

# 6

## Adhesión, proliferación y diferenciación de osteoblastos humanos sobre Ti c.p. rugoso y bioactivo

---

### 6.1. Introducción

#### 6.1.1. Ámbito

Después de obtener las satisfactorias conclusiones del Capítulo anterior, se plantea evaluar la respuesta biológica de las superficies rugosas y bioactivas, puesto que de ello depende la validez del tratamiento como candidato para acelerar los procesos de osteointegración en los implantes dentales de Ti c.p.

Hasta lo que se ha podido saber, sólo Nishio y col. [NNA00] y Maitz y col. [MPM02] han publicado estudios sobre el comportamiento *in vitro* de osteoblastos sobre titanio bioactivo.

En [NNA00] sólo se evaluó el comportamiento de diferenciación de osteoblastos de médula ósea de rata con una larga serie de marcadores: actividad de fosfata alcalina,

síntesis de osteocalcina, osteopontina, osteonectina y colágeno, y niveles de ADN y ARN mensajero. Mientras que en [MPM02] se evaluó el conteo celular, así como la diferenciación por medio de la actividad de fosfatasa alcalina (FA) de osteoblastos de la línea SAOS-2, tras 14 días de cultivo. En ambos casos las muestras estudiadas eran lisas y recubiertas con fosfatos de calcio al sumergir los materiales tratados en soluciones del tipo *Simulated Body Fluid* (SBF).

De los trabajos referidos en el párrafo anterior se deduce que el conocimiento del comportamiento celular *in vitro* sobre los sustratos de Ti c.p. bioactivo es incompleto y, en el caso concreto de la posible interacción entre la rugosidad y la bioactividad, inexistente.

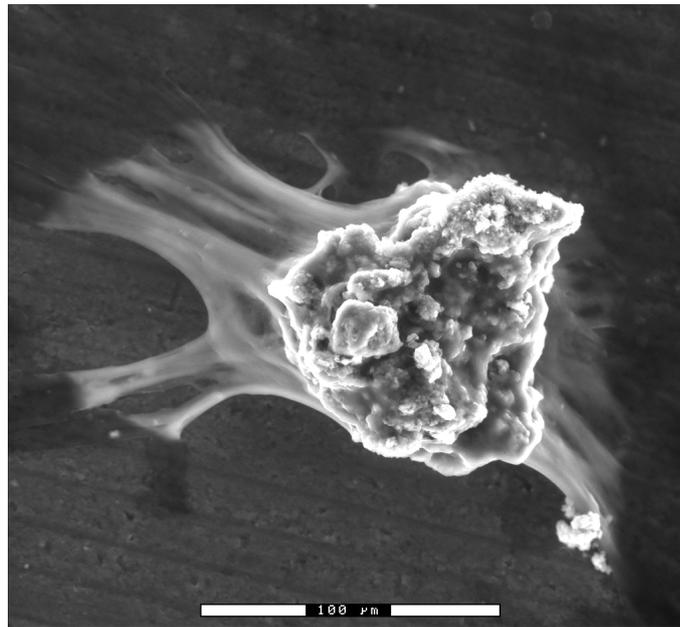
A diferencia de los dos trabajos referidos, en este estudio no se evaluó la respuesta osteoblástica sobre capas de fosfato de calcio, obtenidas *in vitro* sobre Ti c.p. bioactivo. Esto fue así debido a los problemas de contaminación bacteriana que se padecieron durante el desarrollo del Capítulo anterior. De esta manera, se decidió seguir estudiando solamente el Ti c.p. bioactivo, sin capa de hidroxiapatita, y utilizar el proceso de inmersión en SBF sólo para certificar la bioactividad del material obtenido. Además, se evita la realización de costosos controles en la producción del implante dental.

No obstante, se intentó resolver el problema de la contaminación bacteriana durante el manejo de las muestras en SBF de forma tecnológicamente sencilla. Para ello, se llevó a cabo una serie de estudios, cuyos resultados no se han incluido en esta tesis, que consistieron en adicionar al SBF diversas concentraciones de conservantes (azida sódica, ácido cítrico) o antibióticos (vancomicina, gentamicina). Los resultados no fueron satisfactorios al comprobarse que, en las concentraciones estudiadas, la adición de estos productos inhibe la capacidad de crecimiento de la HA sobre el Ti c.p. bioactivo, tanto liso como rugoso.

Como consecuencia, se decidió continuar sólo con el tratamiento termoquímico sobre el titanio, puesto que el material ya es bioactivo y, por lo tanto, será capaz de desarrollar reacciones biológicas positivas que lleven a una mejor osteointegración en términos de rapidez (corto plazo) y calidad de la fijación (corto y largo plazo).

Por otra parte, el granallado con SiC inhibió la bioactividad del Ti c.p. tratado termoquímicamente. Sin embargo, se ha mantenido en el estudio propuesto en este Capítulo con la intención de completar la respuesta celular en función del tipo de partículas del granallado y/o el tratamiento de bioactividad. Es conveniente recordar que la diferenciación celular sobre el Ti c.p. granallado con SiC fue superior que sobre el granallado con  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (Apartado 2.5.1.2).

Por último, en un estudio de Engel y col. [ECC00] se utilizó una nueva metodología de observación celular con un microscopio electrónico de barrido ambiental. La técnica permitió analizar morfológicamente osteoclastos sobre dentina (Figura 6.1) con una simple fijación de los mismos con paraformaldehído. La poca manipulación de las muestras y el empleo del microscopio ambiental, no sólo aportó ventajas metodológicas de tipo económico y temporal, sino que además permitió la observación de las células en un estado cuasi-hidratado, más cercano al estado natural de la célula. Con estos antecedentes, se planteó la posibilidad de trasladar esta metodología a los osteoblastos sobre los sustratos sintéticos que se estudian en esta tesis.



**Figura 6.1** Micrografía de un osteoclasto sobre dentina, obtenida por una técnica sencilla de fijación celular y observación por microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM). Reproducida con el permiso de los autores [ECC00].



## 6.2. Objetivos

En el Capítulo anterior se han obtenido superficies rugosas y bioactivas por medio de un tratamiento en dos pasos sobre Ti c.p. En primer lugar se granalla la superficie con partículas de tamaños entre 425-600  $\mu\text{m}$  (rugosidad) y a continuación se realiza un tratamiento termoquímico (Bio) con ataque con NaOH (obtención en la superficie de un gel de titanato de sodio) y deshidratación y densificación del gel a 600 °C (bioactividad). Asimismo, en los Capítulos 2, 3 y 4 de esta Tesis Doctoral se determinó que las superficies de Ti c.p. granalladas con SiC (SI6) o  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (AL6) con tamaños de partículas entre 425-600  $\mu\text{m}$ , tenían una calidad superficial (topografía y propiedades físico-químicas) óptimas para la respuesta biológica y degradativa a corto y largo plazo.

Los objetivos de este Capítulo son:

- 1.- Determinar el comportamiento de adhesión y proliferación de osteoblastos humanos sobre Ti c.p. rugoso, bioactivo, y rugoso y bioactivo.
- 2.- Determinar el comportamiento de diferenciación de osteoblastos humanos sobre Ti c.p. rugoso, bioactivo, y rugoso y bioactivo.
- 3.- Evaluar la validez de un nuevo método de observación microscópica de los osteoblastos en el microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM).



## **6.3. Materiales y Métodos**

### **6.3.1. Materiales**

#### **6.3.1.1. Material base y partículas de proyección del granallado**

Los estudios se han llevado a cabo sobre discos de 12 mm de diámetro de Ti c.p. Grado III, mecanizados a partir de barra.

Las partículas de proyección utilizadas para el granallado de los discos han sido las referidas como AL6 y SI6 en el Apartado 2.3.1.2.

Como control (Ctr) del estudio se ha empleado el plástico de cultivo, poliestireno ( $R_a=0,013\pm 0,002 \mu\text{m}$ ; perfilómetro de contacto), en discos de 12 mm de diámetro.

#### **6.3.1.2. Células**

Las células empleadas han sido osteoblastos de origen humano procedentes de cabezas de fémur de pacientes sometidos a cirugía. Estos pacientes han sido dos mujeres de 69 y 74 años y un varón de 68 años, sin enfermedades metabólicas asociadas.

A partir de las muestras de fémur se han obtenido las células osteoblásticas por cultivo primario. El hueso se ha troceado para separar el hueso esponjoso del cortical. Los explantes de hueso trabecular, de entre 1-2 mm, se han colocado en una placa de Petri y se han lavado varias veces con tampón salino fosfatado del tipo Dulbecco (PBS) (Gibco, EE.UU.) para eliminar residuos y células sanguíneas. A continuación, se han cultivado colocándolos sobre una malla de nylon<sup>®</sup> de 80  $\mu\text{m}$  que se mantiene entre dos anillas de vidrio en una placa de Petri con Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (Gibco, EE.UU.) suplementado con suero bovino fetal (FCS) (Kibbutz Beth Haemek, Israel) al 20 %, penicilina-estreptomina (Gibco, EE.UU.) al 1% y, piruvato L-glutamina (Gibco, EE.UU.) también al 1%.

Después de una semana, los osteoblastos comenzaron a proliferar a partir de los explantes y se renovó el medio de cultivo cada tres o cuatro días. Tras 3-4 semanas de cultivo, las células cubrieron por completo la malla y el fondo de la placa de Petri.

Las células se lavan con PBS y se despegan utilizando tripsina-EDTA al 0,25 % (Biological Industries, Israel).

Las células se caracterizaron para determinar su fenotipo osteoblástico por la actividad de fosfatasa alcalina y síntesis de osteocalcina después de la estimulación con vitamina D (SIGMA, EE.UU.). En todos los casos las células se tiñeron intensamente por reacción histoquímica de fosfatasa alcalina (SIGMA, EE.UU.) y secretaron osteocalcina (Metra™ Osteocalcín EIA Kit, Quidel, Alemania), por lo que han demostrado su adecuado fenotipo osteoblástico.

Se ha hecho un “pool” celular de los tres pacientes y, tras un primer pase, los osteoblastos se han congelado en nitrógeno líquido. Antes de realizar el ensayo de cultivo sobre los distintos materiales, las células se han descongelado y se ha hecho un nuevo pase, por lo que los osteoblastos empleados en el estudio son del segundo pase.

### 6.3.2. Métodos

#### 6.3.2.1. Obtención de los discos

Se obtuvieron siete grupos diferentes de 28 discos cada uno:

- Ctr: plástico de cultivo
- Ti: Ti c.p. mecanizado
- AL6: Ti c.p. granallado con partículas de  $Al_2O_3$  de tamaños 425-600  $\mu m$
- SI6: Ti c.p. granallado con partículas de SiC de tamaños 425-600  $\mu m$
- Ti-Bio: como Ti + tratamiento termoquímico
- AL6-Bio: como AL6 + tratamiento termoquímico
- SI6-Bio: como SI6 + tratamiento termoquímico

Los discos de las series AL6, SI6, AL6-Bio y SI6-Bio se granallaron con las mismas condiciones descritas en el Apartado 2.3.2.1.

Los discos de las series Ti, AL6 y SI6 se lavaron, pasivaron y secaron como se detalla en el Apartado 2.3.2.2.

Los discos de las series Ti-Bio, AL6-Bio y SI6-Bio se trataron termoquímicamente de acuerdo con lo expuesto en el Apartado 5.3.2.2.

Todos los discos se esterilizaron mediante óxido de etileno con las mismas condiciones descritas en el Apartado 3.3.2.1.

### 6.3.2.2. Rugosidad

La rugosidad de los discos obtenidos se determinó con el mismo rugosímetro y las mismas condiciones de medida descritas en el Apartado 2.3.2.3.2.

Se determinaron los parámetros  $R_a$  y  $P_c$  de acuerdo a las conclusiones del Capítulo 2.

Se observó la superficie del titanio tratado con las diferentes metodologías con un microscopio electrónico de barrido (MEB) (6400<sup>®</sup>, Jeol, Japón) con la intención de verificar que el aspecto de las superficies obtenidas era similar al obtenido para las superficies en los estudios previos de esta Tesis Doctoral.

### 6.3.2.3. Adhesión, proliferación y diferenciación celular

El protocolo experimental está basado en la norma NF S90-702.

#### 6.3.2.3.1. Cultivo

Para obtener la curva de crecimiento celular se distribuyeron 12 discos en una placa de cultivo de 24 pocillos (Figura 6.2), de la siguiente forma, para cada uno de los materiales estudiados:

1	2	3	4	5	6	7
A	24 h	24 h	24 h	Ctr medio 24 h	Ctr medio 24 h	
B	3 días	3 días	3 días	Ctr medio 3 días	Ctr medio 3 días	
C	7 días	7 días	7 días	Ctr medio 7 días	Ctr medio 7 días	
D	14 días	14 días	14 días	Ctr medio 14 días	Ctr medio 14 días	



Figura 6.2 Imagen de detalle de las muestras ensayadas en los pocillos de la placa de cultivo.

Para obtener las muestras para microscopía electrónica y para la determinación de la diferenciación osteoblástica, con medio suplementado con vitamina D (+ vit D) o no suplementado con esta vitamina D (- vit D), se distribuyeron los 16 discos restantes de cada material en otra placa de cultivo de 24 pocillos, de la siguiente forma:

<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
<b>A</b>	24 h-ME*	24 h-ME	3 días-ME	3 días-ME	7 días-ME	7 días-ME
<b>B</b>	14 días-ME	14 días-ME				
<b>C</b>	- vit D	- vit D	- vit D	- vit D	Ctr medio - vit D	Ctr medio - vit D
<b>D</b>	+ vit D	+ vit D	+ vit D	+ vit D	Ctr medio + vit D	Ctr medio + vit D

\*ME: Microscopía electrónica

Al inicio del ensayo se sembraron todas las muestras con una suspensión de 12.000 células por pocillo, y se cultivaron a 37 °C con medio completo IMDM (Iscove Modified Dulbecco's Médium) (Gibco, EE.UU.) suplementado con 10 % de FCS y penicilina-streptomomicina al 1 %, en atmósfera húmeda al 5 % de CO<sub>2</sub>.

