretos de la altura y la distancia de los picos para que la superficie facilite esta adhesión no se pueden definir sin una exhaustiva descripción de la metodología de cuantificación de la rugosidad, así

como de la medición del tamaño de las células. En consecuencia, para que el osteoblasto responda a la microrugosidad es necesario que éste perciba los detalles de la rugosidad y los aproveche para su ubicación y fijación al sustrato, para lo cual, la relación dimensional entre los detalles superficiales (verticales y horizontales) y la dimensión de las células es el factor fundamental.

La naturaleza química de las partículas de proyección también tiene influencia significativa en la adhesión celular. Cuando el Ti c.p. se granalla con Al_2O_3 o SiC, y el mismo tamaño de partículas, la rugosidad que se obtiene presenta muy pequeñas diferencias, tanto cualitativa como cuantitativamente. Sin embargo, en estos casos, la adhesión celular es mayor para el Ti c.p. granallado con Al_2O_3 que el granallado con SiC (AL2 vs SI2, AL6 vs SI6, AL9 vs SI9) (Figuras 3.27-2.38). Estas diferencias son mayores en los rangos de rugosidad medios ($R_a \approx 4-5 \mu\text{m}$) que cuando la rugosidad es menor ($R_a \approx 1,8-2,2 \mu\text{m}$) o mayor ($R_a \approx 7-7,5 \mu\text{m}$), hasta el punto que las diferencias son sólo estadísticamente significativas al comparar AL6 vs SI6 (Tabla 3.III). De hecho, la respuesta de adhesión sobre AL6 es significativamente superior a todo el resto de tratamientos (Figura 3.5). Todo ello indica que se produce un efecto sinérgico entre los valores de rugosidad medios y las partículas de Al_2O_3 adheridas sobre la superficie del Ti c.p., de manera que AL6 ($R_a = 4,74 \mu\text{m}$, $P_c = 67,1 / \text{cm}$; $1/\text{HSC} = 12,1 \mu\text{m}$; Al_2O_3) es el tipo de granallado que confiere a la superficie de Ti c.p. unas características que hacen que los osteoblastos se adhieran más que en todo el resto de superficies tratadas, con los consecuentes beneficios que puede tener para las posteriores etapas de regeneración del tejido óseo, tal y como se ha comentado anteriormente.

Junto con los comentarios previos acerca de la importancia de los factores morfológicos de la superficie sobre la adhesión celular, las causas de este resultado se han de buscar en los cambios en las propiedades fisicoquímicas que se producen por el hecho de disponer de una superficie con una cierta morfología y una cierta naturaleza química. Se precisan estudios exhaustivos de caracterización de estas propiedades para poder identificar cómo éstas influyen en la adhesión de proteínas y, finalmente, como estas proteínas pueden acabar influyendo sobre el comportamiento celular. De entre las propiedades que pueden tener influencia, la energía libre superficial es de las más importantes, a pesar de que es una de las menos estudiadas. Zanchetta y Guezennec [ZAG01] demostraron el carácter hidrofóbico de los osteoblastos, proponiendo que los materiales sintéticos también hidrofóbicos inducen la adsorción selectiva de los osteoblastos, pudiendo mejorar la adhesión de los mismos y, por lo tanto, la osteointegración del material. Nuestros resultados pueden ayudar a confirmar esta conclusión: para materiales hidrofóbicos como el titanio está demostrado [ADA90] que al aumentar la rugosidad aumentan su carácter hidrofóbico y, por otra parte, en un estudio complementario, no incluido en esta Tesis Doctoral, se demostró que el Ti c.p. granallado con partículas de Al_2O_3 era más

hidrofóbico que si era granallado con SiC, cualquiera que fuese el tamaño de las partículas. Este resultado, sin embargo, puede deberse tanto al ligero aumento de la rugosidad, demostrado en el Capítulo previo, como a la adhesión de las partículas de Al_2O_3 , en lugar de las de SiC, como a las diferencias en las tensiones residuales de compresión inducidas en el tratamiento y que también varían en función de la partícula de proyección utilizada (Ver Capítulo 4). En el Capítulo 6 de esta Tesis Doctoral se extiende este análisis.

Por lo tanto, es difícil identificar la causa primera. Lo importante, en este caso, es tener en cuenta que todos estos factores pueden influir sobre el resultado de adhesión osteoblástica y que, las partículas, sobre todo en el caso del Al_2O_3 , pero también en el del SiC, no son perjudiciales, sino que parecen ser beneficiosas. Esto último es difícil de confirmar, aún cuando los resultados para AL6 sean tan buenos, puesto que no sabemos qué resultados se obtendrían si se dispusiese de superficies de Ti c.p. con el mismo tipo de morfología, pero sin las partículas adheridas.

Para los discos granallados con partículas de ZrO_2 los resultados de adhesión son significativamente inferiores. Es difícil determinar qué causa este comportamiento, si la naturaleza de las partículas, que ya se ha demostrado que tiene influencia, o el hecho de que la rugosidad, tal y como se analizó en el Capítulo anterior, es topográficamente diferente, con una rugosidad más abierta y más suave, en la que las diferencias entre los picos y los valles son inferiores, pero el ancho de los valles (distancia entre picos) es tan grande como para los discos granallados con Al_2O_3 o SiC (Tabla 2.VII, Figura 3.28). De hecho, mientras que en el granallado con partículas de Al_2O_3 y SiC, aunque con cierta influencia por la diferente naturaleza química, éstas no anulan el efecto de la rugosidad en la adhesión, en el caso del ZrO_2 sí que se anula, ya que los resultados tanto para ZR2 como para ZR6 son similares a los resultados para Ti. A pesar de que se produce un cierto aumento en la adhesión osteoblástica, las diferencias no son estadísticamente significativas (Tabla 3.III) y, por lo tanto, se podría concluir que el granallado con ZrO_2 no ha afectado a la adhesión osteoblástica.

Este resultado confirmaría la necesidad, para tener una buena adhesión, de una buena relación entre los parámetros R_a y $1/HSC$; por lo que, en este sentido, los parámetros híbridos pueden ser los mejores para correlacionar con esta respuesta celular, confirmando las conclusiones de Anselme [ABN00], aunque en su caso se refería a la fuerza de adhesión y no al número de células adheridas.

De la misma manera, los resultados obtenidos para Ti6 confirman que la rugosidad que se obtuvo al granallar el Ti c.p. con partículas de TiO_2 sinterizadas en el laboratorio no es suficiente como para alterar el comportamiento de los osteoblastos, en lo que se refiere a su adhesión al sustrato, con respecto al grupo control o al titanio sin granallar.

Este resultado confirmaría los comentarios previos acerca de la sensibilidad celular a los detalles de la microrugosidad. A pesar de que la morfología del sustrato es rugosa, la altura de los picos no es suficiente como para que el osteoblasto la sienta, por lo que su comportamiento es similar al de aquellas superficies no granalladas. Atendiendo al hecho de que la morfología superficial de los discos mecanizados (grupo Ti) está texturada, se podría esperar que tuviesen una respuesta diferenciada, con una posible alineación de los mismos con respecto al surco [MWR93] y un fortalecimiento de la adhesión de los osteoblastos [ANS00]. Sin embargo, la observación de las micrografías demuestra que el valor del tamaño de los surcos es demasiado pequeño como para que las células sean sensibles a los mismos. Todo ello hace que los osteoblastos sobre sustratos poco rugosos adquieran una morfología aplanada (Figura 3.8-3.12), más propia de los fibroblastos; mientras que sobre los sustratos granallados y con rugosidades superiores, gracias al anclaje adicional que aportan a la célula, la morfología de ésta es cuboidal, más tridimensional, más propia de células óseas activas (Figuras 3.12-3.25) [AUB99]; [HCZ99]; [BLD01]. Otros han encontrado influencias similares en otros tipos celulares [BRU01] y, por otra parte, otros siguen considerando el anclaje y extensión bidimensional de los osteoblastos una confirmación de su adecuada adhesión al sustrato [ANS00].

A este respecto, tal y como detallan Boyan y col [BDL01] “la literatura contiene numerosos estudios que examinan la unión y el modo en que se extienden las células, basándose en la conclusión de que, a priori, es deseable que las células tengan sobre el titanio una morfología similar a la que muestran sobre los plásticos en los que convencionalmente se llevan a cabo los cultivos celulares. [...] Por otra parte, por el hecho de que los biólogos celulares hagan sus cultivos celulares sobre plásticos no da razón para pensar que esas células vayan a tener un comportamiento más o menos bueno sobre el titanio. De hecho, una célula ampliamente extendida es improbable que exprese fenotipos osteoblásticos ya que estas células se caracterizan por tener una morfología columnar en su fase de secreción *in vivo*. Por esta razón, muchos investigadores han empezado a estudiar cómo las células osteoblásticas responden a diversas superficies experimentales utilizando la medida de marcadores de la diferenciación como indicadores de la respuesta celular, antes que la observación de su morfología y adhesión sobre el sustrato”. Así pues, la observación de la morfología celular es un complemento adecuado para el análisis general de su comportamiento, pero no debe ser interpretada como definitoria de la calidad de este comportamiento.

Este análisis de la morfología celular se completa en el Apartado 3.4.3.

