

Tesis Doctoral  
Universidad de Granada

**EVALUACIÓN DE LA  
HUMECTABILIDAD Y DE LA  
RUGOSIDAD DE SUPERFICIES DE  
TITANIO CON DIFERENTES  
TRATAMIENTOS Y SU  
RELACIÓN CON LA ADHESIÓN  
CELULAR.**

Giuseppe Maria Marco Mazzaglia

Granada 2006



Trabajo presentado para optar al Título de Doctor Europeo en  
Odontología

D. Giuseppe Maria Marco Mazzaglia  
Licenciado en Odontología

Directores

Juan Ignacio Rosales Leal  
Manuel Vallecillo Capilla  
Departamento de Estomatología  
Universidad de Granada

Miguel Ángel Cabrerizo Vílchez  
Departamento de Física Aplicada  
Universidad de Granada

Granada 2006

# Índice General

## **1. INTRODUCCIÓN 1**

- 1.1. La osteointegración en la implantología dental: perspectiva histórica 1
- 1.2. Los implantes dentales endoóseos 9
- 1.3. Factores que afectan a la osteointegración 13
  - 1.3.1. El material del implante 13
    - 1.3.1.1. Materiales bioinertes y bioactivos 13
    - 1.3.1.2. El titanio en la implantología dental 15
      - 1.3.1.2.1. Biocompatibilidad y osteointegración 16
      - 1.3.1.2.2. Propiedades mecánicas 19
      - 1.3.1.2.3. Resistencia a la corrosión 20
  - 1.3.2. La superficie del implante dental 21
    - 1.3.2.1. Propiedades fisicoquímicas 22
    - 1.3.2.2. Propiedades topográficas 24
  - 1.3.3. Diseño macroscópico y dimensional del implante 24
  - 1.3.4. Estado del hueso receptor 25
  - 1.3.5. Técnica quirúrgica 25
  - 1.3.6. Condiciones de carga del implante 27

## **1.4. Tratamientos de superficie sobre implantes dentales 29**

## **1.5. El hueso 33**

- 1.5.1. Hueso inmaduro y hueso laminar 35
- 1.5.2. Hueso compacto o cortical 36
- 1.5.3. Hueso trabecular o esponjoso 37
- 1.5.4. Interfaz en el tejido óseo 37
- 1.5.5. Líneas cementarias y líneas de reposo 37
- 1.5.6. Periostio y endostio 38

## **1.6. Referencias 41**

## **2. EFECTO DEL GRANALLADO EN LA RUGOSIDAD SUPERFICIAL DEL TI C.P. 49**

### **2.1. Introducción 49**

- 2.1.1. Ámbito 49
- 2.1.2. La topografía superficial y la rugosidad 52
  - 2.1.2.1. Métodos de caracterización de la rugosidad superficial 53
  - 2.1.2.2. Métodos seleccionados para la caracterización de la rugosidad 56
  - 2.1.2.3. Perfilometría de contacto (Rugosímetros) 57
- 2.1.3.
  - 2.1.3.1. Tamaño de las partículas de proyección 60
  - 2.1.3.2. Naturaleza de las partículas de proyección 61

### **2.2. Objetivos 65**

### **2.3. Materiales y Métodos 67**

- 2.3.1. Materiales 67
  - 2.3.1.1. Material base: propiedades y caracterización 67
  - 2.3.1.2. Partículas abrasivas: tipos, propiedades, obtención y tamaño 68
- 2.3.2. Métodos 70
  - 2.3.2.1. Granallado 70
  - 2.3.2.2. Pasivado 71
  - 2.3.2.3. Rugosidad 71



2.3.2.3.1. Evaluación cualitativa	71
2.3.2.3.2. Evaluación cuantitativa	71
2.3.2.4. Distribución de tamaños de partículas	75
2.3.2.5. Composición química superficial	76
2.3.2.6. Porcentaje de rotura de partícula	76
2.3.2.7. Estadística	76
<b>2.4. Resultados</b>	<b>79</b>
2.4.1. Caracterización del Ti c.p.	79
2.4.2. Rugosidad	79
2.4.3. Composición química superficial	93
2.4.4. Distribución de tamaños de partículas	93
2.4.5. Porcentaje de rotura de partícula	95
<b>2.5. Discusión</b>	<b>99</b>
2.5.1. Rugosidad	103
2.5.1.1. Influencia del tamaño de las partículas	103
2.5.1.2. Influencia de la naturaleza de las partículas	106
2.5.1.3. Otras variables con influencia	112
2.5.2. Contaminación superficial	113
<b>2.6. Conclusiones</b>	<b>115</b>
<b>2.7. Referencias</b>	<b>117</b>
<b>3. ADHESIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS SOBRE TI C.P.</b>	<b>125</b>
<b>3.1. Introducción</b>	<b>125</b>
3.1.1. Ámbito	125
3.1.2. Influencia de la composición superficial	127
3.1.2.1. Sustrato-proteínas-células	127
3.1.2.2. Respuesta osteoblástica	129
3.1.3. Estudios <i>in vitro</i> y rugosidad superficial	130
3.1.4. Osteoblastos sobre titanio granallado	131
<b>3.2. Objetivos</b>	<b>137</b>
<b>3.3. Materiales y Métodos</b>	<b>139</b>
3.3.1. Materiales	139
3.3.1.1. Material base y partículas de proyección del granallado	139
3.3.1.2. Células	139
3.3.2. Métodos	140
3.3.2.1. Obtención de los discos	140
3.3.2.2. Adhesión y diferenciación celular	140
3.3.2.2.1. Cultivo	140
3.3.2.2.2. Recuento celular	142
3.3.2.2.3. Citotoxicidad	142
3.3.2.2.4. Proteínas totales	143
3.3.2.2.5. Producción de osteocalcina	143
3.3.2.3. Morfología celular	144
3.3.2.4. Estadística	144
<b>3.4. Resultados</b>	<b>145</b>
3.4.1. Adhesión y citotoxicidad	145
ZR6	147
3.4.2. Diferenciación	148
3.4.3. Morfología celular	149
<b>3.5. Discusión</b>	<b>159</b>

- 3.5.1. Adhesión y citotoxicidad 159
- 3.5.2. Diferenciación 169
- 3.5.3. Morfología celular 174
- 3.5.4. Selección del tratamiento óptimo 175
- 3.5.5. Relación *in vitro-in vivo* 177

### **3.6. Conclusiones 179**

### **3.7. Referencias 181**

## **4. COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO Y DETERMINACIÓN DE LAS TENSIONES RESIDUALES DEL TI C.P. GRANALLADO 191**

### **4.1. Introducción 191**

- 4.1.1. Ámbito 191
- 4.1.2. El titanio y la corrosión en aplicaciones biomédicas 192
- 4.1.3. Tensiones residuales de compresión y fatiga mecánica 193

### **4.2. Objetivos 195**

### **4.3. Materiales y Métodos 197**

- 4.3.1. Materiales 197
  - 4.3.1.1. Material base y partículas de proyección del granallado 197
- 4.3.2. Métodos 197
  - 4.3.2.1. Obtención de los discos: granallado, pasivado y limpieza 197
  - 4.3.2.2. Rugosidad 197
  - 4.3.2.3. Porcentaje de la superficie cubierta de partículas 198
  - 4.3.2.4. Área real 200
  - 4.3.2.5. Técnicas electroquímicas 201
    - 4.3.2.5.1. Condiciones generales de ensayo 201
    - 4.3.2.5.2. Preparación de las muestras 202
    - 4.3.2.5.3. Circuito abierto (E vs t) 203
    - 4.3.2.5.4. Espectroscopía de impedancias (EIS) 204
    - 4.3.2.5.5. Voltametría cíclica (VC) 208
  - 4.3.2.6. Tensiones residuales 208
    - 4.3.2.6.1. Introducción 208
    - 4.3.2.6.2. Fundamentos 210
    - 4.3.2.6.3. Condiciones de ensayo 214
  - 4.3.2.7. Estadística 216