Al cabo de 14 días de cultivo se reemplazó el medio de cultivo por IMDM libre de suero y se mantuvieron los cultivos durante 24 h en incubación. Se volvió a cambiar el medio por IMDM más 3 % de suero dilipidado con carbón activo (SIGMA, EE.UU.) conteniendo, en todos los casos, vitamina K<sub>1</sub> (10<sup>-8</sup> M) (SIGMA, EE.UU.) y vitamina C (50 µg/ml) (SIGMA, EE.UU.). 4 muestras se suplementaron con vitamina 1α,25(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> (10<sup>-8</sup>) (SIGMA, EE.UU.), correspondiente a las muestras + vit D, y a cuatro muestras no se les suplementó esta vitamina, correspondiente a las muestras - vit D.

Tras 72 h de incubación, se recolectó el medio de cultivo y el contenido celular, y se procedió a la determinación de la actividad de fosfatasa alcalina.

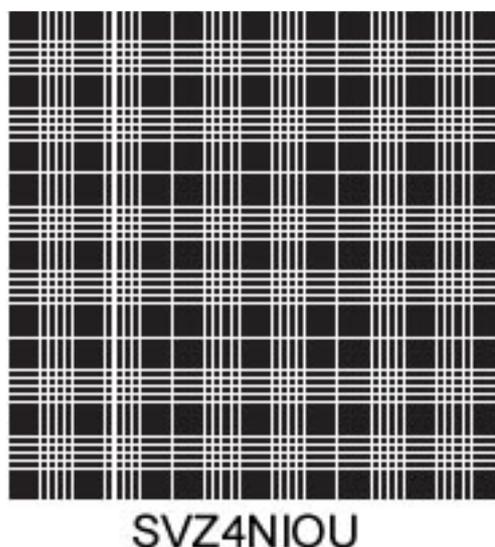
#### 6.3.2.3.2. Recuento celular

Para la obtención de los resultados de adhesión osteoblástica (24 h de cultivo) y la curva de proliferación celular (24 h, 3 y 7 días de cultivo) se realizaron recuentos en 3 discos de cada tipo de material.

Para realizar el recuento, se lavaron las células con PBS y se añadieron 250 µl de tripsina-EDTA, y se dejaron en la estufa hasta que las células se soltaron del sustrato.

A continuación se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer (Marienfeld, Alemania) (Figura 6.3) con un microscopio invertido con ocular micrométrico (1 cm<sup>2</sup>) y con el objetivo de x10, campo 0,01 cm<sup>2</sup>. Se leyeron 5 campos en cada pocillo y se obtuvo el valor medio.

Los resultados se han expresado en n° de células/cm<sup>2</sup>.



**Figura 6.3** Representación de la configuración de campos de una cámara de Neubauer-mejorada para el recuento celular [PW-PST].

#### 6.3.2.3.3. Actividad de la fosfatasa alcalina

La diferenciación celular se evaluó por medio de la medición de la actividad de fosfatasa alcalina (FA). La determinación se llevó a cabo tras recolectar las células y lavarlas con PBS. Se dividieron en dos alícuotas, en una relación 2:1. La alícuota mayor se resuspendió en 300  $\mu$ l de agua desionizada más un 25 % de tritón-100 (SIGMA, EE.UU.).

La actividad de FA se determinó con acuerdo al método descrito por Bessey y col. [BLB46]. El procedimiento se basa en la utilización de p-nitrofenol fosfato (Upstate, EE.UU.) como sustrato y se mide el color amarillo en solución alcalina procedente del p-nitrofenol liberado por la acción enzimática de la FA. Para la lectura de los resultados se empleó un espectrofotómetro (UV-1700<sup>®</sup>, Shimadzu, Japón) a 410 nm de longitud de onda.

La actividad enzimática se expresó en unidades equivalentes a la liberación de 1  $\mu$ mol de p-nitrofenol por minuto (unidades SIGMA). La actividad específica de FA se definió como unidades de actividad ( $\mu$ mol /min)/mg de proteínas.

Para la determinación de las proteínas totales se utilizó el método del colorante Bio-Rad Protein Assay<sup>®</sup> (Bio-Rad Laboratories, EE.UU.), basado en el método de Bradford [BRA76]. La concentración de proteínas se determinó por análisis de regresión lineal,

determinando la pendiente de la recta y comparándola con la curva estándar de suero de albúmina bovina (BSA) (SIGMA, EE.UU.).

#### **6.3.2.4. Morfología celular**

Se tomaron dos muestras para la observación de las células por microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) (2020<sup>®</sup>, Electroscan, EE.UU.), en cada uno de los tiempos estudiados.

Las observaciones se llevaron a cabo utilizando una célula Peltier a una presión de cámara de 5 Torr (con vapor de agua) y 4 °C. Este método, con el ESEM, permite a las células permanecer prácticamente hidratadas. Se empleó un potencial de 5-10 keV para reducir al mínimo el daño que el haz de electrones pudiese causar sobre las células.

Los resultados preliminares sólo fueron parcialmente satisfactorios puesto que, si los tiempos de exposición eran demasiado largos, las células se dañaban y se soltaban del sustrato.

Por esta razón, se decidió fijar las células. Se emplearon dos métodos de fijación. Cada uno de ellos se aplicó en una de las dos muestras de cada material y tiempo de cultivo. El primer método consistió en fijar las células con glutaraldehído (GA) al 2% en tampón cacodilato a 4 °C durante 2 horas, conservándose a continuación en tampón cacodilato a 4°C hasta el momento de su visualización en el ESEM.

El segundo de los métodos se llevó a cabo utilizando como adhesivo paraformaldehído (PF) al 4 % durante 5 minutos a temperatura ambiente, conservándose a continuación en PBS a 4 °C hasta el momento de su visualización en el ESEM.

#### **6.3.2.5. Estadística**

Para evaluar si las diferencias entre los distintos valores obtenidos eran estadísticamente significativas se han llevado a cabo tests de la t-Student, y se han obtenido las tablas ANOVA de un factor aplicando el test de comparaciones múltiples de Fisher. En todos los casos, se ha determinado  $p < 0,05$  como valor de significación estadística.

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

## 6.4. Resultados

### 6.4.1. Rugosidad

Los resultados cuantitativos de rugosidad superficial para los distintos tipos de superficies se resumen en la Tabla 6.I. Los valores determinados, tanto para  $R_a$  como para  $P_c$ , son similares a los obtenidos en los Capítulos previos. Asimismo, la rugosidad de las superficies sólo granalladas y las granalladas más el tratamiento termoquímico (Ti vs Ti-Bio; AL6 vs AL6-Bio; y SI6 vs SI6-Bio) muestran valores muy similares entre ellos y con diferencias que no son estadísticamente significativas (test t-Student).

**Tabla 6.I** Valores medios  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de  $R_a$  y  $P_c$  para cada uno de los tipos de superficies de titanio estudiadas.

	$R_a \pm D.E. [\mu m]$	$P_c [/\text{cm}]$
Ti	$0,27 \pm 0,07$	$144 \pm 50,3$
Ti-Bio	$0,29 \pm 0,04$	$165 \pm 25,0$
AL6	$4,24 \pm 0,31$	$90,6 \pm 11,2$
AL6-Bio	$4,14 \pm 0,44$	$99,3 \pm 7,3$
SI6	$3,99 \pm 0,21$	$101,0 \pm 21,2$
SI6-Bio	$3,93 \pm 0,27$	$99,4 \pm 14,8$

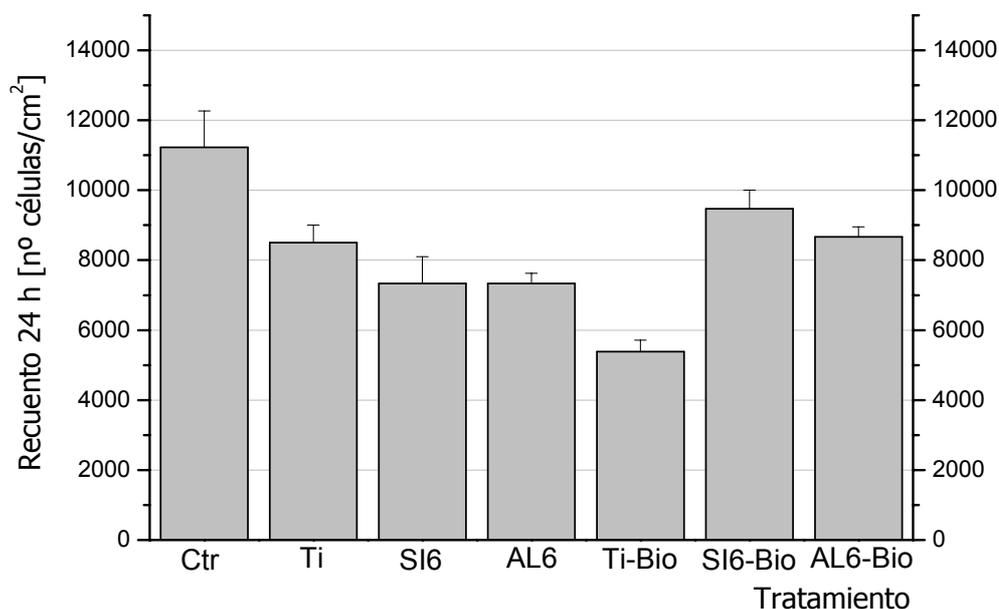
Las superficies observadas por MEB presentaron topografías similares a las obtenidas previamente en esta Tesis Doctoral. Las superficies granalladas tienen una rugosidad escarpada y restos de partículas de proyección, y las Bio muestran el gel de morfología esquelética, sobrepuesto a la rugosidad de orden micrométrico conseguida gracias al granallado.

### 6.4.2. Adhesión celular

La Tabla 6.II y la Figura 6.4 muestran los resultados para la adhesión de osteoblastos humanos sobre las distintas superficies de Ti c.p. estudiadas.

**Tabla 6.II** Valores medios de recuento de osteoblastos después de 24 h de cultivo sobre los distintos materiales y superficies estudiadas. D.E. Desviación estándar. Valores unidos con una misma línea recta vertical no tienen diferencias estadísticamente significativas.

	Recuento celular (24 h) [n° células/cm <sup>2</sup> ] $\pm$ D.E.	Signif. estad.
Ti-Bio	$5383 \pm 333$	●   ●
SI6	$7333 \pm 764$	
AL6	$7333 \pm 289$	
Ti	$8500 \pm 500$	●   ●
AL6-Bio	$8667 \pm 289$	
SI6-Bio	$9467 \pm 409$	●   ●
Ctr	$11225 \pm 1036$	



**Figura 6.4** Representación gráfica de los resultados de adhesión osteoblástica sobre los distintos tipos de materiales y superficies estudiadas.

Los resultados no muestran ninguna tendencia clara respecto al efecto del tratamiento termoquímico y/o de granallado sobre la adhesión osteoblástica.

Es destacable el hecho de que sobre el plástico de cultivo (Ctr) la adhesión es mayor, así como que sobre las superficies que no son Bio, los osteoblastos se han adherido en mayor número en Ti que en las granalladas (AL6, SI6), aunque sin diferencias estadísticamente significativas.

### 6.4.3. Proliferación celular

En las Tablas 6.III, 6.IV y 6.V se resumen los valores de recuento osteoblástico para, junto con los resultados de la Tabla 6.II, obtener las curvas de proliferación celular para todos los tipos de materiales y tipos de superficies estudiadas (Figura 6.5).

Los osteoblastos proliferaron sobre todas las superficies adecuadamente, sin tendencias significativas respecto al comportamiento de proliferación en función del grado de rugosidad, el tipo de partícula de granallado o si la superficie ha sido tratada o no termoquímicamente. A lo largo de los 14 días de cultivo, el número de osteoblastos sobre el plástico de control fue superior al resto de materiales con diferencias estadísticamente significativas, excepto con respecto al grupo Ti a los 14 días de cultivo.

**Tabla 6.III** Valores medios de contejo de osteoblastos después de 3 días de cultivo, sobre los distintos materiales y superficies estudiadas. D.E. Desviación estándar. Valores unidos con una misma línea recta vertical no tienen diferencias estadísticamente significativas.

	Recuento celular (3 d) [n° células/cm <sup>2</sup> ] ± D.E.	Signif. estad.
Ti-Bio	8250 ± 1953	●
SI6	8583 ± 520	●
AL6	8250 ± 250	●
AL6-Bio	11750 ± 1521	●
SI6-Bio	11750 ± 750	●
Ti	11933 ± 751	●
Ctr	17670 ± 1015	●

**Tabla 6.IV** Valores medios de contejo de osteoblastos después de 7 días de cultivo, sobre los distintos materiales y superficies estudiadas. D.E. Desviación estándar. Valores unidos con una misma línea recta vertical no tienen diferencias estadísticamente significativas.