Finalmente, es de especial relevancia el resultado de la adhesión osteoblástica sobre los discos SI6/HF, los cuales han sido granallados de igual manera que SI6, pero se han

pasivado con HF/HNO₃ en lugar de con HCl. Esta diferencia en el método de pasivación ha resultado en un descenso estadísticamente significativo de la adhesión celular en los discos SI6/HF con respecto a los SI6 (Tabla 3.III), hasta tal punto que no tienen diferencias estadísticamente significativas ni con respecto a discos con rugosidades inferiores ni con el grupo control. De acuerdo a los resultados del Capítulo anterior, por una parte, las superficies de SI6/HF tenían menos cantidad de partículas de SiC adheridas en su superficie que SI6 y, por otra parte, su rugosidad era una rugosidad similar cuantitativamente, pero con diferencias cualitativas apreciables. Las superficies SI6/HF añadían a la rugosidad en el orden micrométrico, detalles de rugosidad en el orden nanométrico, además de que provocaban un cierto redondeo de los picos y los valles. De nuevo, la causa en el descenso de células adheridas puede provenir de los cambios en la naturaleza química de la superficie o de su morfología. En este caso, teniendo en cuenta que la diferencia en la cantidad de partículas adheridas no era muy grande y que, en cualquier caso, habían partículas de SiC adheridas sobre los discos SI6/HF, parece razonable pensar que la causa más probable de este descenso en la adhesión sean las diferencias en la topografía, reforzado con los resultados con ZrO₂ donde las morfologías más redondeadas también parecen haber influido en una inferior adhesión osteoblástica. Sin embargo, este resultado es contradictorio con otros estudios [MSH95] en los que también se evaluó la respuesta osteoblástica de adhesión sobre discos de Ti c.p. granallados y atacados químicamente con una solución de HCl/H₂SO₄ así como con HF obteniendo superficies morfológicamente análogas a las de SI6/HF, pero en los que la adhesión de los osteoblastos MG63 fue significativamente superior que en el plástico control. Por su parte Diniz y col. [DSC02] no encontraron diferencias estadísticamente significativas en la adhesión de osteoblastos de médula ósea de rata entre el plástico control y Ti c.p. pasivado con H₂SO₄ o HF. Finalmente, otros autores [DCR03]; [ZAD04], han demostrado que la adhesión de los osteoblastos es dependiente de la topografía en el orden nanométrico, aunque en superficies texturizadas.

Todos los resultados demuestran que la respuesta a la adhesión de los osteoblastos humanos sobre Ti c.p. granallado depende de manera combinada entre la rugosidad (su valor cuantitativo y su tipo), y las partículas de proyección empleadas en el granallado; pero es difícil identificar el porqué de las interacciones. Por un lado, es posible que todas estas variables puedan influir en propiedades tan importantes como la energía libre superficial o en la carga neta y, por lo tanto, en la capa de proteínas adsorbidas, afectando en última instancia a la afinidad fisicoquímica de los osteoblastos, a través de sus puntos focales. Sin embargo, el propio efecto que la morfología superficial puede tener sobre la adaptación morfológica de la célula es un factor muy a tener en cuenta, tal y como demuestra, no sólo este trabajo, sino también otros con superficies granalladas o con superficies texturizadas.

En cualquier caso, cualquiera que sea el tratamiento llevado a cabo sobre el Ti c.p., no ha provocado un efecto negativo desde el punto de vista celular, tal y como demuestran los valores de citotoxicidad, los cuales son negativos, excepto para el grupo Ti (sin granallar) (Tablas 3.II; Figura 3.6). Todos los tratamientos de granallado han obtenido adhesiones osteoblásticas superiores al grupo control y, por lo tanto, son citocompatibles. También el Ti c.p. sin granallar lo es, puesto que su valor de citotoxicidad no supera el 25 %.

3.5.2. Diferenciación

Tras la adhesión de los osteoblastos sobre el sustrato, estos comienzan una fase de proliferación y diferenciación, que lleva a la formación de la matriz extracelular y finalmente a la mineralización de la misma [LGS92]. La adhesión de las células al sustrato se efectúa por medio de la unión de las integrinas [ANS00]; [LEA00] con aquellas proteínas que se adsorben en la superficie del material. La expresión de las integrinas es específica de un tipo de células y puede cambiar a medida que la célula se diferencia o como función del tipo de superficie a la que la célula se expone [BDL01]. La naturaleza de las integrinas que expresan los osteoblastos determina el tipo y número de los contactos focales que la célula puede realizar con el sustrato [SIT96]; [GRM96]. En este sentido, se ha demostrado que cuando los osteoblastos se cultivan sobre titanio rugoso, los contactos focales se localizan en la periferia de la célula, lo cual afecta a la morfología que el osteoblasto adopta y, como consecuencia, se mejora la organización del citoesqueleto, si se compara con las células cultivadas sobre superficies lisas de poliestireno [SMS94]. Esta mejora se basa en que el citoesqueleto se extiende desde la periferia hacia la matriz nuclear, lo cual indica que la morfología del osteoblasto puede afectar a la expresión génica que regula la expresión fenotípica de los osteoblastos [LWH97]; [ATM98]; [BLD01]. Otros autores también han demostrado que la diferenciación se regula, en parte, por medio de la estructura celular [DLR91]; [BFS96]; [TFS98]. Asimismo, tal y como se ha indicado en la introducción de este Capítulo, la expresión de las integrinas está implicada en los caminos de señalización que regulan diferentes respuestas celulares. Todo esto sugiere que la rugosidad superficial puede modular tanto la proliferación como la diferenciación de los osteoblastos.

Se han identificado una serie de marcadores que caracterizan la actividad de diferenciación de los osteoblastos en cultivo: actividad de la fosfatasa alcalina, producción de osteocalcina, síntesis de colágeno, y otros. Estas células responden a la $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$, un metabolito de la vitamina D_3 que causa incremento en la actividad de fosfatasa alcalina y la producción de osteocalcina. Asimismo, los osteoblastos poseen receptores para la hormona paratiroidea, la cual también regula la diferenciación de las células [LIS92].

La osteocalcina [LIF78]; [PRI88]; [HLC89], el marcador de la diferenciación seleccionado en este estudio, es una proteína de bajo peso molecular (5,7 kDa) cuya producción

depende de la vitamina K. La osteocalcina es producida por los osteoblastos como marcador tardío de la diferenciación, ya que se expresa únicamente tras la proliferación, en el momento en que se inicia la formación de nódulos. Es una proteína que se enlaza fuertemente a la hidroxiapatita y que adquiere sus máximas dosis de expresión al mineralizarse la matriz extracelular *in vivo* [HLC89] e *in vitro* [OAS90]. En cultivos de rata *in vitro* ha demostrado una alta correlación (0,92) con la calcificación de la matriz extracelular [OAS90], una producción similar a su patrón de expresión [WSR90], y una acumulación también similar a la que hay *in vivo* en la matriz extracelular [LCC85]. Se ha demostrado que contribuye a la regulación de la fase mineral del hueso, tanto *in vitro* [RWR86] como *in vivo* [GLL87]. Por lo tanto, su tardía expresión en la secuencia del desarrollo osteoblástico sugiere que la osteocalcina es un marcador del osteoblasto maduro, y es consistente con un posible papel de esta proteína en la síntesis y enlace al mineral, participando en el proceso de regeneración del hueso, tanto en su formación como en su reabsorción [LIA87]. La osteocalcina es producida por otro tipo de células, especialmente los odontoblastos, pero en la mayoría de los sistemas de cultivo empleados para examinar el linaje osteoblástico, es razonable asumir que cualquier producción de osteocalcina es debida a las células formadoras de hueso [BLD01]. Por todas estas razones, la osteocalcina es un marcador muy efectivo de los osteoblastos bien diferenciados.

Los resultados de producción de osteocalcina después de 72 h de cultivo con adición de vitamina D₃ no dieron ningún tipo de diferencia estadísticamente significativa, ni entre los distintos grupos de Ti c.p. granallado con respecto al plástico de cultivo, ni entre los distintos tratamientos entre ellos (Tabla 3.IV; Figura 3.7).

No hay una mejora significativa de la diferenciación al aumentar la rugosidad del Ti c.p., a pesar de que los cultivos fueron suplementados con vitamina 1 α ,25-(OH)₂D₃, lo cual estimula la producción de osteocalcina en general, y de forma sinérgica en sustratos rugosos [BBK98]. Este resultado es contradictorio con la mayoría de los estudios publicados, tal y como se ha detallado en la introducción de este Capítulo. Esta falta de tendencia y de significación estadística en los resultados obtenidos puede ser debida a diversos factores.

En primer lugar, el número total de discos evaluados para cada tipo de tratamiento, 3 o 4, puede haber resultado insuficiente como para tener confianza estadística en los valores medios de producción de osteocalcina. No obstante, es el mismo número de datos obtenidos para los valores de adhesión celular para los cuales sí se han obtenido, en algunos casos, diferencias significativas. En todo caso, un aumento en el número de discos evaluados por tratamiento hubiese incrementado significativamente la cantidad total de mediciones a realizar, puesto que había un alto número de diferentes tratamientos.