### **4.4. Resultados 219**

- 4.4.1. Rugosidad 219
- 4.4.2. Porcentaje de la superficie cubierta por las partículas 219
- 4.4.3. Área real 220
- 4.4.4. Comportamiento electroquímico 220
  - 4.4.4.1. Circuito abierto 220
  - 4.4.4.2. EIS 221
  - 4.4.4.3. Voltametría cíclica 224
- 4.4.5. Tensiones residuales 226

### **4.5. Discusión 231**

- 4.5.1. Caracterización de la superficie 231
- 4.5.2. Comportamiento electroquímico y tensiones residuales 232
  - 4.5.2.1. Circuito abierto 232
  - 4.5.2.2. EIS 233
  - 4.5.2.3. Voltametría cíclica y tensiones residuales 234

### **4.6. Conclusiones 245**

#### **4.7. Referencias 247**

### **5. DESARROLLO DE UN TRATAMIENTO COMBINADO PARA OBTENER TI C.P. RUGOSO Y BIOACTIVO 255**

#### **5.1. Introducción 255**

5.1.1. Ámbito 255

5.1.2. Superficies rugosas y bioactivas 258

5.1.3. Métodos para la obtención de apatita sobre Ti c.p. por vía química 259

5.1.4. Tratamiento termoquímico de Kokubo y col. 260

5.1.4.1. Prerrequisitos para la formación de la apatita *in vivo* sobre materiales sintéticos. 260

5.1.4.2. Obtención del titanio bioactivo 261

5.1.4.3. Formación de la capa de apatita sobre el titanio bioactivo 263

Índice

#### **5.2. Objetivos 267**

#### **2.3. Materiales y Métodos 269**

5.2.1. Materiales 269

5.2.1.1. Material base y partículas de proyección del granallado 269

5.2.1.2. *Simulated Body Fluid* (SBF) 269

5.2.2. Métodos 270

5.2.2.1. Preparación del SBF 270

5.2.2.2. Obtención de las muestras 270

5.2.2.3. Tratamiento termoquímico 271

5.2.2.4. Obtención *in vitro* de capas de apatita 272

5.2.2.5. Rugosidad 272

5.2.2.6. Difracción de Rayos X 273

5.2.2.7. Microscopía electrónica de barrido ambiental 273

5.2.2.8. Estadística 274

#### **5.3. Resultados 275**

5.3.1. Obtención de capas de hidroxiapatita. Bioactividad. 275

5.3.1.1. Superficies antes de ser sumergidas en SBF 275

5.3.1.2. Superficies después de ser sumergidas en SBF 283

5.3.2. Rugosidad 292

#### **5.4. Discusión 295**

#### **5.5. Conclusiones 303**

#### **5.6. Referencias 305**

### **6. ADHESIÓN, PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS SOBRE TI C.P. RUGOSO Y BIOACTIVO 311**

#### **311**

#### **6.1. Introducción 311**

6.1.1. Ámbito 311

#### **6.2. Objetivos 315**

#### **6.3. Materiales y Métodos 317**

6.3.1. Materiales 317

6.3.1.1. Material base y partículas de proyección del granallado 317

6.3.1.2. Células 317

6.3.2. Métodos 318

6.3.2.1. Obtención de los discos 318

6.3.2.2. Rugosidad 319

6.3.2.3. Adhesión, proliferación y diferenciación celular 319

- 6.3.2.3.1. Cultivo 319
- 6.3.2.3.2. Recuento celular 320
- 6.3.2.3.3. Actividad de la fosfatasa alcalina 321
- 6.3.2.4. Morfología celular 322
- 6.3.2.5. Estadística 322

#### **6.4. Resultados 323**

- 6.4.1. Rugosidad 323
- 6.4.2. Adhesión celular 323
- 6.4.3. Proliferación celular 324
- 6.4.4. Diferenciación celular 326
- 6.4.5. Morfología celular 328

#### **6.5. Discusión 335**

- 6.5.1. Adhesión y proliferación 335
- 6.5.2. Diferenciación 339
- 6.5.3. Morfología celular 345

#### **6.6. Conclusiones 349**

#### **6.7. Referencias 351**

### **7. RESPUESTA *IN VIVO* DE IMPLANTES DENTALES DE TI C.P. RUGOSOS Y BIOACTIVOS 355**

#### **7.1. Introducción 355**

- 7.1.1. Ámbito 355
- 7.1.2. Titanio rugoso y osteointegración 357
- 7.1.3. Recubrimientos bioactivos de Ca-P y osteointegración 358
- 7.1.4. Titanio bioactivo y osteointegración 359

#### **7.2. Objetivo 361**

#### **7.3. Materiales y Métodos 363**

- 7.3.1. Materiales 363
  - 7.3.1.1. Implantes 363
  - 7.3.1.2. Animales 364
- 7.3.2. Métodos 364
  - 7.3.2.1. Obtención de los distintos tipos de superficies 364
  - 7.3.2.2. Técnica quirúrgica 367
    - 7.3.2.2.1. Exodoncia 367
    - 7.3.2.2.2. Colocación de implantes 367
  - 7.3.2.3. Histología 370
    - 7.3.2.3.1. Tiempos de sacrificio 370
    - 7.3.2.3.2. Preparación de los cortes histológicos 370
    - 7.3.2.3.3. Histomorfometría 372
  - 7.3.2.4. Microscopía electrónica 375
  - 7.3.2.5. Estadística 376

#### **7.4. Resultados 377**

- 7.4.1. Implantes fracasados 377
- 7.4.2. Histologías 378
  - 7.4.2.1. Identificación de tejidos 378
  - 7.4.2.2. Evolución con el tiempo de implantación 381
- 7.4.3. Histomorfometría: % Hueso-Implante 385
  - 7.4.3.1. Influencia de la posición del implante 386
  - 7.4.3.2. Influencia del tipo de implante 388
  - 7.4.3.3. Evolución con el tiempo de implantación 391

7.4.4. Bioactividad	393
<b>7.5. Discusión</b>	<b>397</b>
7.5.1. Fracasos	397
7.5.2. Histomorfometría	399
7.5.3. Bioactividad	406
<b>7.6. Conclusiones</b>	<b>409</b>
<b>7.7. Referencias</b>	<b>411</b>
<b>8. ESTUDIOS FUTUROS</b>	<b>419</b>

# Capítulo 1: Introducción

## 1.1 Osteointegración en la implantología dental: perspectiva histórica

La osseointegración fue descrita por el grupo del prof. Branemark (Branemark P.I. et al, 1977). El introdujo este termino específico osseointegración en lugar de osteointegracion. El termino fue primero utilizado por Albrektsson (Albrektsson T. et al, 1981) como directo contacto (al microscopio optico) entre tejido vivo y el implante. También se define como el directo anclaje de un implante por la formación de tejido óseo alrededor del implante sin el crecimiento de tejido fibrotico en la interfase hueso-implante. Desde la definiciones histológicas tienen defectos, principalmente porque tienen una limitada aplicación clínica, otra definición mas bioquimicamente orientada de osteointegración ha sido sugerida: Un proceso por lo cual clínicamente una asintomático fijación rígida de materiales aloplasticos se alcanza, y se mantiene en el hueso durento la carga funcional. (Zarb G. Y Albrektsson T, 1991).