	Recuento celular (7 d) [n° células/cm <sup>2</sup> ] ± D.E.	Signif. estad.
Ti-Bio	13317 ± 759	●
SI6-Bio	13583 ± 1283	●
AL6	15117 ± 340	●
Ti	15567 ± 814	●
SI6	15583 ± 1010	●
AL6-Bio	19167 ± 764	●
Ctr	28272 ± 1876	●

**Tabla 6.V** Valores medios de contejo de osteoblastos después de 14 días de cultivo, sobre los distintos materiales y superficies estudiadas. D.E. Desviación estándar. Valores unidos con una misma línea recta vertical no tienen diferencias estadísticamente significativas.

	Recuento celular (14 d) [n° células/cm <sup>2</sup> ] ± D.E.	Signif. estad.
SI6-Bio	25533 ± 1147	●
AL6-Bio	29367 ± 2875	●
SI6	35000 ± 250	●
Ti-Bio	35417 ± 722	●
AL6	46750 ± 1887	●
Ti	50400 ± 693	●
Ctr	52069 ± 2268	●

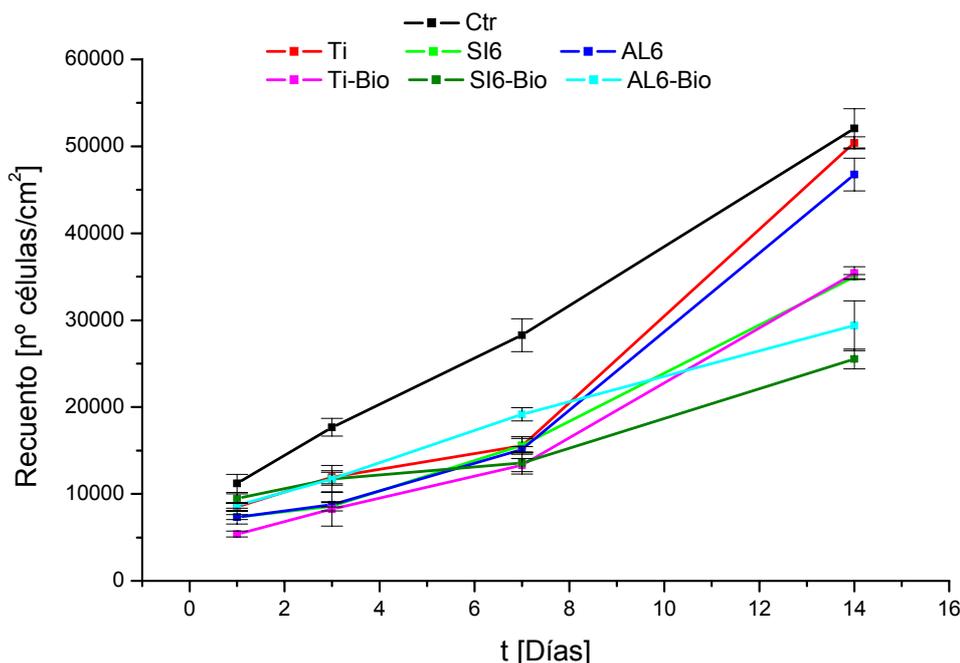


Figura 6.5 Curvas de proliferación celular de todas las superficies estudiadas.

#### 6.4.4. Diferenciación celular

Los resultados de la actividad de FA (FA) de los osteoblastos sobre todos los tipos de materiales y tipos de superficies estudiadas se resumen en las Tablas 6.VI y 6.VII.

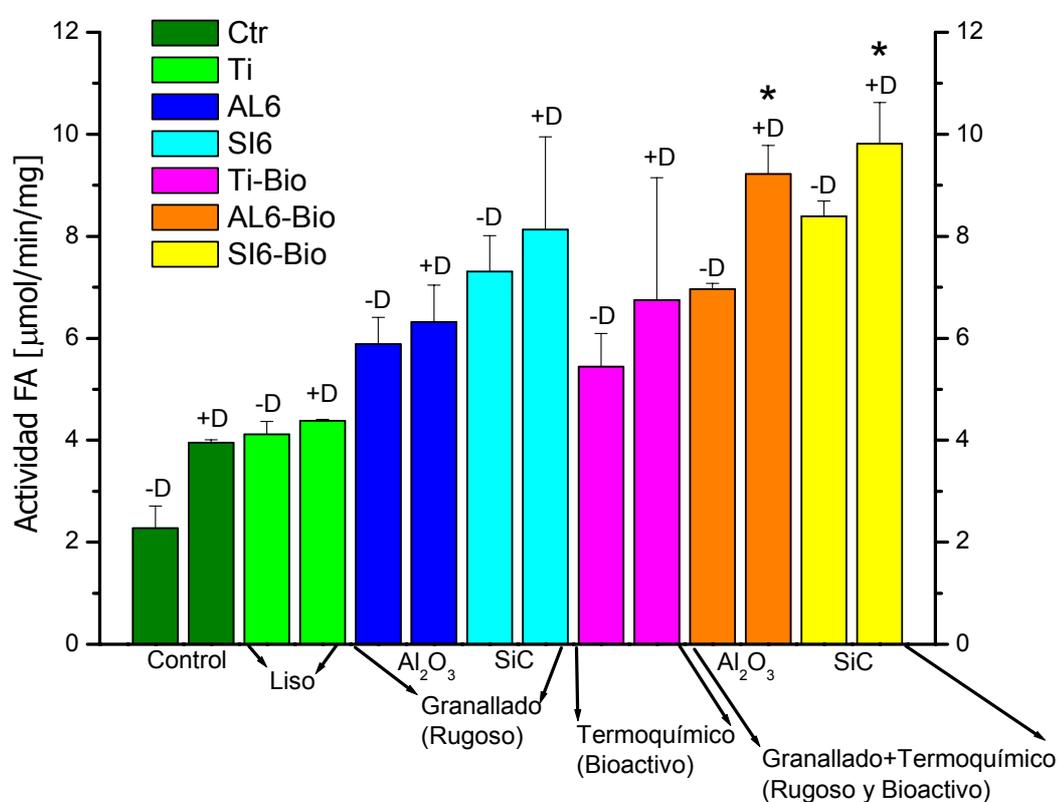
La Figura 6.6 muestra gráficamente, y de forma comparativa, los resultados de diferenciación de los osteoblastos sobre todos los tipos de materiales y superficies estudiadas. Para facilitar la comparación, se han agrupado los resultados según los distintos tipos de superficies (no granalladas, granalladas, no granalladas y Bio, granalladas y Bio) y si el medio estaba suplementado o no con vitamina D (- D, + D).

Tabla 6.VI Valores medios de la actividad de FA para todos los osteoblastos en medios - vitD, sobre todos los tipos de materiales y de superficies estudiadas. D.E. Desviación estándar. Valores unidos con una misma línea recta vertical no tienen diferencias estadísticamente significativas.

	Actividad FA [ $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{ml}$ ] $\pm$ D.E.	Signif. estad.
Ctrl	2,276 $\pm$ 0,43	
Ti	4,114 $\pm$ 0,25	
Ti-Bio	5,442 $\pm$ 0,65	
AL6	5,881 $\pm$ 0,53	
AL6-Bio	6,963 $\pm$ 0,11	
SI6	7,311 $\pm$ 0,70	
SI6-Bio	8,388 $\pm$ 0,35	

**Tabla 6.VII** Valores medios de la actividad de FA para todos los osteoblastos en medios + vitD, sobre todos los tipos de materiales y de superficies estudiadas. D.E. Desviación estándar. Valores unidos con una misma línea recta vertical no tienen diferencias estadísticamente significativas.

	Actividad FA [ $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{ml}$ ] $\pm$ D.E.	Signif. estad.
Ctr	4,209 $\pm$ 0,40	
Ti	5,397 $\pm$ 1,76	●
AL6	6,322 $\pm$ 0,72	●
Ti-Bio	6,747 $\pm$ 2,40	●
SI6	8,131 $\pm$ 1,82	●
AL6-Bio	9,219 $\pm$ 0,56	●
SI6-Bio	9,817 $\pm$ 0,81	●



**Figura 6.6** Representación gráfica de los resultados de diferenciación de osteoblastos sobre todos los tipos de materiales y de superficies estudiadas. \* Diferencias estadísticamente significativas con todo el resto de grupos de estudio.

Analizando los resultados por separado para las superficies Bio y para las que no lo son, el nivel de diferenciación osteoblástica es creciente desde las superficies mecanizadas, pasando por las granalladas con  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , para obtener los mayores valores de actividad de FA sobre las granalladas con SiC.

Para un mismo tipo de tratamiento de superficie previo, las superficies Bio muestran valores de actividad de FA superiores.

Para los resultados expuestos en los dos párrafos previos, las diferencias han sido estadísticamente significativas, o no lo han sido, sin tendencias generalizadas (Tablas 4.VI y 4.VII).

Todos los grupos tienen un mayor nivel de diferenciación en los grupos + vitD que en los - vitD. Sin embargo, sólo sobre las superficies AL6-Bio y SI6-Bio, es decir, las granalladas y tratadas termoquímicamente, las diferencias son estadísticamente significativas entre los grupos + vitD y - vitD.

Tanto en el medio + vit D como en el - vitD, las superficies Ctr han presentado los niveles inferiores de actividad de FA, con diferencias estadísticamente significativas con respecto al resto de superficies estudiadas.

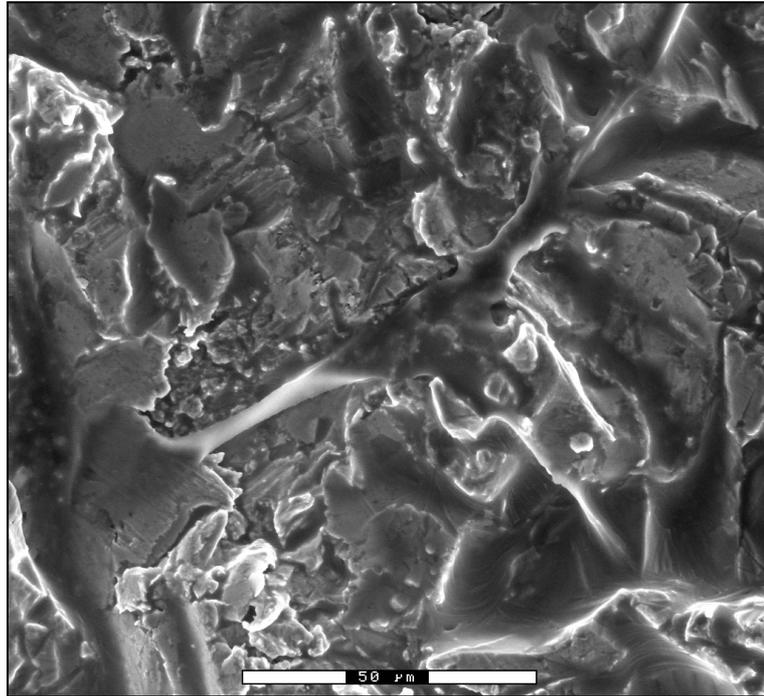
#### **6.4.5. Morfología celular**

No se consiguieron visualizar los osteoblastos sobre todos los tipos de superficies ni a todos los tiempos de cultivo.

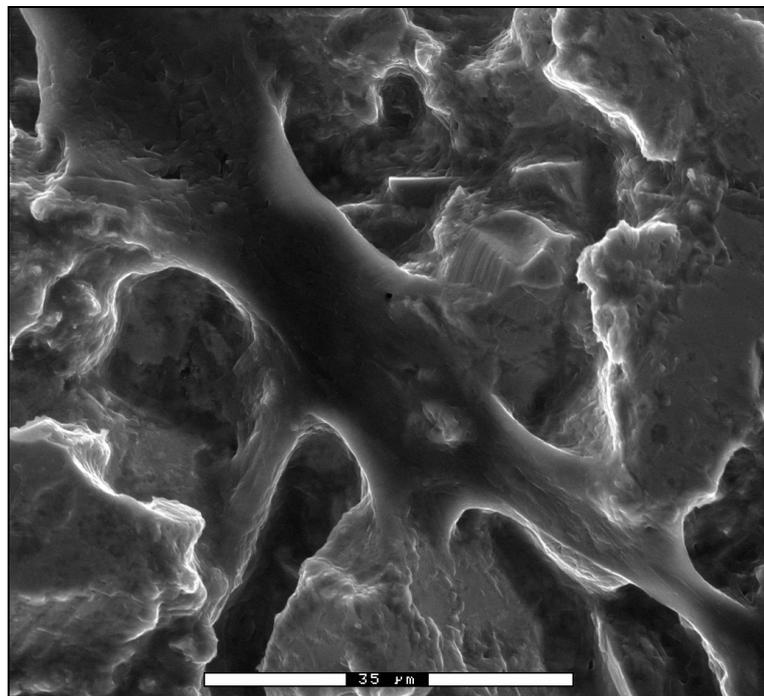
Para las superficies lisas (Ctr, Ti, Ti-Bio) no se consiguieron visualizar los osteoblastos en ningún caso. Tampoco se visualizaron osteoblastos en ninguno de los discos en que las células se fijaron con GA. En el resto de superficies rugosas y con los osteoblastos fijados con PF, se consiguieron micrografías sólo en algunos tiempos de cultivo.

Los resultados a 24 h de cultivo sólo permitieron visualizar algunos de los restos de los osteoblastos, como por ejemplo, para las muestras AL6 (Figuras 6.7 y 6.8), y SI6 (Figura 6.9).