Una segunda causa puede ser el tipo de células estudiadas. En el caso de los estudios osteoblásticos, como de otros tipos de células, los estudios *in vitro* se pueden llevar a cabo con osteoblastos procedentes de tejidos óseos o con osteoblastos de líneas inmortales. Ambos tipos tienen ventajas e inconvenientes. Así, la proliferación de las líneas celulares (Tabla 3.VI) ha provocado que la interpretación de los resultados haya sido, en algunos casos, controvertida. Las líneas celulares representan un estado de maduración específico en el linaje celular, el estado en que se hallaba la célula *in vivo* en el momento en el que se produjo la alteración oncogénica o *in vitro* cuando se transformó químicamente o por la introducción de un plásmido. Por lo tanto, se suele poner en duda que su comportamiento, por el hecho de estar genéticamente modificadas, sea el de un osteoblasto normal, sobre todo si se tiene en cuenta que muchas veces estas células se ven alteradas por procesos que no son del todo bien conocidos. Por esta razón es por lo que los científicos han trabajado con células procedentes de tejido óseo. No obstante, la respuesta de estas células también está condicionada por variables como la zona de donde se ha extraído el tejido, el sexo, la edad, y el estado fisiológico del donante, y si el donante es una rata, un ave o un humano. Otra variable es el método empleado para sembrar las células, si son células procedentes de explantes y, si es así, si se han pretratado con colagenasa para extraer de la superficie aquellas células mesenquimales menos diferenciadas. Si las células se han sembrado por digestión enzimática, el número de digestiones es importante para entender cuál es el tipo de población celular que están empleando los investigadores. Todo ello hace que el principal inconveniente del uso de los osteoblastos procedentes de tejidos humanos, como es nuestro caso, sea precisamente la heterogeneidad celular del cultivo, que lleva a una mayor variabilidad en la respuesta, lo que en última instancia provoca una menor confianza estadística.

Tabla 3.VI Modelos celulares comúnmente utilizadas para estudiar la respuesta de las células en el linaje celular para la formación de hueso. Adaptado de [BLD01].

Modelo celular	Fuente	Fenotipo
MG63	Osteosarcoma humano	Osteoblasto inmaduro
FRC	Feto de rata calvaria	Osteoblastos y células osteoprogenitoras multipotenciales
MC-3T3-E1	Línea celular no transformada de ratón	Tipo osteoblástico
OCT-1	Ratón transgénico	Células maduras de tipo osteoblástico
MLO-Y4	Ratón transgénico	Tipo osteocítico
NHOst	Preparaciones comerciales de hueso humano	Tipo osteoblástico
ROS 17/2.8	Osteosarcoma de rata	Tipo osteoblástico
2T9	Ratón transgénico Promotor de la proteína morfogenética-2	Células osteoprogenitoras

Relacionado con esta misma variable, las células empleadas han sido células óseas humanas del quinto pase, lo cual hace que estas células tengan un estado de maduración avanzado. Las células responden de forma diferenciada en función de su estado de maduración sobre el Ti c.p. granallado, siendo aquellas que se encuentran en un estado de maduración más avanzado las que muestran una menor influencia a la adición de vitamina D₃ [SDB92]; [LBS00].

Por último, tras las 24 h en que se permitió la adhesión de los osteoblastos, la proliferación de las células se interrumpió. Los osteoblastos aumentan su diferenciación tanto más cuanto menor es su proliferación [LIS92], por lo que un aumento de días de cultivo previo al paro de la actividad reproductora hubiese amplificado las posibles diferencias en la producción de osteocalcina. Es probable que ésta sea la principal causa de que las diferencias no hayan sido significativas, aunque todas ellas se han de tener en cuenta para posteriores estudios.

Sin embargo, a pesar de la ausencia de significación estadística, también se pueden apreciar ciertas tendencias en el comportamiento de diferenciación osteoblástica entre los distintos tratamientos en función de la naturaleza de las partículas de proyección (Figura 3.28-a), y del tamaño de las mismas (Figura 3.28-b), aunque estas tendencias no son tan claras como para el caso de la adhesión.

Para una misma naturaleza de partícula de proyección, cualquiera que ésta sea, la producción de osteocalcina se ve favorecida cuando los osteoblastos están sobre superficies granalladas con partículas de los tamaños intermedios, entre 425-600 μm (Figura 3.28-b). Este resultado es análogo al obtenido para la respuesta de adhesión celular, por lo que este tipo de granallados son óptimos para la mejora de la adhesión y la diferenciación osteoblástica, indicando una influencia significativa del grado de rugosidad sobre la respuesta general de los osteoblastos sobre el Ti c.p. granallado, de tal manera que la mejor respuesta es obtenida para rugosidades comprendidas entre $R_a \approx 4\text{-}5 \mu\text{m}$, $P_c \approx 70\text{-}80 / \text{cm}$, $1/\text{HSC} \approx 11\text{-}12 \mu\text{m}$.

La analogía entre estos resultados de adhesión y diferenciación celular, unida a los anteriores comentarios acerca de la no proliferación osteoblástica previa a la determinación de la producción de osteocalcina, podría hacer pensar que los resultados de diferenciación están directamente relacionados con los de adhesión, de manera que el estado de adhesión celular sea el único causante de la respuesta de producción de la proteína marcadora. Sin embargo, a diferencia de los resultados para la adhesión celular, la producción de osteocalcina de los osteoblastos, si el tamaño de partículas es el mismo, es mayor sobre los discos granallados con SiC que sobre los granallados con Al₂O₃ y ZrO₂ (Figura 3.28-a). En este caso, al aumentar la rugosidad, dentro de un mismo tipo de tamaños de partículas de

proyección, no aumenta la diferenciación, tal y como pasaba con la adhesión, lo cual confirma que la naturaleza de las partículas de proyección tiene influencia sobre la respuesta de los osteoblastos, pero es diferente para cada tipo de respuesta. Esto hace que el único tratamiento que mejora de manera notable la diferenciación de los osteoblastos sobre el Ti c.p. granallado es el SI6 (Figura 3.28). De nuevo, la influencia sobre la diferenciación no es negativa, por lo que de manera general se puede concluir que la presencia de las partículas de proyección no es perjudicial para la adecuada adhesión y diferenciación de los osteoblastos humanos sobre el Ti c.p. granallado.

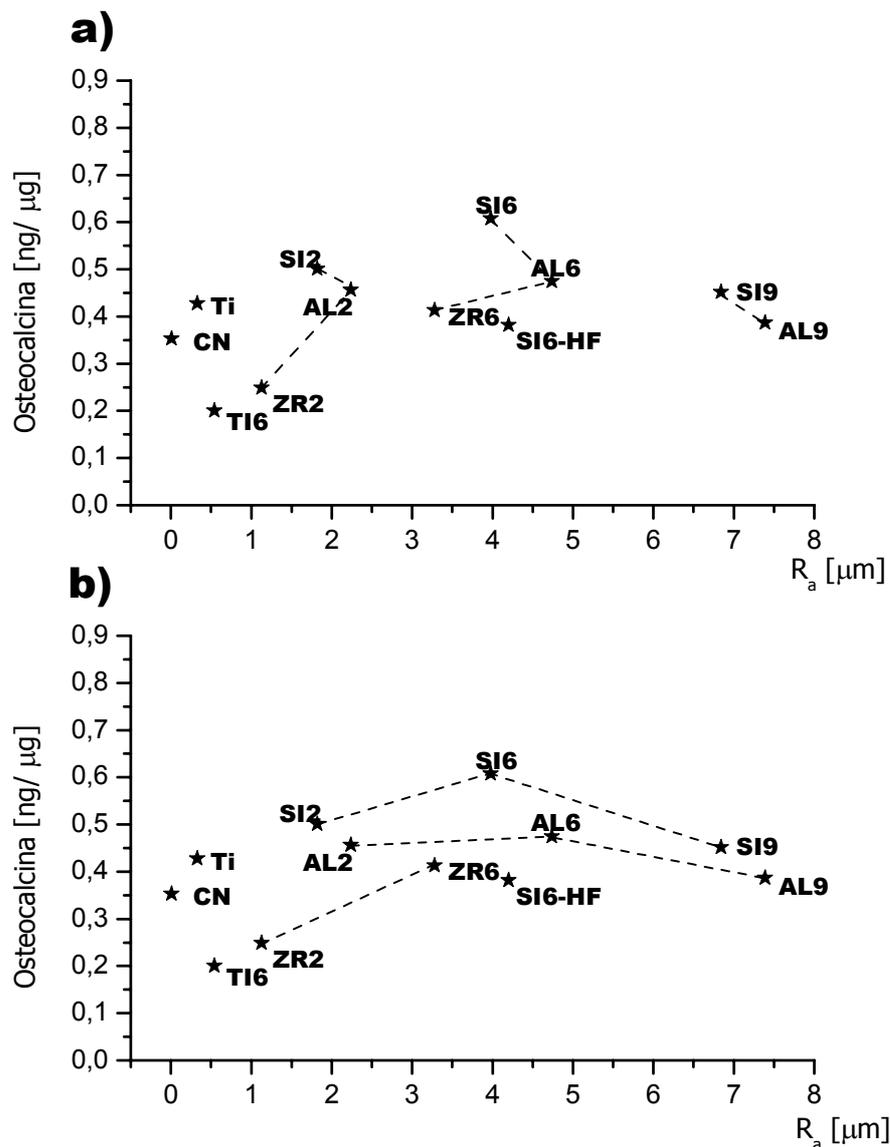


Figura 3.28 Representación gráfica de la influencia de la rugosidad (R_a) del Ti c.p. granallado sobre la diferenciación osteoblástica, en función de: (a) la naturaleza de estas partículas, (b) el tamaño de las partículas de proyección. Las barras representativas de las desviaciones estándar se han omitido con el objetivo de facilitar la visualización de los resultados.