Según la definición de Branemark, la osseointegración se basa en una coexistencia estructural y funcional continua; así como de forma simbiótica, entre un material aloplástico y los tejidos vivos. La osseointegración no es un fenómeno aislado si no dependiente de otros procesos como la osteoinducción y la osteoconducción de los cuales hablaremos ampliamente después.

Por otra parte Schroeder habló de anquilosis funcional de la interfase implante hueso que se forma durante el periodo de cicatrizacion desde cuando se coloca la fijación y durante el periodo post-integración (Schroeder A. et al, 1976).

Mas recientemente han sido descritos tres tipos diferentes de anclaje de los implantes osteointegrados al tejido:

- a) La fibroosseointegración, que es el deposito de tejido fibroso pobremente diferenciado entre el hueso y la superficie del implante. Esta reacción se da a menudo como consecuencia de la preparación traumática del hueso, debido

al sobrecalentamiento por el fresado. Un estudio a largo plazo demuestra que la tasa de éxito a los 10 años es del 50% (Smithloff, 1982).

- b) La integración por medio de un ligamento organizado alrededor del implante, de modo similar a la interfase natural entre diente y hueso. Este tipo solo se había evidenciado experimentalmente en animales (Buser y cols., 1990), aunque recientemente se ha mostrado en humanos que es posible la formación de un ligamento periodontal alrededor del implante cuando éste se inserta cerca de una raíz retenida. Se observó la formación de nuevo cemento depositado sobre la superficie del implante se evidenció el fenómeno de osteointegración (Warrer y cols., 1993).
- c) La osteointegración, definida ha como la aposición directa de hueso en la superficie del implante (Branemark y cols., 1977). Este tipo de anclaje del implante es hoy día la única aceptada y relacionada con el éxito clínico en el largo plazo.

La osseointegración revolucionó y continua a revolucionar la odontología clínica restauradora desde los 80, así como otras disciplinas médicas. Desde entonces, La aplicación de implantes orales osteointegrados ha abierto un nuevo y importante campo de la investigación en la ciencia odontológicas, enfocándose los estudios tanto a la búsqueda de materiales adecuados para tal fin, la modificación de la superficie implantar, como a profundizar en el conocimiento de las células del hueso que se pondrán en íntimo contacto con el implante.

Históricamente, los implantes de titanio se colocaron en primer lugar para restaurar a los pacientes totalmente edéntulos, situación que todavía representa la mayor aplicación de los mismos en la práctica odontológica. Se ha de tener en cuenta que una mandíbula edéntula suele ser una mandíbula con una gran reabsorción ósea y por lo tanto, con un volumen de tejido que, debido a su escasez, dificulta la retención de las prótesis removibles tradicionales, la cual está basada en la interacción mecánica entre la prótesis y los tejidos blandos que recubren la mandíbula.

Posteriormente, los implantes dentales se han empleado para la restauración de edéntulos parciales, ya sean pacientes con falta de piezas individuales o de varias piezas dentales. el uso de implantes dentales puede llevarse a cabo en regiones complicadas,

siempre que las condiciones anatómicas y clínicas lo permitan, como son la zona del hueso pterigoideo y la tuberosidad del maxilar, así como el hueso zigomático (Balshi T.J. et al, 1999; Venturelli A, 1996; Weischer T. et al, 1997).

La sustitución de las piezas dentales con implantes osteointegrados ha permitido que los pacientes total o parcialmente edéntulos mejoren de manera significativa la capacidad para la masticación, el habla, la estética; y por lo tanto, la aceptación desde un punto de vista psicológico del tratamiento. El paciente con prótesis implantosoportadas adecuadamente osteointegradas se siente más seguro en su actividad cotidiana y ve menos deteriorada su imagen estética.

Misch resumió en 12 puntos estas mejoras (Mish C.E, 1995).

1. Mantenimiento del hueso.
2. Dientes con buena posición.
3. Mantenimiento de las dimensiones verticales.
4. Buena oclusión.
5. Cargas oclusales directas.
6. Mayores porcentajes de éxito.
7. Aumento de la fuerza oclusal.
8. Mejor función masticatoria.
9. Mayor estabilidad y retención.
10. Mejor fonética.
11. Mejor percepción de la posición de los dientes y de las fuerzas ejercidas por ellos.
12. Gran mejora de la satisfacción psicológica.

El requisito indispensable para un buen resultado clínico en la terapia con implantes es que se establezca un contacto directo entre hueso y la superficie del implante, esto es que se produzca la osteointegración.

Es necesario el conocimiento amplio de las propiedades fisicoquímicas y topográficas de la superficie del material, permitiendo a su vez el desarrollo de nuevos diseños y procesos tecnológicos encaminados a la optimización de la respuesta tisular (Jones F.H, 2001).



## 1.2 Los implantes dentales endóseos

El implante dental es un material aloplástico, aplicado quirúrgicamente sobre un reborde óseo residual con el objetivo de servir como base o cimiento del dispositivo protésico, se pueden clasificar en función de su forma y/o de su posición. Así, según el criterio de su posición, se pueden dividir en tres subtipos: implantes subperióstios (sobre el hueso), implantes transóseos (a través del hueso) e implantes endoóseos (dentro del hueso). Existe un cuarto tipo constituido por los implantes yuxtaóseos (al lado del hueso). Este tipo de implante, a pesar de que fue el primer tipo desarrollado, no es empleado habitualmente por los odontólogos debido al colapso vascular que provoca en el hueso, pudiéndose considerar un implante en proceso de investigación.

Los implantes subperióstios son estructuras moldeadas y hechas a medida que se alojan por debajo del mucoperiostio; y los implantes transóseos, que sólo se pueden colocar en la parte frontal de la mandíbula inferior, atraviesan por completo el mucoperiostio y el hueso mandibular. Ambos tipos de implantes han obtenido porcentajes de éxito desigual y, de hecho, ya no se emplean en la práctica clínica.

Los implantes dentales endoóseos se pueden clasificar, de acuerdo con su diseño, como implantes de espiga, de aguja, de lámina, de disco y de raíz; y estos últimos tienen a su vez múltiples tipos como son los implantes roscados, cilíndricos, perforados, troncocónicos o varias combinaciones de estas formas. Entre todos ellos, los más empleados en la actualidad son los implantes de raíz del tipo roscado y del tipo cilíndrico, ambos sin perforaciones, ya que para los implantes perforados se ha determinado una peor respuesta (Esposito M. et al, 1998).

Se ha demostrado que se obtienen mejores resultados en la osteointegración de los implantes roscados que en la de los cilíndricos (Predecki P. et al, 1972; Carlsson L. et al, 1986). No en vano, el desarrollo de la aplicación de la osteointegración en la odontología clínica se ha llevado a cabo con implantes dentales de Ti c.p. de tipo roscado. El material más ampliamente empleado para la fabricación de los implantes dentales endoóseos es el Ti c.p., debido a su excelente biocompatibilidad, así como por sus adecuadas propiedades mecánicas. La alta biocompatibilidad es principalmente

debida a su alta resistencia a la corrosión en el medio fisiológico y queda reflejada a través de su capacidad para la osteointegración.

Las superficies de los implantes dentales representan un aspecto de relevancia en el diseño ya que la ingeniería aplicada a las mismas influye de forma significativa en la respuesta de los tejidos circundantes, incluyendo la osteointegración del Ti c.p., tanto a corto como a largo plazo. Las estrategias más utilizadas para mejorar la respuesta tisular consisten en el aumento de la rugosidad (variación de la topografía) o en la aplicación de recubrimientos bioactivos (cambio en las propiedades fisicoquímicas).