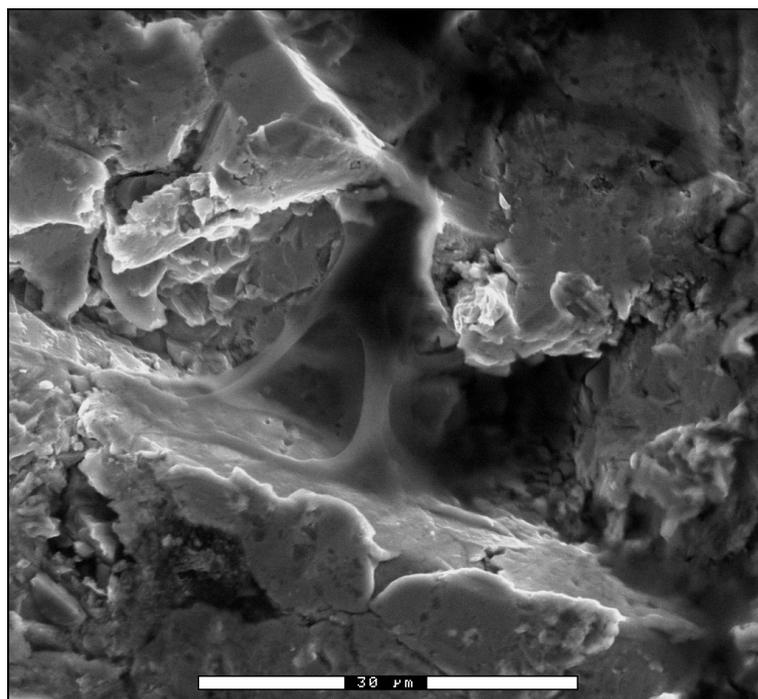
También se obtuvieron imágenes de los osteoblastos después de 7 días de cultivo. Las Figuras (Figuras 6.10 y 6.11) muestran osteoblastos sobre superficies granalladas con óxido de aluminio; mientras que sobre las superficies granalladas con SiC se obtuvieron imágenes de varios osteoblastos en contacto entre ellos y con elevada actividad dorsal (Figuras 6.12 y 6.13).



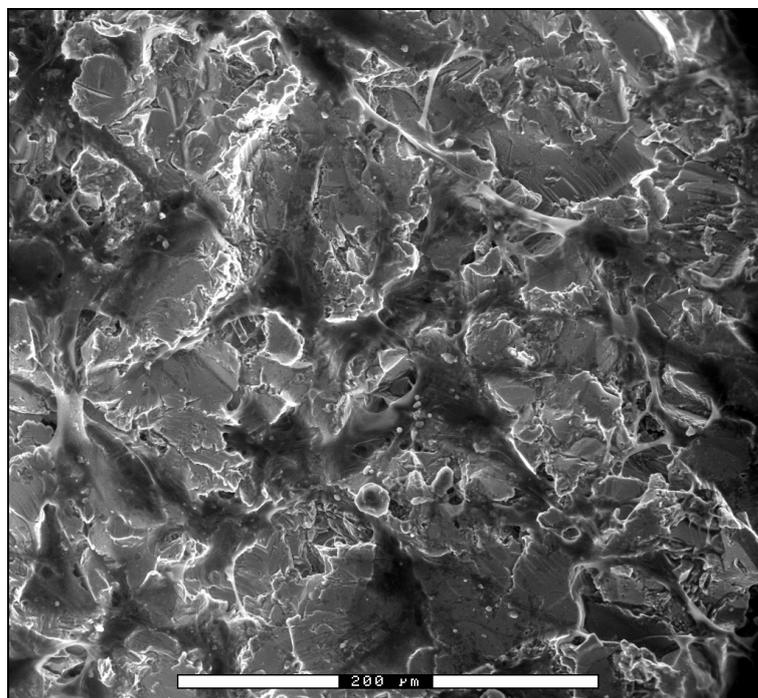
**Figura 6.7** Micrografía de ESEM mostrando restos de filopodios de un osteoblasto sobre una superficie AL6, después de 24 h de cultivo ( $\times 700$ ).



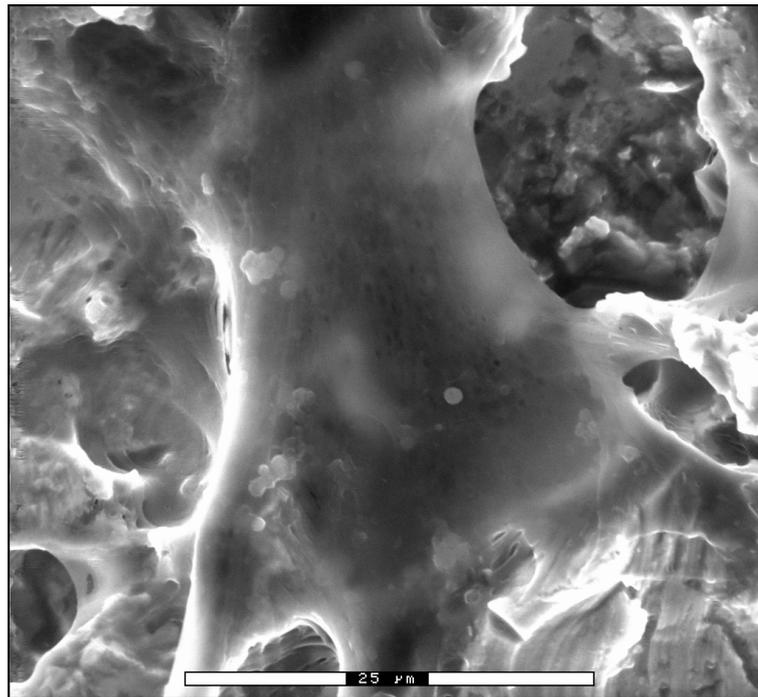
**Figura 6.8** Micrografía de ESEM mostrando restos del cuerpo de un osteoblasto sobre una superficie AL6, después de 24 h de cultivo ( $\times 1250$ ).



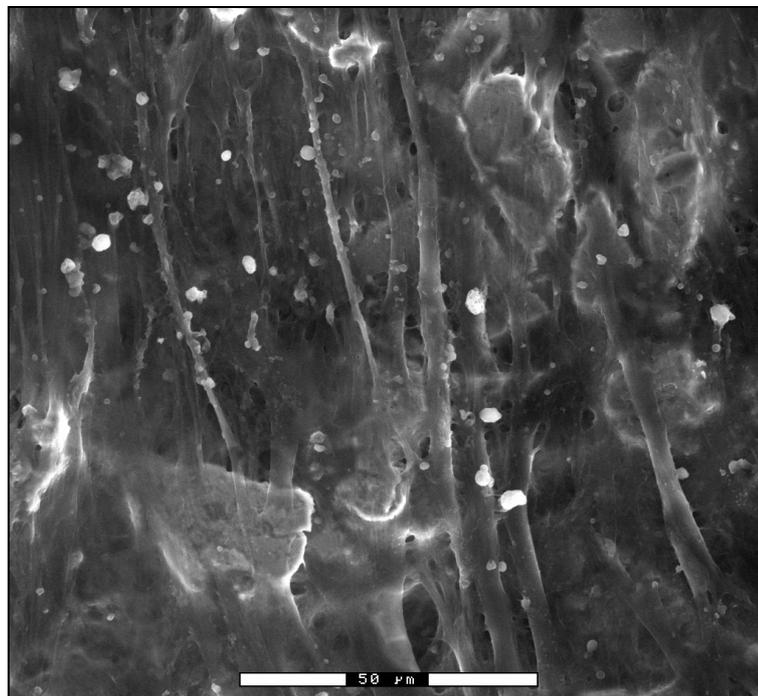
**Figura 6.9** Micrografía de ESEM mostrando restos de filopodios de un osteoblasto, sobre una superficie SI6, después de 24 h de cultivo ( $\times 1500$ ).



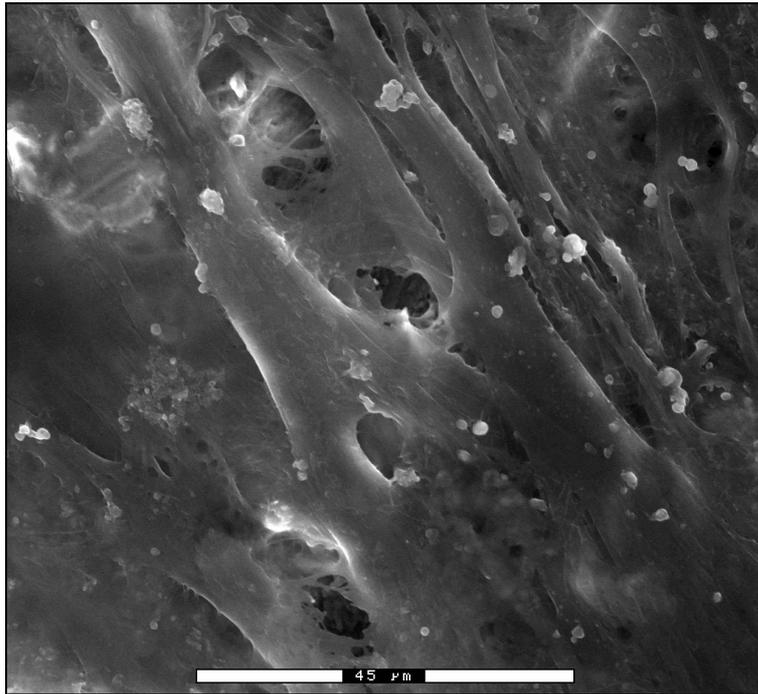
**Figura 6.10** Micrografía de ESEM que muestra diferentes osteoblastos distribuidos sobre una superficie AL6, después de 7 días de cultivo ( $\times 250$ ).



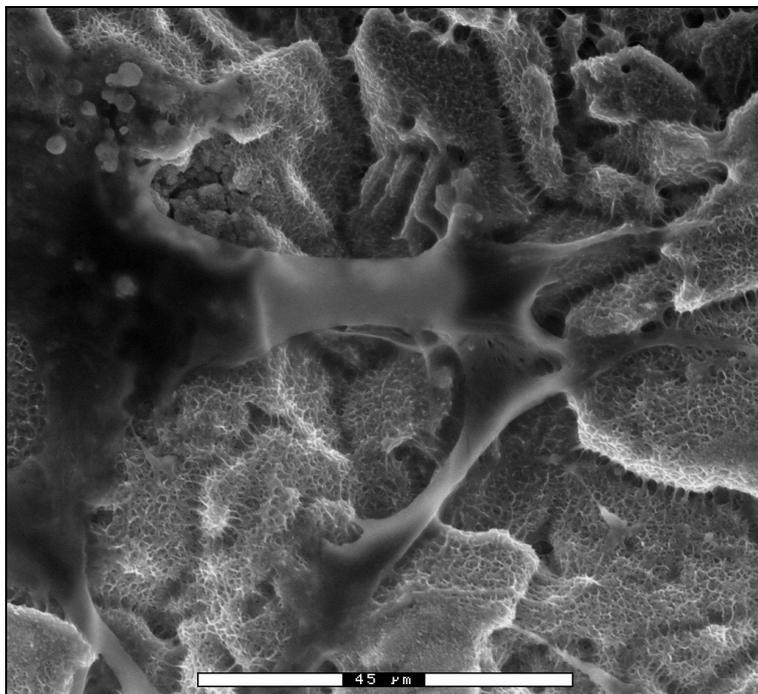
**Figura 6.11** Micrografía de ESEM que muestra el cuerpo de un osteoblasto con actividad dorsal, sobre una superficie AL6, después de 7 días de cultivo ( $\times 1950$ ).



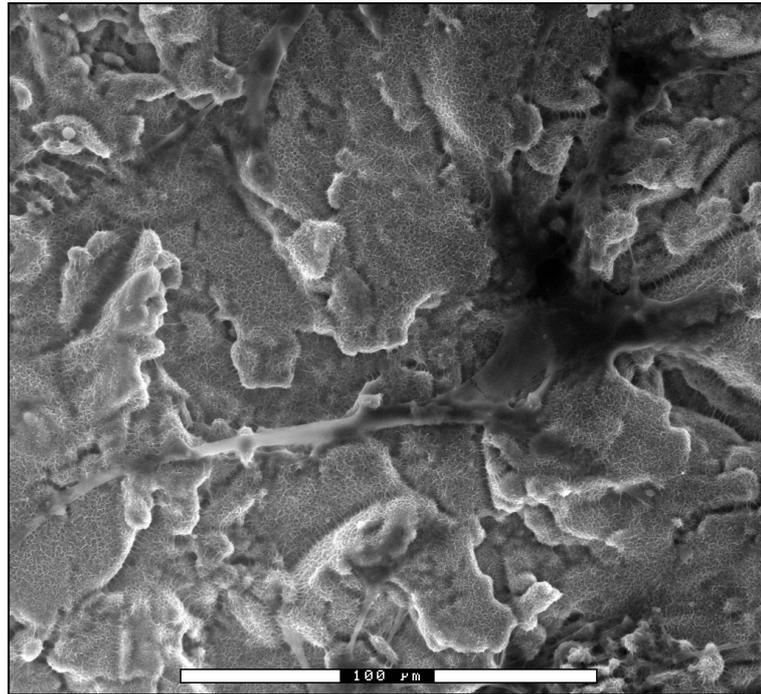
**Figura 6.12** Micrografía de ESEM que muestra osteoblastos, con contacto entre ellos, con largas extensiones citoplasmáticas, sobre una superficie SI6, después de 7 días de cultivo ( $\times 700$ ).