Otro resultado similar al obtenido con la adhesión es el decremento de producción de osteocalcina en los discos SI6/HF con respecto a SI6, demostrando que el pasivado con HF/HNO₃ y, por lo tanto, la diferente morfología superficial de estos discos, no favorece la respuesta osteoblástica, a pesar de que, o quizás por causa de que, en su superficie hay menor número de partículas de SiC adheridas.

Las bajas rugosidades de los discos ZR2 y TI6, así como el tipo de rugosidad obtenido, son la causa principal del descenso en la producción de osteocalcina de los osteoblastos, lo cual es uno de los resultados más claros de esta parte del estudio. Sin embargo, tal y como ya se ha comentado, ni siquiera en este caso las diferencias han sido estadísticamente significativas, incluso al ser comparadas con SI6.

3.5.3. Morfología celular

La observación de los osteoblastos sobre los sustratos demuestra que las células sobre las superficies de Ti c.p. mecanizadas (Figuras 3.8-3.10) y sobre las granalladas con TiO₂ (Figuras 3.11-3.12), es decir, las menos rugosas, presentan una morfología aplanada, con extensiones lamelares, con pocos filopodios y sin actividad dorsal. Esta morfología es marcadamente diferente a la morfologías más compacta, de gran número de filopodios y con actividad dorsal de las superficies más rugosas (ZR2, ZR6, AL2, AL6, AL9, SI2, SI6, SI6-HF, SI9) (Figuras 3.13-3.25).

Se suele argumentar que si las células se aplanan y ocupan una gran área sobre la superficie en que se encuentran, esto es un indicador de que se están adaptando adecuadamente en el cultivo. De hecho, que sobre los sustratos mecanizados y TI6 las células muestren estas morfologías, así como que estén en íntimo contacto con el material (Figuras 3.9 y 3.12), sería un nuevo indicador de la citocompatibilidad de estos tipos de superficies.

Sin embargo, estas afirmaciones están basadas en cultivos celulares convencionales sobre plástico de cultivo o vidrios tratados para favorecer la adhesión y la distribución de las células. Cuando los osteoblastos se cultivan sobre sustratos rugosos, otros autores [LBB98]; [BLL99] han observado, tal y como nosotros hemos obtenido, morfologías menos extendidas, con cuerpos celulares más compactos (Figura 3.20) y tridimensionales (Figura 3.22), con una clara función de interacción entre las células y el sustrato rugoso a través de la suspensión de las mismas, de pico a pico de la rugosidad (Figuras 3.16 y 3.21), por medio de múltiples filopodios (Figuras 3.15, 3.17 y 3.24). Esto provoca una redistribución de los elementos del citoesqueleto del osteoblasto [SMS94]; [ABN00] que puede tener importantes consecuencias para la célula, ya que puede generar información que se transmitirá a través de la superficie hasta el núcleo [BLD01]. Esta información es la

que puede provocar que la rugosidad influya preferentemente sobre la diferenciación de los osteoblastos.

La alta actividad dorsal sobre las muestras más rugosas (Figuras 3.14, 3.15, 3.18 y 3.23) también es un indicador de un estado de desarrollo fenotípico activo y, como consecuencia, es un indicador de una mejor respuesta de diferenciación del osteoblasto. Cabe destacar las abundantes muestras de esta actividad en los osteoblastos sobre las superficies SI6 (Figuras 3.19-3.22).

El desarrollo fenotípico más avanzado también lo pone de manifiesto, de forma indirecta, la presencia de restos de matriz extracelular (Figuras 3.17 y 3.25). En los sustratos menos rugosos no se aprecian restos de esta naturaleza.

3.5.4. Selección del tratamiento óptimo

Con los resultados obtenidos, el análisis llevado a cabo, y el objetivo final de conseguir un tratamiento de granallado sobre el Ti c.p. que optimice su osteointegración, la selección de este tratamiento óptimo aconseja una conclusión cauta y matizada.

En la Figura 3.29 se representan conjuntamente los valores medios de adhesión y diferenciación de los osteoblastos sobre las distintas superficies de Ti c.p. granallado. En esta figura se han delimitado distintas zonas de respuesta osteoblástica. Estas zonas se han establecido en función de los comentarios previos cualitativos llevados a cabo en la discusión de este Capítulo acerca de las diferencias que se han considerado más significativas, con independencia de que la significación se haya confirmado estadísticamente o no. Las mejores superficies serían aquellas que maximizasen la adhesión y la diferenciación, y en las que las células desarrollasen morfologías propias de osteoblastos activos. Este resultado estaría representado en la zona superior derecha de la gráfica. Mientras que en la zona inferior izquierda quedarían representados los peores resultados.

De acuerdo con esta gráfica, los mejores tratamientos son aquellos que se han llevado a cabo con partículas de tamaños entre 425-600 μm y granallados con SiC o Al_2O_3 . El factor en común para estos tratamientos es el tamaño y la forma de las partículas y, por lo tanto, el valor y el tipo de la rugosidad obtenido: $R_a \approx 4\text{-}5 \mu\text{m}$, $P_c \approx 65\text{-}80 /\text{cm}$, $1/\text{HSC} \approx 11\text{-}12 \mu\text{m}$. Si el granallado es con SiC, se mejora especialmente la diferenciación, y si es con Al_2O_3 , la mejora es significativa en la adhesión de los osteoblastos. En consecuencia, AL6 y SI6 son los tratamientos óptimos en este estudio con el objetivo de mejorar la respuesta biológica. No obstante, se ha de considerar que algunas de las diferencias por las que se llega a esta conclusión, especialmente en el caso de la diferenciación de los osteoblastos, no

han sido estadísticamente significativas, lo cual resta confianza a esta conclusión. Rønold y Ellingsen [ROE02], en un estudio *in vivo*, determinaron que la rugosidad óptima para la fijación de implantes en hueso era cercana a $R_a = 4 \mu\text{m}$. Sin embargo, llegaron a esta conclusión con diferencias que no eran estadísticamente significativas y, además, con un margen estrecho.

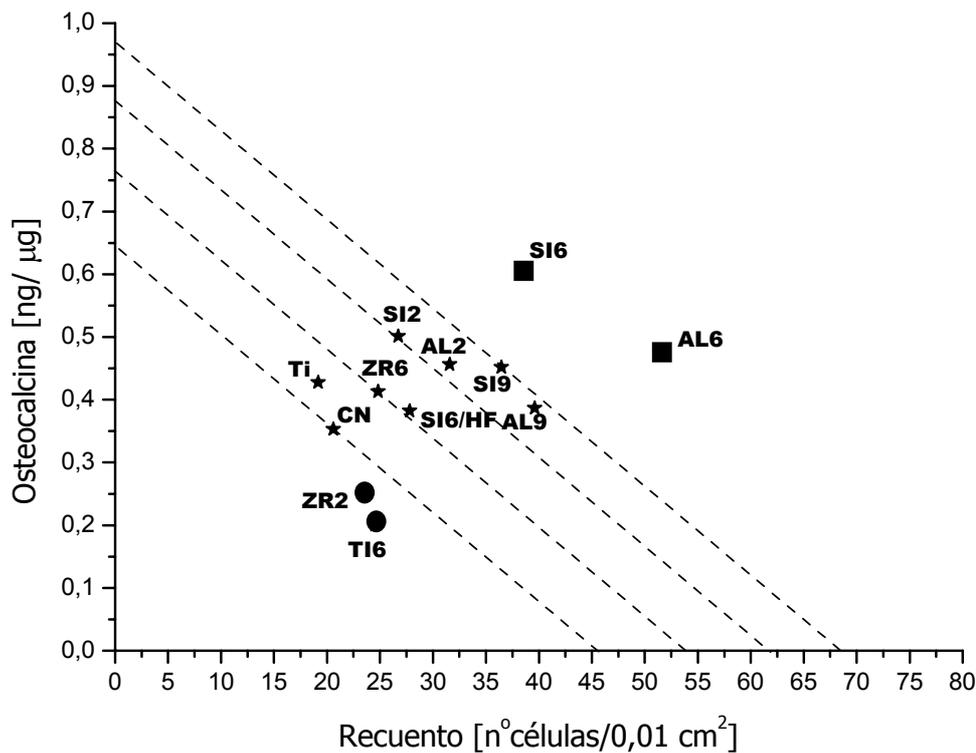


Figura 3.29 Representación gráfica de la respuesta de adhesión y diferenciación de los osteoblastos sobre todos los tipos de superficies estudiadas en este Capítulo. Las líneas discontinuas delimitan zonas de distinto comportamiento celular (ver texto). Las barras representativas de las desviaciones estándar, tanto para la adhesión como para la diferenciación, se han omitido con el objetivo de facilitar la visualización de los resultados.

Es destacable la zona para los siguientes mejores resultados, puesto que incluye todo el resto de tratamientos con distintos tamaños de partículas para estos dos mismos tipos de naturaleza, es decir, AL2, AL9, SI2, SI9. Ello indica que el tratamiento de granallado con estas naturalezas es mejor que con ZrO_2 o con las débiles partículas de TiO_2 . Es por esto que en los posteriores trabajos de investigación de esta Tesis Doctoral no se ha estudiado el Ti c.p. granallado ni con TiO_2 ni con ZrO_2 . Tampoco se continuará estudiando el granallado con carburo de silicio y pasivado con HF/ HNO_3 , puesto que los cambios topográficos y de limpieza de la superficie que conlleva influyen negativamente en la respuesta de los osteoblastos respecto al mismo granallado, pero pasivado con HCl.