### 1.3 Factores que afectan a la osteointegración.

Son seis los factores esenciales, ampliamente aceptados, para conseguir una buena osteointegración. Fueron propuestos por Albrektsson y col. en 1981 y constituyen la base de la buena práctica clínica e ingenieril en la implantología dental:

1. El material del implante.
2. La calidad superficial del implante.
3. El diseño macroscópico y dimensional del implante.
4. El estado del hueso receptor.
5. La técnica quirúrgica.
6. Las condiciones de carga del implante.

Los tres últimos, estado del hueso receptor, técnica quirúrgica y condiciones de carga del implante, son factores propios del control del clínico. Mientras que el diseño, el material y la calidad superficial del implante dental son factores en los que el investigador y el fabricante tienen una influencia significativa.

En el desarrollo del implante es fundamental la colaboración entre las figuras profesionales implicadas: el investigador y el cirujano oral, el cirujano maxilo-facial, sin olvidar el role de relevancia de los fabricantes.

### 1.4 El material del implante

Un biomaterial es un material no vivo utilizado en un aparato médico y concebido para interactuar con sistemas biológicos (Williams D.F, 1987). Así pues, el material con el que se fabrique el implante dental es un biomaterial. No obstante, el

biomaterial elegido para su fabricación deberá satisfacer las diferentes propiedades requeridas para su buen comportamiento a corto y largo plazo, tales como la biocompatibilidad, la resistencia mecánica, la resistencia a la degradación, la conformabilidad, la disponibilidad.

En cualquier caso, el concepto más importante es que el material debe ser biocompatible. Esto significa que la presencia del biomaterial dentro de los tejidos biológicos provoca respuestas bioquímicas que no son perjudiciales ni para dichos tejidos ni para el buen desempeño de las funciones sustitutorias o de reparación del biomaterial. De hecho, la biocompatibilidad se define como la capacidad de un material de ser utilizado en una aplicación específica con una respuesta adecuada del tejido receptor (Williams D.F, 1987).

La respuesta que el biomaterial provoca en el tejido, dando por supuesta su biocompatibilidad, puede tener diferente carácter. Atendiendo a ello se puede definir un material bioinerte como un material que no es tóxico y que no es biológicamente activo; mientras que un material bioactivo es un material que no es tóxico y que sí es biológicamente activo (Williams D.F, 1987).

El material bioinerte durante su vida en servicio no cede ninguna sustancia en cantidades perjudiciales, por lo que no provoca reacciones adversas en el tejido.

El Ti c.p. es generalmente aceptado como un material bioinerte aunque la comparación entre los efectos locales y sistémicos de los implantes metálicos y cerámicos en la integración con el tejido óseo han demostrado que no existe material completamente bioinerte y, las leves reacciones que provoca en el medio biológico y sus adecuadas propiedades mecánicas, son los factores determinantes para que sea el material por excelencia en la selección para la fabricación de los implantes dentales. A este respecto, cabe decir que su magnífica respuesta en el tejido a corto y a largo plazo es debida a las propiedades específicas de su superficie y, es por ello, que los avances más significativos en la mejora de dicha respuesta se están consiguiendo controlando las distintas propiedades asociadas a la calidad superficial.

Lemons (1990) dividió los materiales sintéticos para implantes dentales en tres tipos básicos; metales y aleaciones, cerámica y carbón, y polímeros. Los materiales de

elección para los implantes dentales son el titanio y la aleación titanio-aluminio-vanadio.

El titanio comercialmente puro interacciona previsiblemente con el medio. Es oxidado en contacto con el aire o fluidos del tejido, minimizando así la corrosión. Es un metal de baja densidad, lo que le proporciona una buena relación resistencia-peso, y puede formar aleación exitosamente con el aluminio (6%) y con el vanadio (4%). El aluminio aumenta la resistencia y disminuye el peso del material y el vanadio actúa como un quelante del aluminio, probablemente previniendo la corrosión.

Las superficies de titanio comercialmente puro o de aleación de titanio forman y mantienen una capa de óxido sin aparente corrosión bajo condiciones fisiológicas. Esta capa, relativamente gruesa, determina por sí misma la interacción implante-tejido (Meffert y cols., 1987).

El material bioactivo causa reacciones tisulares favorables, lo que lleva al establecimiento de enlaces químicos directos con los tejidos circundantes. En el pasado hubo dos diferentes tendencias más importantes en cuanto a la elección del biomaterial para la fabricación del implante dental: el Ti c.p. (bioinerte, osteointegración) y este mismo metal recubierto con una capa de hidroxiapatita (bioactivo, biointegración).

El uso de implantes cubiertos de hidroxiapatita o fosfato tricálcico ha sido ampliamente descrito para demostrar que existe un anclaje precoz entre la superficie de éstos y la del hueso, aproximadamente en un mes tras la inserción, y también para evidenciar que la anatomía del tejido blando alrededor del implante es normal, es decir que hay ausencia de migración apical del epitelio de unión y ausencia de inflamación.

En estudios histológicos en perros, a los diez meses de la inserción del implante se muestra una capa de hueso denso lamelar formado sobre la cubierta de hidroxiapatita, alrededor del 90% de la superficie del implante. Los autores informan, en base a experiencias anteriores, que los implantes no cubiertos muestran un porcentaje mucho menor de superficie estrechamente unida al hueso (Kent y cols., 1990).

Algunos implantes utilizaban en el pasado una subestructura de titanio o de aleación de titanio cubierta por una fina capa de cerámica de fosfato cálcico,

hidroxiapatita, o de un plasma rociado del mismo material. Las cubiertas de fosfato tricalcico o hidroxiapatita proporcionaban una superficie bioactiva, promoviendo el crecimiento òseo e induciendo una uniòn directa entre el implante y los tejidos duros. Este fenomeno ha sido llamado “biointegracion”.

El uso de esta clase de material se basa en la premisa que una superficie mas similar a la hidroxiapatita actúa como un andamio para conseguir la respuesta ósea (osseointegración) y de este modo minimiza el periodo de cicatrización a largo plazo requerido para los implantes sin recubrimiento.

Existen hoy día cuatro grupos diferentes de biomateriales utilizados en ciencias biomédicas:

- a) los metales y las aleaciones metálicas, que representan el grupo más usado comercialmente;
- b) los cerámicos, también con amplia aplicación;
- c) los polímeros sintéticos, representados por los derivados de los compuestos de poliuretano, politetrafluoroetilenos, polimetilmetacrilatos;
- d) los materiales naturales.

Los polímeros sintéticos han sido completamente descartados por parte de los fabricantes de sistemas de implante dentario y los últimos por ser utilizados en caso de injerto tisular.

Hasta hoy, en el grupo de los metales y aleaciones metálicas, el titanio comercialmente puro (CP) y la aleación de titanio-aluminio-vanadio (Ti6Al4V) constituyen los elementos con mejor base de investigación científica, para la utilización en implantología.

### 1.5 El titanio en la implantología dental

El uso generalizado del titanio para la fabricación de los implantes dentales es debido a que cumple de forma adecuada, y diferenciada con respecto al resto de biomateriales, con todos los requerimientos que un biomaterial debe cubrir en la implantología dental [BRB98a]: biocompatibilidad, osteointegración, biofuncionalidad (adecuadas propiedades mecánicas), resistencia a la corrosión, procesabilidad y disponibilidad.

El elemento químico titanio con número atómico 22 en la tabla periódica de los elementos, presenta alta resistencia a la tracción común a los metales; bajo peso específico, elevado punto de fusión, módulo de elasticidad compatible con tejidos orgánicos calcificados, y su principal propiedad, excelente resistencia a la corrosión en medio orgánico, debido a la estabilidad química de la capa de óxido formada en la superficie, inmediatamente después de la exposición del metal puro al medio externo. Su módulo de elasticidad es una característica importante como material en implantología ya que se aproxima al del hueso compacto, lo que permite un desempeño mecánico (deformación) similar al del conjunto formado por la pieza metálica y por el tejido calcificado cuando es sometido a las fuerzas fisiológicas de la masticación.