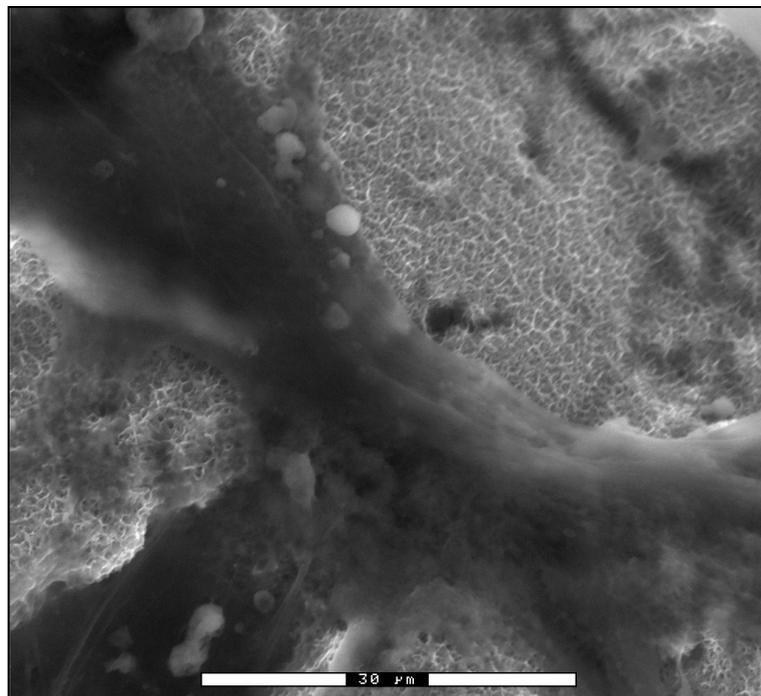
**Figura 6.13** Micrografía de ESEM que muestra un detalle de la Figura 6.12 en que se aprecia la íntima interacción entre los osteoblastos, así como la evidente actividad dorsal ( $\times 1000$ ).



**Figura 6.14** Micrografía de ESEM que muestra un osteoblasto con filopodios anclados en la rugosidad superficial y actividad dorsal, sobre una superficie AL6-Bio, después de 7 días de cultivo ( $\times 1000$ ).



**Figura 6.15** Micrografía de ESEM que muestra un osteoblasto con filopodios anclados en la rugosidad superficial, sobre una superficie SI6-Bio, después de 7 días de cultivo ( $\times 500$ ).



**Figura 6.16** Micrografía de ESEM que muestra un detalle de la superficie de un osteoblasto con actividad dorsal, sobre una superficie SI6-Bio, después de 7 días de cultivo ( $\times 1500$ ).

Finalmente, también se pudieron obtener imágenes de osteoblastos después de 7 días de cultivo sobre superficies granalladas y Bio, tanto para el granallado con  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (Figura 6.14), como con SiC (Figuras 6.15 y 6.16). En todos los casos se pueden apreciar las extensiones citoplasmáticas de las células (filopodios), así como evidencias de su actividad dorsal.

Tampoco se obtuvieron imágenes de los osteoblastos para las superficies granalladas, tanto con tratamiento termoquímico como sin él, a 3 y 14 días de cultivo.

## 6.5. Discusión

### 6.5.1. Adhesión y proliferación

Los resultados de adhesión de osteoblastos (Tabla 6.II; Figura 6.4) son poco claros, así como contradictorios con respecto a los obtenidos en el Capítulo 3 (Tabla 3.III, Figura 3.5). Después de 24 h de cultivo, se contó un mayor número de osteoblastos adheridos sobre los discos Ctr que sobre todos los otros tipos de sustratos, siendo las diferencias estadísticamente significativas. Este resultado también contradice los resultados de la mayoría de trabajos publicados [ANS00]; [BDL01] y los obtenidos en el Capítulo 3. Además, también a diferencia de los resultados obtenidos en la mayoría de otros estudios [BDL01] como en el Capítulo 3, no se han determinado diferencias estadísticamente significativas entre las muestras lisas y las rugosas (Ti vs AL6, SI6).

Estos resultados tan sorprendentes se pueden atribuir al hecho de que, mientras que en el estudio del Capítulo 3 se llevaron a cabo dos tripsinizaciones de las células, en este estudio se decidió realizar una única tripsinización sobre cada tipo de sustrato a cada tiempo de cultivo. Debido a ello, es probable que no se hayan arrancado todas las células adheridas sobre algunos sustratos y, por lo tanto, el número de osteoblastos contados será significativamente menor en aquellos sustratos que adhieren con mayor fuerza a las células, como por ejemplo, los más rugosos. Con posterioridad a la realización de este estudio, Boyan y col. [BLD01] publicaron las siguientes conclusiones que confirmarían esta hipótesis: “Las células cultivadas sobre titanio liso se sueltan fácilmente del sustrato con una breve exposición a la tripsina, mientras que aquellas células que se han cultivado sobre sustratos rugosos de titanio requirieron un mínimo de dos incubaciones con el enzima; e incluso en estas circunstancias, quedaron algunas células adheridas sobre su superficie [SMD96]”.

No obstante, tampoco sería correcto asumir una relación directa entre un menor recuento de osteoblastos con una mayor fuerza de adhesión de los mismos a la superficie. Es más probable que el número total de osteoblastos medidos sea una ponderación, a priori desconocida, entre el número total de células que realmente hay en la superficie (factor positivo sobre las células contadas) y su fuerza de adhesión al sustrato (factor negativo sobre las células contadas). Que estos dos factores puedan sobreponerse y confundirse, justificaría la falta de tendencias claras en cuanto al comportamiento de adhesión de los osteoblastos, tanto con respecto al cambio de rugosidad y su potencial bioactividad (Ti mayor que AL6 y SI6, pero Ti-Bio menor que SI6-Bio y AL6-Bio), como al tipo de partículas de proyección empleadas en el granallado (SI6 igual a AL6, pero SI6-Bio mayor que AL6-Bio).

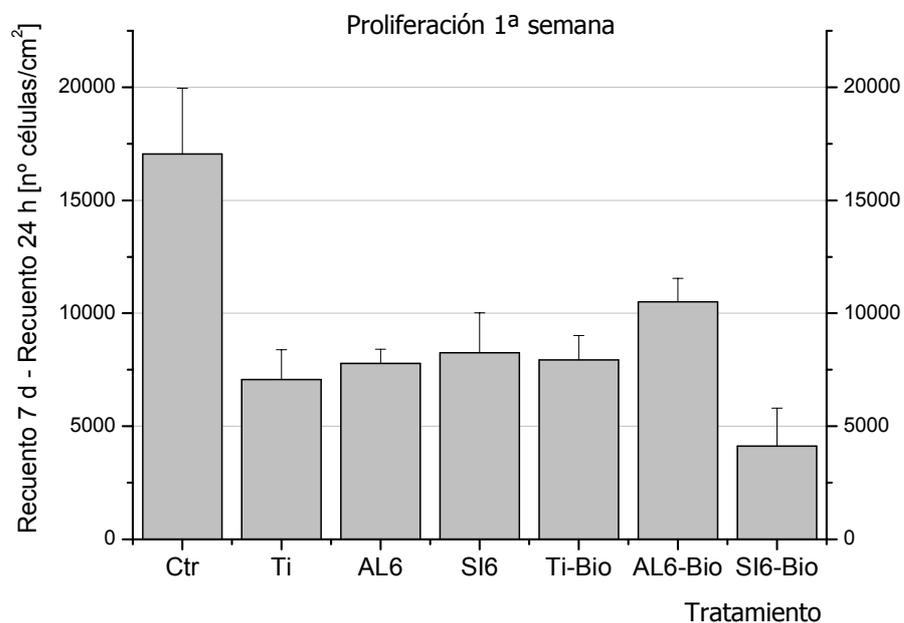
Consecuentemente, realizar una única tripsinización se puede asumir como un error metodológico que, dada la especial trascendencia que tiene sobre la propiedad evaluada, impide extraer conclusiones de los resultados obtenidos.

Los resultados de recuento celular en los siguientes días de cultivo (Tabla 4.III, 4.IV y 4.V), así como las curvas de proliferación (Figura 6.5), también se ven afectados por el mismo inconveniente metodológico. Sin embargo, la influencia sobre los resultados será tanto menor cuanto mayor sea el tiempo de cultivo, al menos comparativamente entre las distintas superficies estudiadas. Esto es así porque una vez todas las superficies se han recubierto por completo de osteoblastos (un número constante para cada tipo de superficie a partir de ese momento), al aumentar el tiempo de cultivo, todos los demás osteoblastos que no están en contacto directo con el sustrato, no se verán influenciados por el efecto de no realizar mayor número de tripsinizaciones, permitiendo que se recuenten en su totalidad. Además, tomando en consideración el método de recuento empleado, al aumentar el número de células arrancadas, contar una célula de más o de menos en los campos de la cámara de Neubauer tiene, comparativamente, una menor significación sobre el valor final de recuento, el cual se obtiene al extrapolar el recuento obtenido de la cámara como número de células/cm<sup>2</sup>.

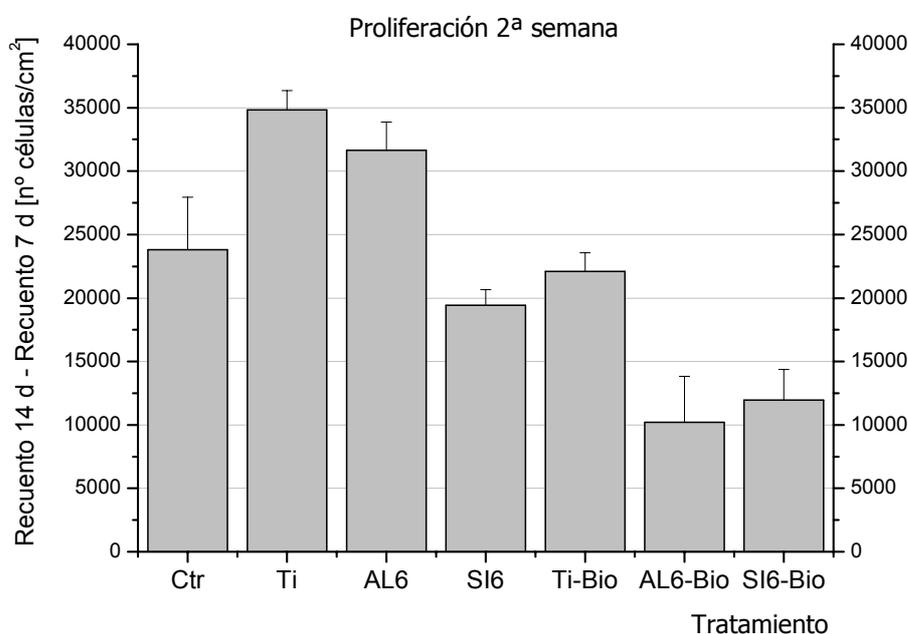
Como consecuencia, mientras que durante la primera semana de cultivo, en la que no se alcanza la confluencia de las células, los resultados obtenidos no muestran diferencias evidentes entre las distintas superficies (Figura 6.17), en la segunda semana ya se aprecian diferencias de proliferación entre ellas (Figura 6.18). El hecho más destacable de estos resultados es que, durante la segunda semana de cultivo, los osteoblastos proliferan menos sobre las superficies rugosas y Bio, que sobre todo el resto de superficies estudiadas. También durante esta segunda semana de cultivo, siendo iguales el resto de tratamientos, las superficies granalladas provocan una menor proliferación que las lisas (este resultado coincide con el de otros autores [ANS00]; [BDL01]), las Bio menor que las que no lo son (tal y como también obtuvieron Maitz y col. [MPM02]), y las granalladas con SiC menor que las granalladas con Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Sin embargo, las conclusiones sobre los resultados de proliferación se deben asociar directamente con los resultados y conclusiones obtenidos para los índices de actividad de FA, es decir, con los de diferenciación celular. Stein y col. [SLM96] concluyeron que, cuando los osteoblastos se comportan de forma adecuada, la proliferación es consecuencia directa de la respuesta de diferenciación, mostrando una relación indirecta entre ambas respuestas. En este estudio, esta correlación se pone de manifiesto con las curvas representadas en las figuras (Figuras 6.19 y 6.20). Al disminuir la proliferación de los osteoblastos sobre los diferentes tipos de superficies, aumenta la diferenciación de los

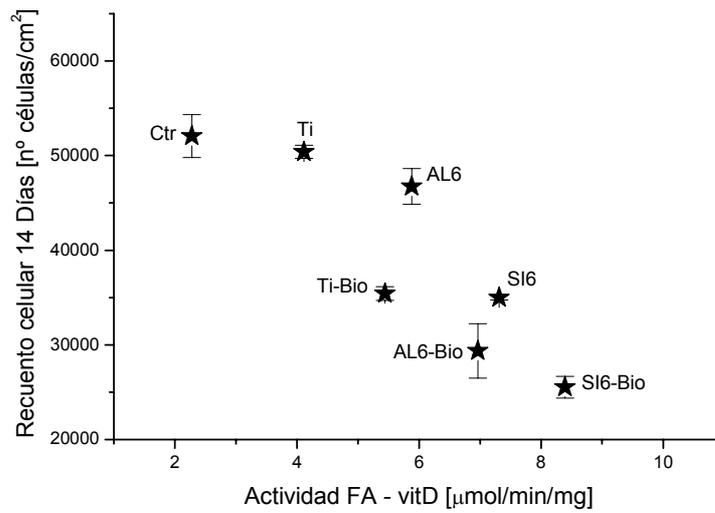
mismos, tanto para las células cultivadas en - vitD como en + vitD. Sólo las superficies Ti-Bio generan una respuesta celular que se aparta de este comportamiento general.