3.5.5. Relación *in vitro-in vivo*

Existe una gran controversia sobre la utilidad de los resultados de este tipo de estudios *in vitro* como elementos de predicción sobre el comportamiento *in vivo* de estos mismos materiales. Hay autores que, después de conseguir identificar *in vitro* una mejor respuesta osteoblástica sobre superficies de Ti c.p., topográficamente similares pero ligeramente diferentes a otras [MSH95], han corroborado estos resultados *in vivo*, tanto en animales [CNH96] como en humanos [BMB97], al obtener una mejor osteointegración de los implantes con esas mismas superficies. Estos resultados, según estos mismos autores [BDL01], ponen de manifiesto la importancia de la adhesión, proliferación y diferenciación de los osteoblastos sobre los sustratos sintéticos para el adecuado comportamiento biológico de los mismos. Sin embargo, es difícil encontrar justificación a una correlación directa entre la respuesta en el laboratorio de células óseas, previamente aisladas, con la respuesta que las células y los tejidos vivos tendrán una vez quede implantado el material en el lecho óseo.

La situación *in vivo* es claramente más compleja, entre otras cosas, por la presencia de los vasos sanguíneos y la resultante presión de oxígeno en los tejidos que alojan al implante [BLD01]. También influirá la infección en la zona, así como el tamaño del defecto óseo, o dicho de otro modo, la distancia que exista entre el implante y el área endóstea del tejido afectado por la cirugía. En este sentido, Bloebaum y col. [BBM94], comprobaron que las distancias superiores a 50 μm impedían la posibilidad de crecimiento óseo hasta el interior de los valles de la rugosidad superficial del Ti c.p. Este espacio del defecto óseo se rellena, en primera instancia, con un coágulo o un hematoma [SSH90], por lo que, como algunos autores han señalado [PGV01], puede ser tan importante evaluar la interacción de las plaquetas sobre la superficie del metal como la de los propios osteoblastos.

Durante la formación de hueso, las células osteoprogenitoras pueden migrar hacia el material desde la superficie endóstea del hueso alrededor del implante, formando hueso mientras realizan esta migración. Asimismo, el hueso se puede formar desde el implante gracias a la diferenciación de las células osteoprogenitoras que alcanzan la zona a través de la vasculatura o la médula. Lo importante es el hecho de que, con independencia del mecanismo, el comportamiento de estas células depende de la adhesión de las mismas al sustrato y de su capacidad para moverse sobre él [BLD01]. También se debe añadir que el crecimiento del hueso, tanto si es desde la superficie como desde los extremos de la osteotomía, se regula por medio de señales paracrinas emitidas por los osteoblastos que se ubican sobre la superficie del implante o que se hayan en el zona por rellenar. Estas señales, como han demostrado los magníficos trabajos del grupo de Boyan y Schwartz [BLD01], también dependen de la adhesión, proliferación y diferenciación de las células óseas. En

consecuencia, los estudios *in vitro*, como el de este Capítulo, sí se pueden revelar valiosos para predecir respuestas *in vivo* de regeneración ósea; sobre todo, tal y como se ha comentado previamente, el número total de células disponibles para llevar a cabo esta regeneración y su habilidad para regular adecuadamente su linaje para una rápida y final mineralización del tejido.

Por otra parte, tal y como se comentó en la introducción de esta Tesis Doctoral, cualquiera que sea la naturaleza química o la topografía del implante metálico biocompatible, siempre se forma *in vivo* una capa de tejido blando, más o menos gruesa, entre el implante y el hueso neoformado [TLE97]. No está claro si la formación del tejido blando se produce porque la adhesión de los fibroblastos está más favorecida que la de los osteoblastos o si la calidad de la superficie (naturaleza y topografía) modula la diferenciación de las células mesenquimales hacia una línea fibroblástica en lugar de una osteoblástica. En consecuencia, parece razonable llevar a cabo estudios *in vitro* de cultivos mixtos de los dos tipos de células, en lugar de emplear sólo osteoblastos. Otra posible explicación a este hecho, aunque poco probable teniendo en cuenta los resultados de múltiples estudios con células óseas, es que la mineralización del tejido esté dificultada o impedida sobre la superficie del metal. En cualquier caso, el hueso siempre se forma sobre esta capa de tejido blando, por lo que algunos autores sostienen que *in vivo* los osteoblastos reconocen únicamente la topografía de la superficie y no la naturaleza química de la misma [Lemons en la discusión de HCZ99].

De todos estos comentarios se desprende la complejidad de todos los mecanismos involucrados en la interacción de los tejidos y el implante, así como de la regeneración del hueso. El complejo sistema biológico no se estudia en todos sus mecanismos y matices con los estudios *in vitro* de osteoblastos sobre sustratos sintéticos. Por ello, Caplan concluía en la discusión pública de [HCZ99]: “Creo que los estudios *in vitro* con osteoblastos, incluidos los míos (y los de este Capítulo, tal y como se ha discutido a lo largo del mismo) sufren por la dificultad que supone intentar correlacionar la carga superficial, la composición química y la adhesión y crecimiento celulares con la formación del hueso *in vivo*”. Sin embargo, estos estudios son útiles siempre que se consideren múltiples parámetros para evaluar la respuesta celular y que se definan bien las características de los ensayos, su alcance, con el objetivo de identificar parámetros de la calidad superficial de los implantes que favorezcan o dificulten el adecuado comportamiento osteoblástico. Cuanto menos, son una buena ayuda para decidir de qué superficies se puede esperar un buen comportamiento *in vivo*, sobre todo en lo que respecta a la regeneración ósea.

3.6. Conclusiones

Del análisis de los resultados obtenidos en este Capítulo se puede concluir que:

(1) Todas las superficies de Ti c.p. estudiadas en este Capítulo, cualquiera que sea la naturaleza o el tamaño de las partículas del granallado, son citocompatibles, por lo que los cambios topográficos y la contaminación superficial por parte de las partículas no perjudica el comportamiento de adhesión de los osteoblastos humanos.

(2) Para que los osteoblastos respondan a la microrugosidad es necesario que éstos perciban los detalles topográficos y los utilicen para su ubicación y fijación al sustrato, para lo cual, la relación dimensional entre los detalles superficiales (verticales $-R_a-$ y horizontales $-P_c$ y/o $1/HSC$) y la dimensión de las células es el factor fundamental.

(3) Las superficies de Ti c.p. consiguen una respuesta osteoblástica óptima cuando sus rugosidades son de valores $R_a \approx 4-5 \mu\text{m}$, $P_c \approx 65-80 /\text{cm}$, si estas superficies se han obtenido con partículas de Al_2O_3 o SiC, ya que el tipo morfológico de la rugosidad obtenido, la propia naturaleza química de estas partículas y las tensiones residuales que inducen en el metal, también pueden ser factores determinantes sobre la respuesta celular.

(4) La naturaleza química de las partículas de proyección tiene una influencia relevante sobre el comportamiento celular, de tal manera que el granallado con partículas de Al_2O_3 favorece la adhesión de los osteoblastos humanos y el granallado con partículas de SiC favorece la producción de osteocalcina de los mismos.

(5) El efecto de la conclusión (4) tiene una respuesta sinérgica con la rugosidad del sustrato, de manera que se maximizan los beneficios para las rugosidades referidas en la conclusión (3).

(6) El redondeo de los detalles topográficos de las superficies de Ti c.p. granalladas con ZrO_2 y las granalladas con SiC y pasivadas con HF/ HNO_3 , comparadas con las análogas granalladas con Al_2O_3 y con SiC pasivadas con HCl, probablemente es la principal causa del descenso en la adhesión y diferenciación de los osteoblastos humanos; hasta el punto de que no inducen un beneficio en estas respuestas celulares respecto al Ti c.p. sin tratar.

(7) Las bajas propiedades mecánicas de las partículas de TiO_2 y, como consecuencia, la excesivamente pequeña rugosidad que se obtiene, es la principal causa de que las superficies de Ti c.p. granalladas con estas partículas no tengan un efecto benéfico sobre la adhesión y la diferenciación de los osteoblastos.

(8) Para evitar que en futuros estudios los valores de producción de osteocalcina tengan una menor dispersión y, por lo tanto, las diferencias encontradas sean estadísticamente significativas, se debe aumentar el número de datos para cada muestra (factor estadístico) y se debe alargar en el tiempo la etapa de proliferación de los osteoblastos (factor celular).