La mayor parte de los sistemas de implantes comercializados actualmente utiliza titanio CP como biomaterial. En Estados Unidos la historia del uso del titanio como material empezó hace 60 años más o menos (Okabe T, Hero H 1995). En 1940, Bothe et al. implantaron titanio en animales de laboratorio y también otros materiales metálicos que fueron utilizados para aplicaciones quirúrgicas. Ellos reportaron que el titanio estaba bien tolerado, aparentemente por su excelente resistencia a la corrosión; estas conclusiones fueron confirmadas sucesivamente en fluidos biológicos por Clarke y Hickman (1953), Beder y Ploger (1959) describen el uso de titanio para implantes intraorales en perros. Linkow (1990) fue pionero en desarrollar implantes de titanio de malla subperiosticos que fueron introducidos en EE.UU. en los primeros años '70.

Aunque en la literatura el titanio (CP) se cita como metal puro, puede clasificarse con diferentes grados, grados establecidos por la American Society for Testing and Materials (ASTM), las especificaciones F67 están relacionadas con el titanio comercialmente puro (ASTM F67-00, 2002) determinan cuatro grados de Ti c.p. para su aplicación médica. Los distintos grados se clasifican en función de la cantidad de elementos intersticiales minoritarios que contiene la aleación de Ti c.p. en cuestión (Tabla 1.1). De esta manera, a medida que aumenta el grado (desde el I hasta el IV) aumenta la cantidad de elementos intersticiales y, con ello, como propiedades más significativas, aumenta la resistencia mecánica y disminuyen la ductilidad y la resistencia a la corrosión (Tabla 1.II).

Tabla 1.1 Composición química [% en peso], según norma ASTM F67-00, para los productos en barra de los cuatro grados de Ti c.p. para aplicaciones biomédicas.

	N máx.	C máx.	H máx.	Fe máx.	O máx.	Ti
Ti c.p. Grado I	0.03	0.10	0.0125	0.20	0.18	Balance
Ti c.p. Grado II	0.03	0.10	0.0125	0.30	0.25	Balance
Ti c.p. Grado III	0.05	0.10	0.0125	0.30	0.35	Balance
Ti c.p. Grado IV	0.05	0.10	0.0125	0.50	0.40	Balance

En este contexto general, el titanio y sus aleaciones, se han empleado tradicionalmente en el campo biomédico, constituyendo junto con los aceros inoxidables y las aleaciones cromo-cobalto, una de las principales familias de metales seleccionadas para la fabricación de implantes, no sólo dentales, sino también maxilofaciales, ortopédicos, cardíacos, cardiovasculares, y otorrinolaringológicos.

El factor fundamental que hace que el Ti c.p. sea el material elegido para la fabricación del implante dental es que con él es posible alcanzar la osteointegración. Ello está directamente vinculado con su excelente biocompatibilidad, la cual a su vez se relaciona con sus adecuadas propiedades mecánicas y alta resistencia a la corrosión. A continuación se repasan todos estos factores.

Tabla 1.2 *Propiedades mecánicas requeridas, según norma ASTM F67-00, para los cuatro grados comerciales de titanio para aplicaciones biomédicas.*

	Resistencia a la tracción mín. [MPa]	Límite elástico al 0.2% mín. [MPa]	Elongación en 4D mín. [%]
Ti c.p. Grado I	240	170	24
Ti c.p. Grado II	345	275	20
Ti c.p. Grado III	450	380	18
Ti c.p. Grado IV	550	483	15

El titanio se considera un material con excelente biocompatibilidad, lo cual le permite llevar a cabo su función de anclaje protésico, a largo plazo, de manera óptima. el Ti c.p., es un material bioinerte y este factor provoca su alta biocompatibilidad y su capacidad para la osteointegración.

La mayoría de los autores coinciden en señalar a la alta resistencia a la corrosión del Ti c.p. como la razón principal por la que el Ti c.p. resulta altamente bioinerte en los tejidos y lo que permite su magnífica osteointegración. Steinemann expone

ampliamente las propiedades y los procesos eléctricos, físicos y químicos asociados a este hecho.

La ausencia de reactividad del Ti c.p. es fundamental en su éxito en la implantología dental y es debida a la presencia de una capa de oxido químicamente estable (llamada también capa pasiva) que protege el metal de la corrosión, la carga moderada de la superficie bajo condiciones fisiológicas de pH, la baja concentración de moléculas cargadas dentro de los productos de disolución, y una constante dieléctrica  $\epsilon$  para el oxido de titanio que es próxima a la del agua. El resultado es que la superficie de titanio no llega a interacciones excesivamente fuertes con proteínas en la matriz extracelular, sin embargo interactúa con las cadenas externas de las moléculas proteicas.

Después de esto los neutrófilos y los macrófagos se relacionan con el implante y en función de la conformación, la orientación y el tipo de proteínas adsorbidas, los macrófagos interactúan con la superficie y segregan un cierto tipo y número de citoquinas (mensajeros biológicos moleculares) que atraen a los fibroblastos produciéndose, en última instancia, la encapsulación del biomaterial con el tejido fibroso (Kasemo B, 2002).

Es fundamental el tipo de interacción que se produce entre las proteínas y la superficie del implante, así como con las células que intervienen en los procesos de curación y remodelación del tejido óseo. La superficie del material regula la respuesta biológica y, en última instancia la calidad de la osteointegración. Las propiedades físicas, químicas y topográficas de la superficie intervienen de forma decisiva en los procesos biológicos (interacción proteica y celular) y las distintas tecnologías aplicadas sobre ella, unidas a sus propiedades intrínsecas son objeto de investigación continua para favorecer la velocidad y la calidad de la respuesta del tejido óseo.

La calidad superficial del implante dental depende de sus propiedades fisicoquímicas y topográficas (Tabla 1.4). Tanto unas como otras son relevantes en el comportamiento biológico del Ti c.p.

Tabla 1.4.: *Propiedades e información necesaria para describir la calidad de la superficie de un implante.*



Propiedad	Tipo de información
Composición química	Composición atómica Estado químico de los elementos
Estructura/ Orden Desorden Morfología	Cristalinidad Inclusiones Vacantes Límites de grano Forma 2D y 3D de los detalles superficiales
Textura Rugosidad Forma Energía superficial	Área específica Porosidad Mojabilidad Adsorción Energía superficial
Eléctrica	Potencial de superficie Cargas superficiales
Mecánica	Elasticidad/ Plasticidad Tensiones residuales

Los primeros eventos que se producen tras la implantación (contacto con la sangre, adsorción de proteínas y otra moléculas biológicas, adhesión celular, etc.) son debidos a la interacción entre el ambiente biológico y la superficie del material sintético. Asimismo, la respuesta de las reacciones biológicas y los caminos particulares que eligen las células y el organismo vivo y, como consecuencia, la secuencia de eventos que llevan a una mejor o peor osteointegración, dependen en fuerte medida de una serie de propiedades superficiales.

Estudios in vivo han demostrado que la habilidad de los materiales de soportar la formación de hueso puede ser aumentada modificando las características superficiales físicas (Cochran D.L. et al, 1998; Cochran D.L. et al, 1996), químicas (Ibnabddjalil M. et al, 1994; Hench L.L. et al, 1998), y biológicas (Yukna R.A. et al, 1998). El fin de estos cambios es promover la migración de las células mesenquimales al implante, mejorar su adhesión y proliferación, y estimular la diferenciación osteoblástica. Mucho de esto depende de la naturaleza de la “biopelícula” que forma sobre la superficie del implante como consecuencia de su composición química, carga de superficie, y energía de superficie (Schwartz Z et al, 1993).