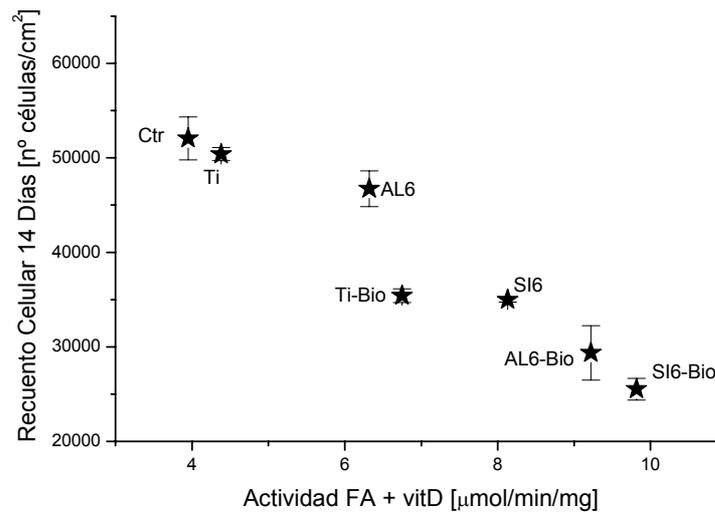
**Figura 6.17** Representación gráfica de los valores de proliferación de osteoblastos sobre las distintas superficies estudiadas, durante la primera semana de cultivo.



**Figura 6.18** Representación gráfica de los valores de proliferación de osteoblastos sobre las distintas superficies estudiadas, durante la segunda semana de cultivo.



**Figura 6.19** Representación gráfica, para todos los tipos de superficies estudiadas, de los valores de proliferación osteoblástica después de 14 días de cultivo vs la diferenciación de estos mismos osteoblastos, tras ser cultivados 72 h adicionales en un medio con ausencia de vitamina D.



**Figura 6.20** Representación gráfica, para todos los tipos de superficies estudiadas, de los valores de proliferación osteoblástica después de 14 días de cultivo vs la diferenciación de estos mismos osteoblastos, tras ser cultivados 72 h adicionales en un medio suplementado con vitamina D.

Este resultado junto con que la proliferación osteoblástica fue continua y creciente a lo largo de los 14 días de cultivo, tal y como evidencian las curvas en (Figura 6.5), demuestran el buen comportamiento de las células sobre todos los tipos de superficies, las cuales, en última instancia, se pueden considerar candidatas para su utilización en implantología dental.

## 6.5.2. Diferenciación

Los resultados de diferenciación, tal y como se ha comentado, ofrecen una relación inversamente proporcional con los de proliferación (Figuras 6.19 y 6.20). Si se comparan los resultados (Tablas 6. VI y 6.VII, Figura 6.6) entre superficies con y sin Bio, con el resto de tratamientos siendo iguales, la actividad de FA es siempre superior en los osteoblastos que fueron cultivados sobre las superficies Bio, lo cual indica la estimulación que estas superficies tienen sobre el desarrollo fenotípico de las células. Este resultado está de acuerdo con las conclusiones de Nishio y col. [NNA00], en cuyo trabajo no sólo encontraron una mayor actividad de FA sobre el metal bioactivo sino también de otros marcadores de la diferenciación como la síntesis de osteocalcina y de colágeno; mientras que la de osteopontina y osteonectina no se vio afectada por el tratamiento termoquímico. Sin embargo, Maitz y col. [MPM02], a pesar de encontrar valores de actividad de FA superiores en discos lisos de Ti c.p. tratados con NaOH, con respecto a los que no lo estaban, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. No obstante, se debe ser crítico con los resultados de estos últimos autores puesto que no reportan ni el número de muestras ensayadas, ni los valores medios obtenidos, ni las desviaciones, ni el método de ensayo estadístico empleado para determinar la significación en las diferencias.

Por otra parte, las diferencias en la actividad de FA sólo fueron estadísticamente significativas al comparar superficies con y sin tratamiento termoquímico, con el resto de tratamientos siendo iguales, sobre las superficies que fueron granalladas y Bio y en + vitD (Tabla 6.VII, Figura 6.6). No sólo esto, además las diferencias de estas superficies, SI6-Bio +D y AL6-Bio +D, son estadísticamente significativas con respecto a todo el resto de superficies estudiadas. Estos resultados indican que se produce un efecto sinérgico en la respuesta de diferenciación entre la rugosidad y la presencia del gel de titanato de sodio en la superficie del Ti c.p. El hecho que las diferencias se intensifiquen cuando los osteoblastos encuentran en el medio el metabolito de la vitamina D, indica que éstas se encuentran en un estado de madurez más avanzado que en el resto de superficies. De acuerdo con Boyan y col. [BLD01], cuando una superficie es rugosa y los osteoblastos se encuentran en un medio con el metabolito  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ , la proliferación de los osteoblastos de la línea MG63 [BBK98] y fetales de rata [LBS00] disminuyen su proliferación, pero el efecto sobre la diferenciación es más intenso. Esto “se correspondería con la hipótesis de que la rugosidad superficial favorece la expresión del fenotipo más maduro y que las células responden a la presencia de  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  en este contexto [BLD01]”. Siguiendo los argumentos de Boyan y col., y teniendo en cuenta que estos autores obtuvieron esta respuesta diferenciada sólo con marcadores de la diferenciación osteoblástica para estados de diferenciación más avanzados, como es la osteocalcina (ver Apartado 3.5), los resultados obtenidos sobre las superficies rugosas y con tratamiento termoquímico para la actividad de FA indican una, aún mayor, influencia

sobre el estado de diferenciación celular, acelerando el desarrollo fenotípico de las células. Dicho de otra manera, las células se comportan sobre estas superficies como si estuviesen más maduras y, por lo tanto, es de esperar una más inmediata mineralización de su matriz extracelular. La formación de esta matriz extracelular es el paso final en la diferenciación de los osteoblastos, y una etapa esencial en la osteointegración de los implantes dentales [DSC02]. Todo ello permite concluir que las superficies rugosas y Bio pueden conseguir la osteointegración a corto plazo más rápido que cualquier otro tipo de superficies de Ti c.p. obtenida y estudiada hasta el momento.

Los comentarios de Lian y col. [LIS92] y Aubin [AUB99] a propósito del papel de la FA en la formación de hueso refuerzan estas conclusiones. Existen evidencias de que la FA está involucrada en el proceso de mineralización [BAH91]; [MDL96]; [WHY96]; y se ha sugerido también que esta molécula regula la proliferación, migración y diferenciación de las células osteoblásticas [HHT93]; [HST96]; así como que puede estar involucrada en la señalización transmembranosa [NYR87]; [TUA91]; [FBS99]. *In vitro*, inmediatamente después de la disminución en la proliferación de los osteoblastos, se refleja un descenso en la síntesis de ADN y en la expresión génica, así como un incremento de un orden de magnitud en la expresión de FA (actividad enzimática y ARN-m), una proteína que, como ya se ha comentado, está asociada con el fenotipo celular óseo. En ese momento, se expresa un gen específico de la diferenciación [SGL89]. Durante este período (desde los 12 a los 18 días) la matriz extracelular sufre una serie de modificaciones en su composición y organización estructural que la convierte en competente para su mineralización. Durante esta fase de maduración de la matriz, cada célula se ha convertido en activa a la FA [SLO90], lo cual está directamente relacionado con el progreso de la mineralización del cultivo. En los cultivos fuertemente mineralizados, los niveles de FA de tipo ARN-m bajan. Por otra parte, *in vivo*, la expresión de los marcadores del fenotipo osteoblástico a lo largo del tiempo, durante la secuencia de desarrollo, es un reflejo de las actividades funcionales necesarias para la formación progresiva del tejido óseo. La expresión de FA (actividad enzimática y ARN-m), previa a la iniciación de la mineralización, sugiere que la FA puede estar involucrada en la preparación de la matriz extracelular para la deposición ordenada de mineral, así como que la co-expresión de otros genes, tales como el de la osteocalcina y la osteopontina, pueden soportar el consecuente progreso en la mineralización de la matriz extracelular. Alternativamente, la inducción de estos genes asociados a la mineralización puede ser un reflejo de la adquisición de propiedades osteoblásticas necesarias para la señalización del crecimiento y la reabsorción del hueso *in vivo*.

Un comentario a parte merece la respuesta de las superficies Si6-Bio, puesto que han mostrado los mayores valores de actividad de FA (Tablas 6.VI y 6.VII), pero, a pesar de poseer el tratamiento termoquímico, no demostraron bioactividad, al menos *in vitro*, tal y

como se determinó en el Capítulo 5. La bioactividad es una propiedad que no sólo es positiva como aceleradora de la osteointegración a corto plazo, sino también mejora la osteointegración a largo plazo, ya que el enlace químico directo que se forma entre la capa de apatita y el hueso neoformado, se supone que incrementará la fuerza de adhesión en la interfaz biomaterial/hueso. Sin embargo, las diferencias en los valores de FA no fueron estadísticamente significativas con respecto a las de AL6-Bio. Por todo ello, en la siguiente fase de este trabajo, se ha preferido continuar el estudio con las superficies AL6-Bio como candidatas óptimas para conseguir una osteointegración rápida y de alta calidad mecánica.

También se han determinado diferencias en la actividad de FA dependiente de la rugosidad de las superficies de Ti c.p. Así, tanto en las superficies Bio como en las que no lo son, los valores de diferenciación para las superficies granalladas son superiores a los de las superficies mecanizadas (Figura 6.6).

Si comparamos sólo las superficies sin tratamiento termoquímico, estos resultados confirman los resultados obtenidos en el Capítulo 3, donde se determinó la misma tendencia y significación en la diferenciación (Tablas 6.VII y 3.IV). Se ha de recordar que el tiempo de cultivo fue inferior y el marcador empleado fue la síntesis de osteocalcina. En consecuencia, el factor biológico ha cambiado en el presente estudio, ampliando los tiempos de cultivo y utilizando un marcador más temprano de la diferenciación. Al comparar los resultados de ambos estudios, el factor estadístico ha sido más significativo. Éste se ha mantenido constante entre los dos estudios, es decir, se han medido cuatro muestras por cada tipo de superficie. Esta conclusión se vería reforzada porque para estas mismas superficies, en los medios sin vitamina D, donde la dispersión de los resultados es menor, las diferencias sí han sido estadísticamente significativas (Tabla 6.VI). No obstante, en el factor biológico, de acuerdo con los comentarios hechos anteriormente, parece claro que la combinación de tiempos de cultivo y marcador elegida en este Capítulo es más conveniente para evaluar la diferenciación de los osteoblastos que los empleados en el Capítulo 3.

También se han obtenido diferencias en los valores de actividad de FA al comparar los resultados sobre superficies granalladas con  $Al_2O_3$  o con SiC (Figura 6.6), de tal manera que la diferenciación de los osteoblastos se ve favorecida sobre las superficies granalladas con SiC. Esas diferencias no fueron estadísticamente significativas, excepto entre Si6-Bio y AL6-Bio en - vitD (Tablas 6.VI y 6.VII), pero refuerzan las conclusiones extraídas del Capítulo 3 puesto que para las superficies sin el tratamiento termoquímico, se obtuvieron los mismos resultados. Este resultado también confirma la conclusión del Capítulo 3 que permitió decidir el tipo de partículas de granallado a emplear en el resto de trabajo de la Tesis Doctoral. Asimismo, es destacable el hecho de que, a pesar de que tanto las muestras de AL6-Bio como las de SI6-Bio tienen el gel de titanato de sodio sobre su superficie, la

presencia de las partículas del granallado parece interaccionar de forma selectiva con los osteoblastos; especialmente porque el tratamiento termoquímico también modifica la morfología superficial de estas partículas, como se determinó en el Capítulo anterior.

Los valores de actividad de FA en los grupos + vitD fueron en todos los casos superiores a los obtenidos en los grupos – vitD, si se comparan en el mismo tipo de superficie (Figura 6.6). Aunque las diferencias no son estadísticamente significativas, este resultado confirma el comportamiento adecuado de los osteoblastos, los cuales se estimulan selectivamente al encontrarse en el medio la vitamina D [BLD01].

De la misma manera que se discutió en el Capítulo 3 de esta Tesis Doctoral, es complicado encontrar las causas de todas estas respuestas diferenciadas en el comportamiento osteoblástico y, en casi todos los casos, se discurre por el terreno de las hipótesis debido al desconocimiento de los mecanismos biológicos exactos que llevan a las células a modificar su comportamiento fisiológico.

Con respecto a la influencia de la rugosidad y de la naturaleza de las partículas sobre la diferenciación de los osteoblastos, todos los comentarios en la discusión del Capítulo 3 son válidos aquí. Recordemos que los cambios topográficos del Ti c.p. con respecto al tamaño y morfología de los osteoblastos, así como los cambios químicos y físicos de la superficie (“contaminación” superficial por parte de las partículas de proyección, incremento de área superficial e introducción de tensiones residuales), son los principales factores que influyen en el comportamiento celular sobre las superficies granalladas. Se ha de añadir que Boyan y col. [BOS99] concluyeron que los cambios en la actividad de la FA, en función de la rugosidad de los sustratos, fueron más variables que los obtenidos con osteocalcina. En algunos estudios [KSH96]; [BBK98] la actividad de la FA se incrementó con el incremento de rugosidad, mientras que en otros estudios [MSH95]; [LBS00] la actividad de la enzima disminuyó. Sin embargo, los mismos autores reconocen no haber tenido suficiente control sobre algunos aspectos metodológicos, lo cual provocó que “no sea claro, si las diferencias se debieron a la presencia de contaminantes sobre la superficie o a la variación en el estado de maduración osteoblástico. Se sabe que la actividad de la FA se incrementa antes de que comience la mineralización y decrece más tarde. Por lo tanto, puede ser que hayamos “cogido” a nuestras células en diferentes estados en la cascada de diferenciación osteoblástica”. En nuestro caso, por ser de fase 2, los osteoblastos humanos empleados estaban en un estado de maduración poco avanzado y, como consecuencia, se confía en que los resultados obtenidos son consecuencia de la influencia que las distintas propiedades de las superficies tienen sobre su diferenciación hasta llevarlos a la etapa de mineralización de la matriz, tal y como se ha comentado anteriormente, de acuerdo a las conclusiones de Lian y col. [LIS92].