3.7. Referencias

- [ABN00] 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* 49 (2000) 155-166.
- [ADA90] Adamson AW. "Physical Chemistry of Surfaces". John Wiley and Sons, New York (1990).
- [AKI96] Akiyama SK. Integrins in cell adhesion and signalling. *Human Cell* 9 (1996) 181-186.
- [ALB90] Albelda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 4 (1990) 2868-2880.
- [ALK97] Aronson BO, Lausmaa J, Kasemo B. Glow discharge plasma treatment for surface cleaning and modification of metallic biomaterials. *J Biomed Mater Res* 35 (1997) 49-73.
- [ANS00] Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *biomaterials* 21 (2000) 667-681.
- [ATM98] Alvarez M, Thunyakipisal P, Morrison P, Onyia J, Hock J, Bidwell JP. PTH-responsive osteoblast nuclear matrix architectural transcription factor bind to the rat type I collagen promotor. *J Cell Biochem* 69 (1998) 336-352.
- [AUB99] Aubin JE. Osteogenic cell differentiation. En "Bone Engineering"; ed. Davies JE. em squared Inc., Toronto (1999) p. 19-30.
- [BAM88] Baier RE, Meyer AE. Future directions in surface preparation of dental implants. *Dental Education* 52 (1988) 788-791.
- [BBK98] Boyan BD, Batzer R, Kieswetter K, Liu Y, Cochran DL, Szmuckler-Moncler S, Dean DD, Schwartz Z. Titanium surface roughness alter responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to $1\alpha,25-(OH)_2D_3$. *J Biomed Mater Res* 39 (1998) 77-85.
- [BBM94] Bloebaum RD, Bachus KN, Momberger NG, Hofmann AA. Mineral apposition rates of human cancellous bone at the interface of porous coated implant. *J Biomed Mater Res* 28 (1994) 537-544.
- [BDL01] Boyan BD, Dean DD, Lohmann CH, Cochran DL, Sylvia VL, Schwartz Z. The Titanium Bone-Cell Interface *In vitro*: The Role of the Surface in Promoting Osseointegration. En "Titanium in Medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications"; eds. Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P. Springer Verlag, Berlin (2001), p. 561-586.
- [BFS96] Bidwell J, Feister H, Swartz D, Onyia J, Holden J, Hock J. Parathyroid hormone regulates the expression of rat osteoblast and osteosarcoma nuclear matrix proteins. *J Cell Biochem* 63 (1996) 374-383.
- [BGC92] Bab I, Gazit D, Chorev M. Histone, Muhrad A, Shteyer A, Greenberg Z, Namdar M, Kahn A. H4-related osteogenic growth peptide (OGP): a novel circulating stimulator of osteoblastic activity. *EMBO J* 11 (1992) 1867-1873.
- [BHD96] Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* 17 (1996) 137-146.

- [BHK95] Boyan BD, Hummert TW, Kieswetter K, Schraub D, Dean DD, Schwartz Z. Effect of titanium surface characteristics on chondrocytes and osteoblasts *in vitro*. *Can Electron Microsc (Cells & Materials)* 5 (1995) 323-335.
- [BKR92] Bowers KT, Keller JC, Randolph BA, Wick DG, Michaels CM. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses *in vitro*. *Int J Oral Maxillofac Implants* 7 (1992) 302-310.
- [BLD01] Boyan BD, Lohmann CH, Dean DD, Sylvia VL, Cochran DL, Schwartz Z. Mechanisms involved in osteoblast response to implant surface morphology. *Annu Rev Mater Res* 31 (2001) 357-371.
- [BLL99] Boyan BD, Lincks J, Lohmann CH, Sylvia VL, Cochran DL, Blanchard CR, Dean DD, Schwartz Z. Effect of surface roughness and composition on costochondral chondrocytes is dependent on cell maturation state. *J Orthop Res* 17 (1999) 446-457.
- [BLL02] Bannister SR, Lohmann CH, Liu Y, Sylvia VL, Cochran DL, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z. Shear force modulates osteoblast response to surface roughness. *J Biomed Mater Res* 60 (2002) 167-174.
- [BLS01] Boyan BD, Lohmann CH, Sisk M, Liu Y, Sylvia VL, Cochran DL, Dean DD, Schwartz Z. Both cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mediate osteoblast response to titanium surface roughness. *J Biomed Mater Res* 55 (2001) 350-359.
- [BMB97] Buser D, Mericske-Stern R, Bernard JP, Behneke A, Behneke N, Hirt HP, Belser UC, Lang NP. Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. Part 1: 8-year life table analysis of a prospective multi-center study with 2359 implants. *Clin Oral Implants Res* 8 (1997) 161-172.
- [BOM90] Bonewald LF, Mundy GR. Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clin Orthop Rel Res* 250 (1990) 261-276.
- [BOR89] Bourdon MA, Ruoslahti E. Tenascin mediate cell attachment through and RGD-dependent receptor. *J Cell Biol* 108 (1989) 1149-1155.
- [BOS99] Boyan BD, Schwartz Z. Modulation of osteogenesis via Implant Surface Design. En “Bone Engineering”; ed. Davies JE. em squared Inc., Toronto (1999) p. 232-239.
- [BRU01] Brunette DM. Principles of cell behavior on titanium surfaces and their application to implanted devices. En “Titanium in Medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications”; eds. Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P. Springer Verlag, Berlin (2001), p. 485-512.
- [BRU86] Brunette DM. Spreading and orientation of epithelial cells on grooved substrata. *Exper Cell Res* 167 (1986) 203-217.
- [BRU88] Brunette DM. The effects of implant surface topography on the behaviour of cells. *Int J Oral Maxillofac Implants* 3 (1988) 231-246.
- [BUS01] Buser D. Titanium for dental applications (II): Implants with roughened surfaces. En “Titanium in Medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications”; eds. Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P. Springer Verlag, Berlin (2001), p. 875-888.

- [CCB95] Chesmel KD, Clark CC, Brighton CT, Black J. Cellular responses to chemical and morphologic aspects of biomaterials surfaces. II. The biosynthetic and migratory response of bone cell population. *J Biomed Mater Res* 29 (1995) 715-719.
- [CGB90] Cheroudi B, Gould TRL, Brunette DM. Titanium-coated micromachined grooves of different dimensions affect epithelial and connective tissue cells differently *in vivo*. *J Biomed Mater Res* 24 (1990) 1203-1219.
- [CHR84] Chyun YS, Raisz LG. Stimulation of bone formation by prostaglandin E₂. *Prostaglandins* 27 (1988) 97-103.
- [CLG94] Clver J, Gowen M. Are MG-63 and HOS-TE 85 human osteosarcoma cell lines representative models of the osteoblastic phenotype? *Bone* 15 (1994) 585-591.
- [CMW99] Cooper LF, Masuda T, Ehitson SW, Yliheikkilä P, Felton DA. Formation of mineralising osteoblasts cultures on machined, titanium oxide grit-blasted, and plasma-sprayed titanium surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* 14 (1999) 37-47.
- [CNH96] Cochran DL, Numikoski PV, Higgenbottom FL, Hermann JS, Makins SR, Buser D. Evaluation of an endosseous titanium implant with a sandblasted and acid-etched surface in the canine mandible: Radiographic results. *Clin Oral Implants Res* 7 (1996) 240-252.
- [CPV93] Canalis E, Pash J, Varghese S. Skeletal growth factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 3 (1993) 155-166.
- [CRL99] Craig RG, LeGeros RZ. Early events associated with periodontal connective tissue attachment formation on titanium and hydroxyapatite surfaces. *J Biomed Mater Res* 47 (1999) 585-594.
- [CSM98] Chicurel ME, Singer RH, Meyer CJ, Ingber DE. Integrin binding and mechanical tension induce movement of mRNA and ribosomes to focal adhesions. *Nature* 392 (1998) 730-733.
- [CSS93] Callen BW, Sodhi RNS, Shelton RM, Davies JE. Behavior of primary bone cells on characterized polystyrene surfaces. *J Biomed Mater Res* 27 (1993) 851-859.
- [CSW94] Cochran DL, Simpson J, Weber HP, Buser D. Attachment and Growth of periodontal cells on smooth and rough titanium. *Int J Oral Maxillofac Implants* 9 (1994) 289-297.
- [CUC92] Curtis ASG, Clark P. The effects of topographic and mechanical properties of materials on cell behaviour. *Crit Rev Biocomp* 5 (1992) 343-362.
- [CUW97] Curtis ASG, Wilkinson C. Topographical control of cells. *Biomaterials* 18 (1997) 1573-1583.
- [CUW99] Curtis A, Wilkinson C. New depths in cell behaviour: reactions of cells to nanotopography. En "Cell behaviour: control and mechanisms of motility". Portland Press Lmted., London (1999) p. 15-26.
- [DCR03] Dalby MJ, Childs S, Riehle MO, Johnstone HJ, Affrossman S, Curtis AS. Fibroblast reaction to island topography: changes in cytoskeleton and morphology with time. *Biomaterials* 24 (2003) 927-935.
- [DGN96] DeSantis D, Guerriero C, Nocini PF, Ungersbock A, Richards G, Gotte P, Armato U. Adult human bone cells from jaw bones cultured on plasma-sprayed or polished surfaces of titanium or hydroxyapatite discs. *J Mater Sci: Mater Med* 7 (1996) 21-28.