### 1.5 Propiedades fisicoquímicas

El conocimiento de las propiedades fisicoquímicas del Ti c.p. supone el estudio exhaustivo de las propiedades de la capa de óxido de titanio que se forma sobre él de manera natural y espontáneamente, en contacto con el aire y otros medios. Esta capa protege al metal contra el aumento incontrolado de su oxidación, las reacciones químicas y biológicas indeseables, y la corrosión. Como consecuencia, los agentes químicos y biológicos no interaccionan directamente con el metal, sino con esta capa estable de óxido.

Se pueden identificar una serie de diferentes estequiometrías de óxidos de titanio sobre la superficie del Ti c.p. ( $\text{Ti}_3\text{O}$ ,  $\text{Ti}_2\text{O}$ ,  $\text{Ti}_3\text{O}_2$ ,  $\text{TiO}$ ,  $\text{Ti}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Ti}_3\text{O}_5$  y  $\text{TiO}_2$ ), el más estable de ellos es el dióxido de titanio  $\text{TiO}_2$ , con el titanio en su estado de oxidación +IV. Tiene un espesor que va desde 2 a 10 nm ya desde 1 segundo ( $10^{-9}$  sec) después de ser expuesto al aire y constituye una barrera sobre la superficie del metal (Lautenschlager E.P, y Monaghan P, 1993).

Debido al oxígeno cargado negativamente el  $\text{TiO}$  tiene capacidad de cambio iónico y puede ligar los iones calcio cuando se expone a los líquidos biológicos. Es esta una propiedad que comparte con otros materiales que se integran en el hueso como el óxido de silicio, zirconio, aluminio, o hidroxiapatita.

Todos aquellos materiales que tienen una superficie con grupos de oxígeno expuestos. La capacidad de ligar el calcio en las superficies ha sido sugerida como base para la biocompatibilidad del titanio. Recientes estudios demuestran la capacidad por parte de Ca y P de hacer enlaces con la capa de  $\text{TiO}_2$ , lo cual ayuda el proceso de mineralización y osteosíntesis. Una mejor mineralización fue observada en la interfase titanio-hueso en presencia de una capa más espesa de  $\text{TiO}_2$  en contraste con una capa más fina del mismo (Larsson C, 2000). Las proteínas sericas son adsorbidas con el mismo tipo de mecanismo, presumiblemente a través del calcio adsorbido por la superficie, en  $\text{TiO}_2$  y hidroxiapatita (Ellinger J, 1990). La habilidad del  $\text{TiO}_2$  de adsorber macromoléculas ácidas, como albumina y glicosaminoglicanos, aumenta después la adsorción de iones calcio a la superficie, de esa forma cambiará del estado aniónico a catiónico (Bernardi G. y Kawasaki T, 1968; Bernardi G. et al, 1972).

La capa de  $\text{TiO}_2$  además de proteger desde el primer momento la superficie del implante con el tiempo se vuelve más espesa todavía, Mosser demostró que la capa de  $\text{TiO}_2$  de 5 nm formada en el momento de la implantación llegó después de 5 años a 200 nm (Mosser A. et al, 1992).

Las propiedades que rinden tan importante la presencia del  $\text{TiO}_2$  son:

(1) La naturaleza altamente protectora de la capa de óxido, que generalmente sólo tiene

unos pocos nanómetros de grosor, es consecuencia de su integridad natural y su estabilidad química en un amplio rango de pH's, electrolitos y fluidos corporales.

(2) El óxido de titanio superficial se repasa rápidamente después de una pérdida local de pasivación, como por ejemplo por efecto del desgaste mecánico.

(3) La baja solubilidad de los óxidos de titanio hidratados, junto con la aún menor

tendencia a formar compuestos de titanio cargados, son aspectos muy relevantes para la biocompatibilidad del titanio.

(4) Se puede asumir una cierta semejanza fisicoquímica entre la superficie limpia del óxido del titanio y el agua como consecuencia de la extensiva hidroxilación/hidratación del óxido y su moderada hidrofiliidad. Esto conlleva una cierta interacción de la superficie con la cáscara de agua que se forma alrededor de las biomoléculas, como las proteínas.

(5) La constante dieléctrica del óxido es similar a la del agua. Este hecho provoca, tal y como ocurre en los fluidos acuosos, la reducción de los efectos de polarización y el apantallamiento de las fuerzas electrostáticas entre partículas cargadas.

(6) La baja carga eléctrica superficial, debida a que el punto isoeléctrico del óxido de titanio está sólo ligeramente por debajo del pH fisiológico, se cree que reduce el riesgo a que se establezcan interacciones fuertes entre la superficie del titanio y los dominios de carga de las proteínas.

(7) La "habilidad natural" a formar capas de calcio-carbonato-fosfato en la superficie del óxido de titanio a través de procesos específicos de intercambio químico con los constituyentes de los fluidos corporales (sangre, fluido intersticial), genera, después de un algún tiempo *in vivo*, la modificación de la interfaz material sintético/material biológico, por formación de una capa de unos pocos nanómetros de grosor.

### 1.6 Propiedades topográficas

La topografía superficial (rugosidad y textura) puede considerarse la más importante de las propiedades superficiales que influyen en la respuesta del organismo a la presencia del implante.

Es reconocido que, por ejemplo, aumentar la rugosidad del Ti c.p. por encima de la obtenida al ser mecanizado, el implante mejora la respuesta osteoblástica *in vitro* y la fijación mecánica *in vivo*. De hecho, las superficies de los implantes de Ti c.p. comerciales, en la mayoría de los casos, poseen topografías superficiales especialmente diseñadas y manufacturadas atendiendo al conocimiento expreso de que los detalles topográficos, tanto a escala micrométrica como nanométrica, supone un factor de calidad relevante.

### 1.7 Efecto del arenado en la rugosidad superficial del Ti c.p.

Los objetivos principales de los investigadores para la evolución y mejoría de la superficie son miradas a dos objetivos fundamentales:

- (1) Reducir los tiempos de curación. El reto es conseguir estabilidad funcional del implante en el menor tiempo posible gracias a una mejor respuesta del tejido óseo; y
- (2) Posibilitar la colocación de implantes más cortos, es decir, más manejables y para más número de situaciones. Este hecho genera el reto de fabricar implantes con menor superficie, pero capaces de alcanzar una estabilidad mecánica satisfactoria, a largo plazo.

Para la mejora de las prestaciones del implante de acuerdo con estas tendencias de investigación, la principal estrategia seguida es la obtención de superficies rugosas de Ti c.p.

En la actualidad, está ampliamente aceptado que la rugosidad superficial de un implante es un factor determinante de su calidad superficial, cualquiera que sea el material del que esté fabricado o su aplicación (Buser D. et al, 1991).

Los cambios topográficos de la superficie tienen influencia significativa en la cascada de eventos que llevan a la aceptación del mismo por parte del huésped, desde la adsorción de proteínas hasta la mineralización de la matriz extracelular del tejido óseo,

pasando por la adhesión, proliferación y diferenciación, tanto de los osteoblastos como de los osteoclastos.

Todo ello conlleva una mayor rapidez en los procesos de curación y, por lo tanto, una más rápida y biológicamente más eficaz osteointegración (Wennenberg A. et al, 1996).