Con respecto a la mejora de la diferenciación de los osteoblastos sobre las superficies con el tratamiento termoquímico, las propiedades que pueden tener una especial significación son la gran hidrofilia de estas superficies, es decir, su alta energía superficial y carácter polar, y la presencia masiva de grupos hidroxilo (OH), lo cual está relacionado.

La mayoría de estudios coinciden en que una superficie hidrofílica es beneficiosa para la adhesión, dispersión y diferenciación celular [DRB91]; [KSM92]; [MSM93]; [FMS99]; [RRR99]; [FTD00]; [FWY03]; [LPL03]; [MCG04], mientras que las superficies hidrofóbicas favorecen la proliferación celular [PRJ03]. No obstante, también hay estudios que concluyen que las superficies hidrofóbicas favorecen la adhesión osteoblástica [RAL97]; [ZAG01] e, incluso que no la afectan [KDW90]; pero son los menos y menos concluyentes. La influencia de la hidrofilia de las superficies vendrá mediada por la interacción con las proteínas, siendo las más estudiadas la fibronectina [FVT97]; [MMA98]; [FMS99]; [FTD00]; [VCV00]; [DKL01]; [MVK03]; [RSR04], la vitronectina [FMS99]; [FTD00] y la albúmina [NWP98]; [VCV99]; [ZCL99]; [LSF00]; [DKL01], por estar directamente relacionadas con la adhesión y conformación estructural de la célula una vez adherida al sustrato, lo cual, en última instancia, influenciará otras propiedades celulares como la proliferación y la diferenciación. A pesar de que estos estudios son controvertidos respecto a cual es el tipo de proteína que mayor influencia tiene sobre los distintos comportamientos celulares, todos coinciden en señalar la conveniencia de una superficie hidrofílica. Las superficies tratadas termoquímicamente son fuertemente hidrofílicas, tal y como han demostrado Lim y Oshida [LIO01], lo cual puede ser una primera justificación para su beneficiosa influencia sobre la diferenciación de los osteoblastos. Este carácter polar tan fuerte está probablemente relacionado con la masiva presencia de grupos OH en estas superficies, una vez sumergidas en el medio. A este respecto, Feng y col. [FWY03] en un estudio con titanio, aunque con otro tipo de tratamiento, concluyeron que “la componente polar de la energía superficial influyó de manera más significativa en el comportamiento celular que la componente de dispersión o apolar, lo cual se puede atribuir a que tanto el  $TiO_2$ , como los grupos OH, como los componentes de la membrana celular y del medio de cultivo, son todos polares y, por lo tanto, las células y el titanio interactúan de manera preferente a través de estas componentes polares. Valores superiores de la componente polar de la superficie del Ti c.p. conllevan una mayor energía de interacción y los productos son más estables”. Como consecuencia, cuanto mayor es la rugosidad superficial, mayor es la energía superficial, lo cual, junto con un mayor número de grupos hidroxilos en la superficie, resulta en un mayor número de osteoblastos adheridos y una mayor actividad celular [FWY03]. Este hecho puede justificar parte del efecto acumulativo en la diferenciación de los osteoblastos que se ha observado en nuestro estudio para las superficies granalladas y Bio.

Además, de forma general, se ha demostrado que las superficies hidrofílicas aumentan su carácter hidrofílico al aumentar la rugosidad, mientras que las hidrofóbicas aumentan su hidrofobicidad [BTQ01]. Por esta razón, en las superficies Bio, la rugosidad añadida por el granallado aumentaría las beneficiosas propiedades de la superficie hidrofílica original, pudiendo también justificar los efectos sinérgicos beneficiosos observados en AL6-Bio y Si6-Bio. La disminución de los ángulos de contacto en superficies de Ti c.p. tratado termoquímicamente, al aumentar su rugosidad superficial, también ha sido comprobada por Lim y Oshida [LIO01].

Pero la rugosidad no sólo influirá en este sentido. Si, como se acaba de mencionar, las superficies lisas hidrofóbicas aumentan su carácter hidrofóbico cuando aumenta la rugosidad, y éste fuese el único factor a tener en cuenta respecto al comportamiento celular, las superficies de Ti c.p. granalladas, pero sin Bio, deberían disminuir los valores de adhesión y diferenciación osteoblástica, puesto que el Ti c.p. tiene cierto carácter hidrofóbico. Esto no es así porque en el comportamiento celular no sólo influyen las características físicoquímicas, sino también las topográficas, como se comentó ampliamente en el Capítulo 3. Todo ello se acumula a favor del comportamiento de los osteoblastos sobre las superficies granalladas y Bio, puesto que a los factores beneficiosos de su fuerte carácter hidrofílico se unen los de una topografía rugosa optimizada.

Siguiendo con el análisis de la influencia de la topografía, es destacable que las superficies Bio presentan una rugosidad en el orden submicrométrico que, aunque no es posible detectar con el rugosímetro de punta palpadora, se hace evidente por la observación de las superficies en el ESEM, tal y como se demostró en el Capítulo previo de esta Tesis Doctoral. En principio, esta rugosidad añadida beneficiará al comportamiento celular puesto que es una mayor rugosidad y, por lo dicho anteriormente, una mayor energía superficial e hidrofiliidad. Sin embargo, recordando los resultados del Capítulo 3, la rugosidad en el orden submicrométrico del Ti c.p. granallado y pasivado con HF/HNO<sub>3</sub> (muestras SI6-HF) no era beneficiosa para el comportamiento osteoblástico, ni con respecto a su adhesión ni con respecto a su diferenciación. Ahora podríamos justificar este resultado por el aumento de las propiedades hidrofóbicas que se ha de suponer sobre las superficies de titanio tratadas de la manera referida, ya que su rugosidad aumenta. Como consecuencia, la rugosidad en el orden submicrométrico parece influenciar únicamente por los cambios energéticos superficiales que induce y no por los cambios topográficos. De hecho, ni en las superficies Si6-HF del Capítulo 3, ni en las Si6-Bio y AL6-Bio de este Capítulo, se aprecia que los osteoblastos prefieran adherir sus filopodios sobre puntos de esta rugosidad de escala inferior a la conferida por el granallado. Todo ello también confirmaría las conclusiones del Capítulo 3 acerca de la influencia que en el comportamiento celular tienen los detalles topográficos, sólo para valores cuantitativos entre un mínimo y un máximo.

Finalmente, tal y como comprobaron Nishio y col. [NNA00] y de acuerdo con los procesos descritos en el Capítulo anterior de esta Tesis Doctoral, se producen rápidos cambios en el pH del medio de cultivo cuando se sumergen las muestras Bio. Estos cambios, podrían influir sobre el comportamiento celular a lo largo del tiempo de cultivo. Sin embargo, de acuerdo con [NNA00] no hay influencia y, de hecho, las diferencias en el comportamiento de diferenciación de los osteoblastos, entre las muestras tratadas termoquímicamente y las que no lo estaban, se produjeron justo a partir del momento en que el pH de los medios de cultivo se igualó. En cambio, en un estudio previo, Vrouwenvelder y col. [VGG94] reportaron que ligeros desplazamientos del pH hacia valores básicos, debidos a la disolución *in vitro* de Bioglass<sup>®</sup>, podían crear ambientes favorables para el desarrollo osteoblástico.

Queda por determinar la influencia que en las superficies Bio, tanto *in vitro* como *in vivo*, puede tener el factor competitivo entre, por un lado, la interacción química del sustrato con los fluidos para que se forme la capa de apatita y, por otro, la interacción físicoquímica de ese mismo sustrato que lleva a la adsorción de proteínas. ¿Competen de la misma manera *in vitro* e *in vivo*? ¿Se forma antes la capa de apatita o la capa de proteínas? ¿Interactúan? ¿Se produce reestructuración de las capas a medida que pasa el tiempo? A este respecto, trabajos futuros deben dar respuesta a estas preguntas, puesto que las únicas conclusiones publicadas hasta la fecha son: se ha demostrado que el Ti c.p. liso y Bio forma una capa de apatita *in vivo* [YNK97];[NNK99]; y en un único estudio *in vitro* [MPM02], donde se cultivaron osteoblastos durante 14 días sobre Ti c.p. tratado termoquímicamente, las células se comportaron adecuadamente, pero no se formó ningún tipo de capa de fosfato de calcio sobre la superficie del metal.

### 6.5.3. Morfología celular

El estudio de la morfología osteoblástica para todos los tipos de superficies a todos los tiempos de estudio no se ha podido completar debido a las dificultades metodológicas en la preparación de la muestras para su observación en el ESEM (Ver Apartado 6.4.5).

Debido al desconocimiento previo de cómo podían reaccionar a los distintos posibles adhesivos los osteoblastos sobre los sustratos estudiados, se diseñó el estudio de tal manera que para cada tipo de superficie y tiempo de cultivo, se adhirió una muestra con paraformaldehído (PF) y otra con glutaraldehído (GA).

No fue posible la observación de las células en ninguna de las muestras en que se empleó el GA como fijador, puesto que éstas no se encontraban sobre el sustrato. Ello indica que este adhesivo no es adecuado para este tipo de trabajo.

No obstante, el empleo de PF tampoco garantizó el éxito en la metodología, puesto que sólo se pudieron ver los osteoblastos, o restos de ellos, sobre algunos tipos de superficies y a algunos tiempos de cultivo. En este caso, a pesar de que no se puede descartar el uso del PF, se debe mejorar el resto de condiciones de tratamiento; en concreto la relación entre el tiempo y la temperatura de la fijación. De esta manera, se podrá tener garantía total de que en cualquier condición en que se hallen los osteoblastos sobre las superficies, su visualización será posible. En un estudio previo de Engel y col. [ECC00] se emplearon con éxito las condiciones de fijación con PF empleadas en este trabajo, pero con osteoclastos sobre dentina, lo cual indica que tanto la superficie como el tipo de célula pueden ser significativos en cuanto a la respuesta de fijación y, como consecuencia, encontrar una metodología universal para este tipo de estudios parece inviable.

El hecho de que sólo se hayan obtenido imágenes de osteoblastos a las 24 h (Figuras 6.7 a 6.9) y a los 7 días de implantación (Figuras 6.10 a 6.26), también indica que la adecuación de las condiciones específicas de fijación en el momento de llevarla a cabo son significativas. Es decir, o el método es muy sensible a todas o alguna de las variables de la fijación, u otras variables ocultas también condicionan el resultado final, como por ejemplo, el tiempo de almacenaje a baja temperatura entre la preparación y la observación en el ESEM.

Las ventajas que este método aporta, puesto que permite ahorrar tiempo y permite visualizar las células en un estado cuasibiológico, animan a que, puesto que se ha obtenido un éxito parcial, se siga trabajando en la búsqueda de unas condiciones universales, con mayor reproducibilidad y fiabilidad.

Por último, es interesante estudiar qué tipo de superficies son las que permitieron visualizar osteoblastos sobre ellas. En todos los casos fueron superficies rugosas y, en el caso de los resultados a 24 h de cultivo, sólo aquellas en las que no se ha realizado el tratamiento termoquímico. Esto supone, en una primera aproximación, que los osteoblastos se adhieren con mayor fuerza sobre los sustratos rugosos. Además, indicaría también que las superficies tienen una mayor fuerza de adhesión sin el gel de titanato de sodio. Sin embargo, esta última afirmación es difícil de justificar puesto que las diferencias que existen en la naturaleza química del  $\text{TiO}_2$  y el gel pueden influir de forma determinante sobre la eficacia del fijador.

La mejor adhesión en las muestras rugosas puede ser debida a que las extensiones citoplasmáticas (filopodios) de los osteoblastos se anclan preferentemente en las protuberancias de las superficies rugosas, tal y como ya se describió en el Capítulo 3 de esta Tesis Doctoral. Los detalles de la rugosidad en el orden submicrométrico no son puntos

preferenciales de anclaje de las células sobre las superficies granalladas y Bio, al menos en lo que a los filopodios se refiere, puesto que el orden de magnitud dimensional de estos es claramente superior al de la rugosidad del gel (Figuras 6.14 a 6.16). Sin embargo, hay una gran integración de la superficie de las extensiones celulares sobre las superficies Bio, hasta el punto de que se confunden las unas sobre la otra (Figura 6.16). Esto demuestra la óptima interacción y la afinidad que hay entre el material biológico y el sintético, para este tipo de superficies.