- [DKL01] Deligianni DD, Katsala N, Ladas S, Sotiropoulou D, Amedee J, Missirlis YF. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials* 22 (2001) 1241-1251.
- [DLR91] Dhawan J, Lichtler AC, Rowe DW, Farmer SR. Cell adhesion regulates pro-alpha 1(I) collagen mRNA stability and transcription in mouse fibroblasts. *J Bio Chem* 266 (1991) 8470-8475.
- [DLS90] Davies JE, Lowenberg B, Shiga A. The bone-titanium interface *in vitro*. *J Biomed Mater Res* 24 (1990) 1289-1306.
- [DSC02] Diniz MG, Soares GA, Coelho MJ, Fernandes MH. Surface topography modulates the osteogenesis in human bone marrow cell cultures grown on titanium samples prepared by a combination of mechanical and acid treatments. *J Mater Sci: Mater Med* 13 (2002) 421-432.
- [DUN82] Dunn GA. Contact Guidance of Cultured Tissue Cells: A Survey of Potentially Relevant Properties of the Substratum". En "Cell Substratum"; eds. Bellairs R, Curtis ASG, Dunn GA. Cambridge University Press, Cambridge-London-New York (1982) 247.
- [ESP01] Esposito M. Titanium for dental applications (I). En "Titanium in Medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications"; eds. Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P. Springer Verlag, Berlin (2001), p. 827-874.
- [GHA88] Grigoriadis AE, Heersche JN, Aubin JE. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: Effect of dexamethasone. *J Cell Biol* 106 (1988) 2139-2151.
- [GLL87] Glowacki J, Lian JB. Impaired recruitment of osteoclast progenitors in deficient osteocalcin-depleted bone implants. *Cell Differ* 21 (1987) 247-254.
- [GRM96] Gronowicz G, McCarthy MB. Response of human osteoblasts to implant materials: integrin-mediated adhesion. *J Orthop Res* 14 (1996) 878-887.
- [HAM79] Hay DI, Moreno EC. Differential adsorption and chemical affinities of proteins for apatitic surfaces. *J Dent Res* 58 (1979) 930-942.
- [HAR11] Harrison RG. On the stereotopsis of embryonic cells. *Science* 34 (1911) 279.
- [HBO93] Hazan R, Brener R, Oron U. Bone growth to metal implants is regulated by their surface chemical properties. *Biomaterials* 14 (1993) 570-574.
- [HCZ99] Howlett CR, Chen N, Zhang X, Akin FA, Haynes D, Hanley L, Revell P, Evans P, Zhou H, Zreiqat H. Effects of Biomaterial Chemistries on the Osteoblastic Molecular Phenotype and Osteogenesis: *In vitro* and *In vivo* Studies. En "Bone Engineering"; ed. Davies JE. em squared Inc., Toronto (1999) p. 240-255.
- [HEP73] Hench LL, Paschall HA. Direct chemical bond of bioactive-glass ceramic materials to bone and muscle. *J Biomed Mater Res* 7 (1973) 25-42.
- [HEW94] Howlett CR, Evans MD, Walsh WR, Johnson G, Steele JG. Mechanism of initial attachment of cells derived from human bone to commonly used prosthetic materials during cell culture. *Biomaterials* 15 (1994) 213-222.
- [HLC89] Hauschka PV, Lian JB, Cole EC, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein : vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev* 69 (1989) 990-1047.

- [HMB89] Hollinger J, Marx DE, Bach DE, Reddi AH, Seyfer AE. Calvarial bone regeneration using osteogenin. *J Oral Maxillofac Surg* 47 (1989) 1182-1187.
- [HSW94] Hambleton JC, Schwartz Z, Windeler SW, Luna MH, Brooks BP, Khare AG, Dean DD, Boyan BD. Culture surfaces coated with various implant materials affect chondrocyte growth and metabolism. *J Orthop Res* 12 (1994) 542-552.
- [ICP87] Inoue T, Cox JE, Pilliar RM, Melcher AH. Effect of the surface geometry of smooth and porous-coated titanium alloy on the orientation of fibroblasts *in vitro*. *J Biomed Mater Res* 21 (1987) 107-126.
- [IST93] Iuliano DJ, Saavedra SS, Truskey GA. Effect of the confrontation and orientation of adsorbed fibronectin on endothelial cell spreading and the strength of adhesion. *J Biomed Mater Res* 27 (1993) 1103-1113.
- [KAS02] Kasemo B. Biological Surface Science. *Surf Sci* 500 (2002) 656-677.
- [KAS83] Kasemo B. Biocompatibility of titanium implants: Surface science aspects. *J Prosth Dent* 49 (1983) 832-837.
- [KCG00] Krause A, Cowles EA, Gronowicz G. Integrin-mediated signaling in osteoblasts on titanium implant materials. *J Biomed Mater Res* 52 (2000) 738-747.
- [KHK92] Könönen M, HOrmia M, Kivilahti J, Hutaniemi J, Thesleff I. Effect of surface processing on the attachment orientation, and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. *J Biomed Mater Res* 26 (1992) 1325-1341.
- [KIL94] Kilpadi DV, Lemons JE. Surface energy characterization of unalloyed titanium implants. *J Biomed Mater Res* 28 (1994) 1419-1425.
- [KSH96] Kieswetter K, Schwartz Z, Hummert TW, Cochran DL, Simpson J, Dean DD, Boyan BD. Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblasts-like MG63 cells. *J Biomed Mater Res* 32 (1996) 55-63.
- [KSW94] Keller JC, Stanford CM, Wightman JP, Draughn RA, Zaharias R. Characterizations of titanium implant surfaces. III. *J Biomed Mater Res* 28 (1994) 939-946.
- [LBB98] Lincks J, Boyan BD, Blanchard CR, Lohmann CH, Liu Y, Cochran DL, Dean DD, Schwartz Z. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials* 19 (1998) 2219-2232.
- [LBS00] Lohmann CH, Bonewald LF, Sisk MA, Sylvia VI, Cochran DL, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z. Maturation state determines the response of osteogenic cells to surface roughness and 1,25-(OH)₂D₃. *J Bone Miner Res* 15 (2000) 1169-1180.
- [LCC85] Lian JB, Couttes MC, Canalis E. Studies of hormonal regulation of osteocalcin synthesis in cultured fetal rat calvarie. *J Biol Chem* 60 (1985) 8706-8710.
- [LEA00] LeBaron R, Athanasiou K. Extracellular matrix cell adhesion peptides: functional applications in orthopaedic material. *Tissue Engineering* 6 (2000) 85-103.
- [LIA87] Lian JB. Osteocalcin: functional studies and postulated role in bone resorption. En "Current advances in vitamin K research"; ed. Suttie W. Elsevier, New York (1987).
- [LIF78] Lian JB, Friedman PA. The vitamin K-dependent synthesis of gamma-carboxyglutamic acid by bone microsomes. *J Biol Chem* 253 (1978) 6623-6626.

- [LIS92] Lian JB, Stein GS. Concepts of osteoblast growth and differentiation: Basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 3 (1992) 269-305.
- [LIS93] Lian JB, Stein GS. The developmental stages of osteoblast growth and differentiation exhibit selective responses of genes to growth factors (TGF- β 1) and hormones (vitamin D and glucocorticoids). *J Oral Implantol* 19 (1993) 95-105.
- [LRF51] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 (1951) 265-275.
- [LSS99] Lohmann CH, Sagun Jr R, Sylvia VL, Cochran DL, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z. Surface roughness modulates the response of MG63 osteoblast-like cells to 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ through regulation of phospholipase A $_2$ activity and activation of protein kinase A. *J Biomed Mater Res* 47 (1999) 139-151.
- [LWH97] Lindenmuth DN, van Wijnen AJ, Hiebert S, Stein JL, Lian JB, Stein GS. Subcellular partitioning of transcription factors during osteoblast differentiation: developmental association of the AML/CBF alpha/PEBP2 alpha-related transcription factor-NMP-2 with the nuclear matrix. *J Cell Biochem* 66 (1997) 123-132.
- [LWL97] Lampin M, Warocquier-Clérout R, Legris C, Degrange M, Sigot-Luizard MF. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. *J Biomed Mater Res* 36 (1997).
- [LWO01] Lauer G, Wiedmann-Al-Ahmad M, Otten JE, Hübner U, Schmelzeisen R, Schilli W. The titanium surface texture effects adherence and growth of human gingival keratinocytes and human maxillar osteoblast-like cells *in vitro*. *Biomaterials* 22 (2001) 2799-2809.
- [MBN88] Meyer AE, Baier RE, Naatiella JR, Meenaghan MA. Investigation of tissue/implant interactions during the first two hours of implantation. *J Oral Implantol* 14 (1988) 363-379.
- [MDM98] Maxian SH, DiStefano T, Melican MC, Tiku ML, Zawadski JP. Bone cell behavior on matrigel-coated Ca/P coatings on varying cristallinities. *J Biomed Mater Res* 40 (1998) 171-179.
- [MGW93] Meyle J, Gültig K, Wolburg H, von Recum AF. Fibroblast anchorage to microtextured surfaces. *J Biomed Mater Res* 27 (1993) 1553-1557.
- [MKW95] Mehelich CS, van Kiuken L, Woelfel MM. Shot Peening. En "Metals Handbook, Vol 5: Surface Engineering", ed. Wood WG. American Society for Materials , Metals Park, OH (1995) p. 1338-149.
- [MOR99] Morton WA. Regulations. En "Handbook of biomaterials evaluation. Scientific, technical , and clinical testing of implant materials"; ed. von Recum AF. Taylor & Francis, Philadelphia (1999) 759-828.
- [MSH95] Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res* 29 (1995) 389-401.
- [MUN95] Mundy GR. Local control of bone formation by osteoblasts. *Clin Orthop* 313 (1995) 19-26.
- [MWV93] Meyle J, Wolburg H, von Recum AF. Surface Micromorphology and Cellular Interactions. *J Biomat Appl* 7 (1993) 362-374.