### 1.8 La topografía superficial y la rugosidad

Todas las superficies contienen irregularidades o asperezas de diferente longitud de onda que se superponen a la forma de la pieza, que definen su topografía y que se pueden dividir en tres categorías: (1) rugosidad, (2) ondulación y (3) error de forma. La rugosidad incluye las irregularidades de corto alcance en el espacio y la textura superficial inherente al proceso de fabricación.

La rugosidad está creada por valles y picos de amplitud variable y espaciado superior a las dimensiones moleculares. La ondulación superficial consiste en irregularidades de la superficie de espaciado superior a la rugosidad; mientras que el error de forma es una desviación grande de la forma de la pieza.

Las técnicas cuantitativas de medida de la rugosidad hacen uso de filtros de corrección de fase, en la mayoría de los casos de tipo Gaussiano, para separar la ondulación y los errores de forma de la rugosidad (Wennenberg A. et al, 1996).

La rugosidad, es el resultado acumulativo de algunos, o todos, de los siguientes factores: la estructura cristalina, el proceso de fabricación, y la ingeniería de superficies aplicada, como puede ser el ataque ácido, el recubrimiento con proyección por plasma o el arenado, por poner algunos de los ejemplos más empleados en implantes dentales.

La rugosidad superficial se puede describir y cuantificar por métodos topográficos y se puede expresar como el resultado de efectuar mediciones sobre el perfil (2D o 3D) de la superficie. Para ello, existen muchas técnicas de caracterización de la rugosidad superficial, algunas de ellas sofisticadas y otras que sólo proveen de una información limitada.

### 1.9 Tamaño de las partículas de proyección.

Sobre el titanio y sus aleaciones para aplicaciones biomédicas se han estudiado tamaños de partículas desde tamaños con unos pocos micrómetros, pasando por los que

se pueden considerar tamaños medios entre 25-75  $\mu\text{m}$ , o mayores, de entre 200 y 600  $\mu\text{m}$ . Los tamaños de partículas seleccionados se clasifican en tres grupos:

(1) Tamaño pequeño. Para partículas abrasivas entre 125 y 300  $\mu\text{m}$ . Estos tamaños son del orden de los mayores utilizados por Wennerberg y Albrektsson en sus estudios (Wenneberg A. et al, 1995; Wenneberg A. et al, 1996).

(2) Tamaño mediano. Para partículas entre 425 y 600  $\mu\text{m}$ . Estos tamaños han de permitir obtener rugosidades medias similares a las que se consiguen cuando se recubre la superficie de un implante por proyección con plasma de titanio o hidroxiapatita (Wong M. et al, 1995).

(3) Tamaño grande. Para partículas entre 1000-1400  $\mu\text{m}$ . Estos tamaños han de permitir alcanzar rugosidades medias aún mayores a las obtenidas con proyección por plasma.

#### 1.10 Naturaleza de las partículas de proyección

Otra variable en la rugosidad es la naturaleza de las partículas, debido a la alta energía en el impacto, algunas de las partículas rompen y partes de ellas quedan encastadas en la superficie del metal sin posibilidad de ser desencastadas ni con la limpieza en ultrasonidos, ni con el tratamiento de pasivado, ni con la esterilización.

En consecuencia, la naturaleza de las partículas seleccionadas para realizar el granallado deben ser suficientemente estables químicamente para que sean inertes en el medio biológico y, por lo tanto, biocompatibles.

Las naturalezas más utilizadas para el granallado de implantes dentales de Ti c.p. son la alúmina y la sílica, es decir, óxidos inertes y abrasivos (Lausmaa J, 2001).

También se debe tener en cuenta la forma de las partículas que se clasifican en partículas con cantos agudos y partículas esféricas estas ultimas son las que mas se utilizan hoy día en la preparación del as superficies.

En nuestro estudio se utilizó para las superficies arenadas particulas esfericas de oxido de aluminio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) de 110 $\mu$ , el más empleado y estudiado (Wennenberg A. et al, 1995; Wennenberg A. et al, 1996), se encuentra con facilidad en el mercado y, al ser un material muy utilizado para la fabricación de múltiples herramientas flexibles de corte rápido, así como material de pulido fino, su precio es de los más bajos dentro del campo de los abrasivos.

Por sus posibles relaciones con enfermedades pulmonares, óseas y cerebrales ha sido criticado por algunos autores (Darvell B.W. et al, 1995) Sin embargo, estas relaciones se han asociado a la cesión de aluminio y no es previsible que desde la alúmina, que es un compuesto muy estable se ceda aluminio al organismo.

#### 1.11 Diseño macroscópico y dimensional del implante

El diseño del implante es importante desde el punto de vista de la transmisión de cargas en el proceso de remodelado y estabilización del hueso receptor. Que esta repartición de cargas sea óptima se traduce en que se podrán alcanzar con éxito los objetivos de mantener la osteointegración a largo plazo.

El diseño del implante es importante desde el punto de vista de la transmisión de cargas en el proceso de remodelado y estabilización del hueso receptor. Que esta repartición de cargas sea óptima se traduce en que se podrán alcanzar con éxito los objetivos de mantener la osteointegración a largo plazo.

Es fundamental para la osteointegración del implante la obtención de su estabilidad primaria, sin embargo, el diseño macroscópico del implante influye en la predicción de cómo se consigue la osteointegración y cómo se mantiene ésta a lo largo del tiempo, soportando cargas funcionales.

Los implantes de tipo roscado que en el pasado se alternaron con los impactados son los preferidos en la implantología dental actual ya que, comparando con los implantes impactados de tipo cilíndrico, ofrecen dos ventajas principales:

1. Las roscas del implante mejoran la estabilidad primaria, la cual es fundamental para evitar micromovimientos indeseables del implante hasta que se consigue la osteointegración.

Esto es importante sobre todo para los implantes no sumergidos o en áreas donde la densidad ósea es baja.

2. Las roscas del implante parecen tener un papel importante en la transferencia de cargas desde el implante hacia el hueso circundante.

En cuanto al diseño, no sólo influye la forma general del implante, sino también su

diámetro, su longitud, así como el paso y la altura de la rosca. Todo ello permite al cirujano adaptarse de la mejor forma a la situación clínica en concreto que deba resolver.

#### 1.12 Tratamientos de superficie sobre implantes dentales

La relación entre las propiedades superficiales del material y la respuesta biológica es una de las cuestiones fundamentales en la investigación de los biomateriales. La modificación de la superficie se ha convertido en una herramienta muy valiosa para llevar a cabo estudios que persiguen el conocimiento de cómo la topografía y las propiedades fisicoquímicas de la superficie influyen en las interacciones del tipo material-biosistema.

Son muchos los tratamientos que se han aplicado sobre el Ti c.p. para aplicaciones biomédicas.

En función de la propiedad superficial que principalmente modifican o, dicho de otro modo, el efecto que persiguen, se distinguen tres grandes grupos: a) la limpieza de la superficie y/o la eliminación de la capa superficial nativa; b) la modificación de la estructura y la topografía (lisa, rugosa, porosa); y c) la modificación de la composición y la estructura de la capa de óxido o la formación controlada de un nuevo recubrimiento en la superficie, en la mayoría de los casos, cambiando el carácter bioinerte del titanio por un material bioactivo. La mayoría de los métodos tienen un efecto principal, pero también tienen influencia sobre otras propiedades de la superficie.