Finalmente, en las imágenes obtenidas después de 7 días de cultivo (Figuras 6.10 a 6.16) los osteoblastos muestran una abundante actividad dorsal, lo que se relaciona con una destacable actividad de desarrollo fenotípico, como también se explicó en el Capítulo 3 de esta Tesis Doctoral. Sin embargo, después de 24 h de cultivo no se aprecian estos signos de la actividad dorsal (Figuras 6.7 a 6.9), confirmando una menor actividad de diferenciación a tiempos más cortos de cultivo, lo cual es lógico puesto que las células tienen una mayor actividad proliferativa. En las muestras sobre las superficies SI6 (Figuras 6.12 y 6.13) la actividad dorsal es superior que en las AL6 (Figuras 6.10 y 6.11), lo cual confirma los resultados cuantitativos obtenidos para la actividad de fosfatas alcalina.



## 6.6. Conclusiones

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

(1) Todas las superficies estudiadas en este Capítulo han demostrado un adecuado comportamiento de adhesión, proliferación y diferenciación celular por lo que ni el tratamiento de granallado (rugosidad y presencia de partículas contaminantes) ni el termoquímico (presencia del gel de titanato de sodio y cambios topográficos en el orden submicrométrico) comprometen la citocompatibilidad del Ti c.p.

(2) El tratamiento termoquímico (Bio) para conseguir que el Ti c.p. sea bioactivo mejora la diferenciación de los osteoblastos humanos *in vitro*, tanto en superficies mecanizadas como granalladas. Esta mejora puede estar principalmente relacionada con el significativo aumento de la hidrofilia de las superficies con el gel de titanato de sodio y su alta densidad de grupos hidroxilos.

(3) El efecto de la conclusión (2) tiene una respuesta sinérgica con la rugosidad del sustrato, optimizada en los Capítulos anteriores de esta Tesis Doctoral. De esta manera, las superficies de Ti c.p. granalladas y tratadas termoquímicamente (Bio) mejoran significativamente la diferenciación de los osteoblastos con respecto a todo el resto de superficies de Ti c.p. estudiadas, sobre todo en los medios de cultivo suplementados con vitamina D. Ello indica un estado celular de maduración más avanzado en su desarrollo fenotípico. Este hecho puede tener un papel predominante en la rápida mineralización de la matriz extracelular y, en consecuencia, se puede esperar una osteointegración a corto plazo más rápida para este tipo de superficies.

(4) Las superficies granalladas con partículas de óxido de aluminio de tamaños entre 425-600  $\mu\text{m}$  ( $R_a \approx 4\text{-}5 \mu\text{m}$ ,  $P_c \approx 65\text{-}80 / \text{cm}$ ) y tratadas termoquímicamente (Bio) son las mejores candidatas para mejorar la osteointegración de los implantes dentales tanto a corto como a largo plazo, de acuerdo con la conclusión anterior y los resultados de los Capítulos previos de esta Tesis Doctoral en que se optimizaron sus propiedades topográficas y se evidenció su bioactividad.

(5) La rugosidad submicrométrica de las superficies de Ti c.p. afecta al comportamiento de los osteoblastos principalmente por los cambios que genera en las propiedades fisicoquímicas en la superficie, siendo los cambios en las propiedades topográficas menos significativos.

(6) Es posible analizar la morfología celular en condiciones cuasibiológicas en el microscopio electrónico de barrido ambiental por medio de una técnica de preparación en

que sólo es necesaria la fijación de los osteoblastos al sustrato sintético. No obstante, es necesario mejorar la metodología de fijación ya que se ha demostrado poco robusta, principalmente en lo que se refiere a su eficacia para todos los tipos de superficies.

## 6.7. Referencias

- [ANS00] Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *biomaterials* 21 (2000) 667-681.
- [AUB99] Aubin JE. Osteogenic cell differentiation. En “Bone Engineering”; ed. Davies JE. em squared Inc., Toronto (1999) p. 19-30.
- [BAH91] Bellows CG, Aubin JE, Heersche JMN. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed *in vitro*. the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *J Bone Mine Res* 14 (1991) 27-40.
- [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  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ . *J Biomed Mater Res* 39 (1998) 77-85.
- [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.
- [BTQ01] Bico J, Tardeux C, Quéré D. Rouge wetting. *Europhys Lett* 55 (2001) 214-220.
- [BLB46] Bessey OA, Lowry OH, Brook MJ. One point colorimetric method of determining alkaline phosphatase in serum of plasma. *J Biol Chem* 164 (1946) 321.
- [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.
- [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.
- [BRA76] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 (1976) 248-254.
- [DKL01] Deligianni DD, Katsala N, Ladas S, Sotiropoulo 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.
- [DRB91] Dekker A, Reitsma K, Beugeling T, Bantjes A, Feijen J, van Aken WG. Adhesion of endothelial cells and adsorption of serum proteins on gas plasma-treated polytetrafluoroethylene. *Biomaterials* 12 (1991) 130-138.
- [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.
- [ECC00] Engel E, Carbonell J, Condomines J, Manero JM, Planell JA, Pérez-Edo L, Rotes D, Nogues X, Mariñoso LL, Diez A, Serrano S. *J Bone Mineral Res* 15 (Suppl 1) (2000) s443-s444.
- [FBS99] Fedde KN, Blair L, Silverstein J. Alkaline phosphatase knock-out mice recapitulate the metabolic and skeletal defects on infantile hypophosphatasia. *J Bone Miner Res* 14 (1999) 2015-2026.

- [FMS99] McFarland CD, Mayer S, Scotchford C, Dalton BA, Steele JG, Downes S. Attachment of cultured human bone cells to novel polymers. *J Biomed Mater Res* 44 (1999) 1-11.
- [FTD00] McFarland CD, Thomas CH, DeFillipis C, Steele JG, Healy KE. Protein adsorption and cell attachment to patterned surfaces. *J Biomed Mater Res* 49 (2000) 200-210.
- [FVT97] François P, Vaudaux P, Taborelli M, Tonetti M, Lew PD, Descouts P. Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium. (II) Adsorption isotherms and biological activity of immobilized fibronectin. *Clin Oral Implants Res* 8 (1997) 217-225.
- [FWY03] Feng B, Weng J, Yang BC, Qu SX, Zhang XD. Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast. *Biomaterials* 24 (2003) 4663-4670.
- [HHT93] Hui M, Hu M, Tenenbaum HC. Changes in cell adhesion and cell proliferation are associated with expression of tissue non-specific alkaline phosphatase. *Cell Tissue Res* 274 (1993) 429-437.
- [HST96] Hui MZ, Shuku B, Tenenbaum HC. Expression of tissue non-specific alkaline phosphatase stimulates differentiated behaviour in specific transformed cell populations. *Anat Rec* 244 (1996) 423-436.
- [KCG04] Keselowski BG, Collard DM, García AJ. Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signalling through changes in integrin binding. *Biomaterials* 25 (2004) 5947-5954.
- [KDW90] Keller JC, Draughn RA, Wightman JP, Dougherty WJ, Meletioud SD. Characterization of sterilized cp Titanium implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* 5 (1990) 360-367.
- [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.
- [KSM92] van Kooten TG, Schakenraad JM, van der Mei HC, Busscher HJ. Influence of substratum wettability on the strength of adhesion of human fibroblasts. *Biomaterials* 13 (1992) 897-904.
- [LAL97] Lampin M, Aroquier-Clerout R, Legris C, Degrange M, Sigot-Luizard F. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. *J Biomed Mater Res* 36 (1997) 99-108.
- [LBS00] Lohmann CH, Bonewald LF, Sisk MA, Sylvia VL; Cochran DL; Dean DD; Boyan BD; Schwartz Z. Maturation state determines the response of osteogenic cells to surface roughness and 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. *J Bone Miner Res* 15 (2000) 1169-1180.
- [LIO01] Lim YL, Oshida Y. Initial contact angle measurements on variously treated dental/medical titanium materials. *Bio-Med Mat Eng* 11 (2001) 325-341.
- [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.
- [LPL03] Lee YJ, Park SJ, Lee WK, Ko JS, Kim HM. MG63 osteoblastic cell adhesion to the hydrophobic surface precoated with recombinant osteopontin fragments. *Biomaterials* 24 (2003) 1059-1066.

- [LSF00] Lima J, Sousa SR, Ferreira A, Barbosa MA. Interactions between calcium, phosphate, and albumin on the surface of titanium. *J Biomed Mater Res* 55 (2000) 45-53.
- [MDL96] Moursi AM, Damski CH, Lull J. Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation. *J Cell Sci* 109 (1996) 1369-1380.
- [MMA98] MacDonald DE, Markovic B, Allen M, Somasundaran P, Boskey AL. Surface analysis of human plasma fibronectin adsorbed to commercially pure titanium materials. *J Biomed Mater Res* 41 (1998) 120-130.
- [MPM02] Maitz MF, Pham MT, Matz W, Reuther H, Steiner G. Promoted calcium-phosphate precipitation from solution on titanium for improved biocompatibility by ion implantation. *Surf Coat Tech* 158-159 (2002) 151-156.
- [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.
- [MSM93] Meyer U, Szulczewski DH, Moller K, Heide H, Jones DB. Attachment kinetics and differentiation of osteoblasts on different biomaterials. *Cell Mater* 3 (1993) 129-140.
- [MVK03] Michael KE, Vernekar VN, Keselowski VG, Meredith JC, Latour Jr R, García AJ. Adsorption-induced conformational changes in fibronectin due to interactions with well-defined surface chemistries. *Langmuir* 19 (2003) 8033-8040.
- [NF S90-702] Matériel Médico-chirurgical. Evaluation *in vitro* de la cytotoxicité des matériaux et dispositifs médicaux. (1988).
- [NNA00] Nishio K, Neo M, Akiyama H, Nishiguchi S, Kim H-M, Kokubo T, Nakamura T. The effect of alkali- and heat-treated titanium and apatite-formed titanium on osteoblastic differentiation of bone marrow cells. *J Biomed Mater Res* 52 (2000) 652-661.
- [NNK99] Nishiguchi S, Nakamura T, Kobayashi M, Kim HM, Miyaji F, Kokubo T. The effect of heat treatment on bone-bonding ability of alkali-treated titanium. *Biomaterials* 20 (1999) 491-500.
- [NYR87] Noda M, Yoon K, Rodan GA, Koppel DE. High lateral mobility of endogenous and transfected alkaline phosphatase: a phosphatidylinositol-anchored membrane protein. *J Cell Biol* 105 (1987) 1671-1677.
- [NWP98] Nanci A, Wuest JD, Peru L, Brunet P, Sharma V, Zalzal S, McKee MD. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J Biomed Mater Res* 40 (1998) 324-335.
- [PRJ03] Ponsonnet L, Reybier K, Jaffrezic N, Comte V, Lagneau C, Lissac M, Martelet C. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. *Mat Sci Eng C* 23 (2003) 551-560.
- [PW-PST] [http://www.proscitech.com.au/catalogue/get\\_frames.htm?s6.asp](http://www.proscitech.com.au/catalogue/get_frames.htm?s6.asp).
- [RRR99] Redey SA, Razzouk S, Rey C, Bernache-Assollant D, Leroy G, Nardin N, Cournot G. Osteoclast adhesion and activity on synthetic hydroxyapatite, carbonated and natural calcium carbonate: relationship to surface energy. *J Biomed Mater Res* 45 (1999) 140-147.

- [RRS04] Rupp F, Scheideler L, Rehbein D, Axmann D, Geis-Gerstorfer J. Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications. *Biomaterials* 25 (2004) 1429-1438.
- [SGL89] Shaloub V, Gerstenfeld LC, Lian JB, Stein JL, Stein GS. Down-regulation of cell growth and cell cycle regulated genes during chick osteoblast differentiation with the reciprocal expression of histone gene variants. *Biochemistry* 28 (1989) 5318-5322.
- [SLO90] Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J* 4 (1990) 3111-3123.
- [SLM96] Stein GS, Lian JB, Montecino M, van Weijnen AJ, Stein JL, Javed A, Zaidi K. Involvement of nuclear architecture in regulating gene expression in bone cells. En "Principles of Bone Biology"; eds. Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. Academic Press, San Diego (1996) pp. 51.
- [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.
- [TUA91] Turksen K, Aubin JE. Positive and negative immunoselection for enrichment of two classes of osteoprogenitor cells. *J Cell Biol* 114 (1991) 373-384.
- [VVCV99] Valagao AP, Catarino A, Vieira BJ, Norde W. Bovine serum albumin adsorption on titania surfaces and its relation to wettability aspects. *J Biomed Mater Res* 46 (1999) 376-381.
- [VVCV00] Valagao AP, Catarina A, Vieira BJ. Calcium phosphate deposition on titanium surfaces in the presence of fibronectin. *J Biomed Mater Res* 49 (2000) 345-352.
- [VGG94] Vrouwenvelder WCA, Groot CG, Groot K. Better histology and biochemistry for osteoblasts cultured on titanium-doped bioactive glass: Bioglass 45S5 compared with iron-, titanium-, fluorine-, and boron-containing bioactive glasses. *Biomaterials* 15 (1994) 97-106.
- [WHY96] Whyte MP. Hypophosphatasia: nature's window on alkaline phosphatase function in man. En "Principles of Bone Biology"; eds. Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. Academic Press, San Diego (1996) pp. 27-40.
- [YNK97] Yan QW, Nakamura T, Kobayashi M, Kim HM, Kokubo T. Bonding of chemically treated titanium implants to bone. *J Biomed Mater Res* 37 (1997) 267-275.
- [ZAG01] Zanchetta P, Guezennec J. Surface thermodynamics of osteoblasts: relation between hydrophobicity and bone biomaterials. *Colloid Surf B: Biointerf* 22 (2001) 301-307.
- [ZCL99] Zeng H, Chittur KK, Lacefeld WR. Analysis of bovine serum albumin adsorption on calcium phosphate and titanium surfaces. *Biomaterials* 20 (1999) 377-384.