- [NAH91] Naji A, Harmand MF. Cytocompatibility of two coating materials, amorphous alumina and silicon carbide, using human differentiated cell cultures. *Biomaterials* 12 (1991) 690-694.
- [NDM91] Nakahara H, Dennis JE, Bruder SP, Haynesworth SE, Lennon DP, Caplan AI. *In vitro* differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp Cell Res* 195 (1991) 492-503.
- [NF S90-702] Matériel Médico-chirurgical. Evaluation *in vitro* de la cytotoxicité des matériaux et dispositifs médicaux. (1988).
- [NMK94] Niederauer GG, McGee TD, Keller JC, Zaharias RS. Attachment of epithelial cells and fibroblasts to ceramic materials. *Biomaterials* 15 (1994) 342-352.
- [OAS90] Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS. Progressive development of the rat osteoblast phenotype *in vitro*: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 143 (1990) 420-430.
- [OCC97] Ong JL, Carnes DL, Cardenas HL, Cavin R. Surface roughness of titanium on bone morphogenetic protein-2-treated osteoblast cells *in vitro*. *Impl Dent* 6 (1997) 19-24.
- [OPR96] Ong JL, Prince CW, Raikar GN, Lucas LC. Effect of surface topography of titanium on surface chemistry and cellular response. *Implant Dent* 5 (1996) 83-88.
- [OZK99] Ozawa S, Kasugai S. Evaluation of implant materials (hydroxyapatite, glass-ceramics, titanium) in rat bone marrow stromal cell culture. *Biomaterials* 17 (1996) 23-29.
- [PET77] Peterson, GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. Which is more generable applicable. *Anal Biochem* 83 (1977) 346-356.
- [PGD01] Park JY, Gemmell CH, Davies JE. Platelet interactions with titanium: modulation of platelet activity by surface topography. *Biomaterials* 22 (2001) 22671-2682.
- [PHD91] Puleo A, Holleran LA, Doremus RH, Bizios R. Osteoblast responses to orthopedic implant materials *in vitro*. *J Biomed Mater Res* 25 (1991) 711-723.
- [PKB88] Pearson BS, Klebe RJ, Boyan BD, Moskowicz D. Comments on the clinical application on fibronectin in dentistry. *J Dent Res* 67 (1988) 515-517.
- [PRI88] Price PA. Role of vitamin K-dependent proteins in bone metabolism. *Annu Rev Nutr* 8 (1988) 865-883.
- [PW-PST] http://www.proscitech.com.au/catalogue/get_frames.htm?s6.asp.
- [PZT90] Pankowsky DA, Ziats NP, Topham NS, Ratnoff OS, Anderson JM. Morphological characteristics of absorbed plasma proteins on vascular grafts and biomaterials. *J Vasc Surg* 11 (1990) 599-606.
- [RAT01] Ratner BD. A Perspective on Titanium Biocompatibility. En "Titanium in Medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications"; eds. Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P. Springer Verlag, Berlin (2001), p. 1-13
- [REC99] von Recum AF. Implantology. En "Handbook of biomaterials evaluation. Scientific, technical, and clinical testing of implant materials"; ed. von Recum AF. Taylor & Francis, Philadelphia (1999) 465-586.

- [ROE02] Ronold HJ, Ellingsen JE. Effect of micro-roughness produced by TiO₂ blasting-tensile testing of bone attachment by using coin-shaped implants. *Biomaterials* 23 (2002) 4211-4219.
- [ROR97] Richards RG, Owen GRh, Rahn BA, Gwynn I ap. A quantitative method of measuring cell-substrate adhesion areas. *Cells Mater* 7 (1997) 15-30.
- [RWR86] Romberg RW, Werness PG, Riggs BL, Mann KG. Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium-binding proteins. *Biochemistry* 25 (1986) 1176-1780.
- [SCH01] Schenk R. The corrosion properties of titanium and alloys. En "Titanium in Medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications"; eds. Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P. Springer Verlag, Berlin (2001), p. 145-171.
- [SDB92] Schwartz Z, Dennis R, Bonewald LF, Swain LD, Gomez R, Boyan BD. Differential regulation of prostglandin E₂ synthesis and phospholipase A₂ activity by 1,25-(OH)₂D₃ in three osteoblast-like cell lines (MC-3T3-E1, ROS 17/2.8, and MG63). *Bone* 13 (1992) 51-58.
- [SGS98] Schwartz Z, Gilley RM, Sylvia VL, Dean DD, Boyan BD. The effect of prostaglandin E₂ on costochondral chondrocyte differentiation is mediated by cAMP and protein kinase C. *Endocrinology* 139 (1998) 1825-1834.
- [SIT96] Sinha RK, Tuan RS. Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopaedic implant materials. *Bone* 18 (1996) 451-457.
- [SKS94] Stanford CM, Keller JC, Solursh M. Bone cell expression on titanium surfaces is altered by sterilization treatments. *J Dent Res* 73 (1994) 1061-1071.
- [SLO90] Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific cell gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J* 4 (1990) 3111-3123.
- [SLS01] Schwartz Z, Lohmann CH, Sisk M, Cochran DL, Sylvia VL, Simpson J, Dean DD, Boyan BD. Local factor production by MG63 osteoblast-like cells in response to surface roughness and 1,25-(OH)₂D₃ is mediated via protein kinase C- and protein kinase A-dependent pathways. *Biomaterials* 22 (2001) 731-741.
- [SLV01] Schwartz Z, Lohmann CH, Vocke AK, Sylvia VL, Cochran DL, Dean DD, Boyan BD. Osteoblast response to titanium surface roughness and 1 α ,25-(OH)₂D₃ is mediated through the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. *J Biomed Mater Res* 56 (2001) 417-426.
- [SMD96] Schwartz Z, Martin JY, Dean DD, Simpson J, Cochran DL, Boyan BD. Effect of titanium surface roughness on chondrocyte proliferation, matrix production, and differentiation depends on the state of cell maturation. *J Biomed Mater Res* 30 (1996) 145-155.
- [SMS94] Sinha RK, Morris F, Shah SA, Tuan RS. Surface composition of orthopedic implant metals regulates cell attachment, spreading and cytoskeletal organization of primary human osteoblasts *in vitro*. *Clin Orthop Rel Res* 305 (1994) 258-272.
- [SRB96] Squire MW, Ricci JL, Bizios R. Analysis of osteoblast mineral deposits on orthopaedic/implant metals. *Biomaterials* 17 (1996) 725-733.
- [SSH90] Schmitz JP, Schwartz Z, Hollinger JO, Boyan BD. Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta Anat* 138 (1990) 185-192.

- [SSK92] Schwartz Z, Swain Ld, Kelly DW, Brooks BP, Boyan BD. Regulation of prostaglandin E₂ production by vitamin D metabolites in growth zone and resting zone chondrocyte cultures is dependent on cell maturation. *Bone* 13 (1992) 395-401.
- [TEN01] Tengvall P. Proteins at Titanium Interfaces. En "Titanium in Medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications"; eds. Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P. Springer Verlag, Berlin (2001), p. 457-484.
- [TFS98] Torrungruang K, Feister H, Swartz D, Onyia J, Holden J, Hock J, Bidwell J. Parathyroid hormone (PTH) regulates the expression of the nuclear mitotic apparatus protein (NuMA) in the osteoblast-like cells, ROS 17/2.8. *Bone* 22 (1998) 317-324.
- [TLE97] Thomsen P, Larsson C, Ericson LE, Sennerby L, Lausmaa J, Kasemo B. Structure of the interface between rabbit cortical bone and implants of gold, zirconium and titanium. *J Mater Sci: Mater Med* 8 (1997) 653-665.
- [VKD96] Vezeau PJ, Koobush GF, Draughn RA, Keller JC. Effects of multiple sterilization on surface characteristics and *in vitro* biologic responses to titanium. *J Oral Maxillofac Surg* 54 (1996) 738-746.
- [WEI34] Weiss P. *In vitro* experiments on the factors determining the course of the outgrowing nerve fiber. *J Exp Zool* 68 (1934) 393-448.
- [WEI45] Weiss P. Experiments on cell and axon orientation *in vitro*: the role of colloidal exudates in tissue organization. *J Exp Zool* 100 (1945) 353-386.
- [WEN96] Wennerberg A. On Surface Roughness and Implant Incorporation. PhD Thesis, University of Göteborg, Göteborg (1996).
- [WIE99] Wieland M. Experimental determination and quantitative evaluation of the surface composition and topography of medical implant surfaces and their influence on osteoblastic cell-surface interactions. PhD Thesis, Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Zurich (1999).
- [WSR90] Weinreb M, Shinar D, Rodan GA. Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by *in situ* hybridization. *J Bone Min Res* 5 (1990) 831-842.
- [YMA96] Yliheikkilä PK, Masuda T, Ambrose WW, Suggs CA, Felton DA, Cooper LF. Preliminary comparison of mineralizing multilayer cultures formed by primary fetal bovine mandibular osteoblasts grown on titanium, hydroxyapatite, and glass substrates. *Int J Oral Maxillofac Implants* 11 (1996) 456-465.
- [ZAD04] Zinger O, Anselme K, Denzer A, Habersetzer P, Wieland M, Jeanfils J, Hardouin P, Landolt D. Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. *Biomaterials* 25 (2004) 2695-2711.
- [ZAG01] Zanchetta P, Guezennec J. Surface thermodynamics of osteoblasts: relation between hydrophobicity and bone biomaterials. *Colloid Surf B: Biointerf* 22 (2001) 301-307.