En el pasado se solían clasificar los procesos de texturización de superficie de los implantes osteointegrados en dos grandes grupos: procesos de adición y de sustracción. Los procesos de texturización por adición más comúnmente utilizados por los fabricantes de implantes es el spray de plasma de partículas, realizado con partículas de titanio o hidroxapatita. En este proceso se usa básicamente un dispositivo de aceleración de partículas acoplado a una fuente especial de calor. Partículas minúsculas de polvo de material elegido se expulsan a velocidad ultrasónica y pasan a través de una fuente de calor generada por la ionización de gases por medio de una corriente eléctrica. Se calientan a altas temperaturas, de 20000 hasta 30000° C de acuerdo a la técnica adoptada durante nanosegundos (Sykaras et al. 2000). Después de adquirir velocidad, las partículas intensamente calentadas se chocan contra la superficie del implante y se



solidifican instantáneamente, provocando su deformación definitiva y la consiguiente incorporación a la superficie. En el caso de la técnica de spray de plasma de titanio (TPS), la nueva capa metálica que se obtiene se oxida inmediatamente después de la incorporación, mediante chorro de titanio sobre la superficie del implante.

Este tipo de proceso se ha acantonado progresivamente por otros a causa del desprendimiento de las partículas a medio y largo plazo en el medio biológico.

Los tratamientos más significativos, por ser los más empleados al haber obtenido unos mejores resultados de comportamiento biológico, mecánico, y contra la degradación, para cada uno de los grupos, son: el pulido y la limpieza con disolventes, en el primer caso; el arenado, y el ataque ácido, en el caso de la modificación topográfica; y el ataque alcalino y la proyección por plasma de fosfatos de calcio, para el caso de la modificación de la naturaleza química de la superficie.

Otra clasificación posible y también muy útil para la descripción de los distintos tratamientos, es la que toma como base el carácter fisicoquímico fundamental del tratamiento empleado:

- (1) Métodos mecánicos: desbaste, pulido, mecanizado, y arenado.
- (2) Métodos químicos: limpieza con disolvente, ataque ácido, ataque alcalino, pasivado, anodizado, electropulido.
- (3) Métodos al vacío: descarga lumínica, descarga eléctrica, implantación iónica.
- (4) Métodos de recubrimiento: proyección por plasma, sol-gel, “*magnetron sputtering*”, ablación láser.
- (5) Métodos bioquímicos: enlace de iones y/o moléculas activas por adsorción fisicoquímica, por enlace covalente con o sin espaciador, y por inclusión en materiales que actúan de portadores (Bagno A. y DiBello C, 2004; Lausmaa J, 2001).

### 1.13 Medio biológico

Además de la naturaleza del implante diversos factores contribuyen a que la interacción con el tejido óseo se lleve a cabo, tales como una adecuada densidad celular, la correcta diferenciación de las células y, así como la presencia de determinados factores en el entorno como citoquinas.

#### 1.14 El tejido óseo

La complejidad del hueso como organo es bien conocida desde hace mucho tiempo. Solo con el desarrollo de métodos de estudio de las propiedades de las células óseas en cultivo se han adoptado puntos de vista coherentes sobre la regulación metabólica del hueso.

La formación y reabsorción óseas ocurren durante toda la vida, si bien estos procesos son más rápidos durante el crecimiento esquelético, en el estadio que se denomina modelación, y este estadio es el determinante de la longitud y grosor finales del hueso y del desarrollo de la cavidad medular por resorción del endostio.

El proceso de remodelación, que continúa durante toda la vida adulta, es necesario para mantener la estructura ósea normal y requiere que exista un equilibrio entre formación y resorción. Tras la resorción de una parcela determinada de hueso, como resultado de la acción osteoclastica, ocurre una fase contraria en la que los osteoblastos sintetizan una matriz osteoide, que posteriormente es mineralizada (Martin y cols., 1990).

El acoplamiento entre formación y resorción sugiere que la información necesaria para que exista aposición ósea, por parte de los osteoblastos, resulta de la creación de espacio en el hueso. Por otra parte, la activación de los osteoclastos es el resultado de la acción de mensajeros locales que son producidos por otras células óseas, como los “osteoblasts-like” y algunas células de la médula; estos últimos darán lugar al desarrollo de osteoclastos a partir de precursores mononucleares.

#### 1.15 Estructura macroscópica y microscópica

Todos los huesos están compuestos por dos estructuras arquitectónicas básicas:

- Hueso compacto o cortical
- Hueso trabecular o esponjosa.

El hueso cortical es denso, mientras que el hueso trabecular aparece como un entramado de fibras y láminas, descritas generalmente como trabéculas, separadas por espacios intercomunicados. En los humanos, aproximadamente el 80% de la masa

esquelética está constituida por hueso cortical, que constituye las paredes del eje o diáfisis de los huesos largos. No obstante, dada su tridimensionalidad, el hueso trabecular supone el 60% de la superficie total. Debido a las diferentes densidades de estas dos estructuras, el módulo elástico de ambos tejidos varía. Este hecho puede ser relevante en la fijación y capacidad de los implantes para soportar la carga (Sennerby, 1991).

En cuanto a su maduración, el hueso mineralizado aparece en dos formas: entramado y lamelar. Por lo general, la osteogénesis comienza dando como resultado un hueso en entramado o inmaduro, menos organizado que el hueso lamelar, y en un momento dado es reemplazado por este último. El hueso en entramado se observa durante el crecimiento y en otras condiciones de formación rápida de hueso, como la reparación de fracturas e hiperparatiroidismo. La excepción a esto se da cuando el hueso lamelar es remodelado, en cuyo caso lo hace directamente como hueso lamelar.

La estructura tridimensional del hueso inmaduro es como la de una esponja, con espacios irregulares. En este tipo, los osteocitos o células óseas constituyentes del hueso mineralizado están distribuidos al azar en la matriz, a diferencia de su situación en el hueso lamelar, en el que se disponen a modo de anillos concéntricos formando lamelas. El hueso en entramado o esponjoso es característico del callo de fractura, y su principal característica definitoria la constituye la orientación al azar o plexiforme de sus fibras colágenas.

Las lamelas, o unidades estructurales del hueso maduro o lamelar, son líneas de formación ósea paralelas al eje longitudinal del hueso, según la función que este desempeñe. Estas se disponen alrededor de un canal central (canal de Havers) que contiene vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios. Los osteocitos, agrupados en lagunas, están organizados en capas a lo largo de la lamela. Desde las lacunas osteocíticas se extienden prolongaciones, introducidas en canaliculos, que se dirigen a los osteocitos vecinos. Las lamelas pueden estar organizadas de tres formas diferentes; alrededor de los canales vasculares formando sistemas haversianos, amontonadas unas sobre otras formando pilas y como lamelas intersticiales entre los sistemas haversianos.

## 1.16 La formación del tejido óseo

Existen dos tipos de diferentes tipos de osificación, denominados membranoso y endocondral o endocondral. En la osificación membranosa el hueso mineral se deposita sobre tejido conectivo mesenquimal primitivo. Los huesos de la bóveda del cráneo, la maxila y la mayor parte de la mandíbula pertenecen a este tipo. La osificación endocondral significa que el cartilago de crecimiento es reemplazado por hueso. Los huesos largos, las vertebras, la pelvis y los huesos de la base del cráneo son formados por osificación endocondral.

La formación ósea resulta de una compleja cascada de eventos que incluyen proliferación de células mesenquimales primitivas, su posterior diferenciación a células precursoras osteoblasticas (osteoprogenitoras o preosteoblastos), maduración de osteoblastos, formación de matriz, y finalmente mineralización.

Frecuentemente el término *osteoblasto* se usa para describir a las células responsables de la síntesis y secreción de matriz ósea, o componente orgánico de la matriz extracelular del nuevo hueso, también conocida como osteoide. No obstante la familia osteoblastica también incluye el osteocito y la célula *lining* ósea, también llamada osteocito de superficie, osteoblasto inactivo, célula lineal endostica y célula mesenquimal plana. Esta línea celular probablemente puede diferenciarse a osteoblastos activos, por lo que algunos autores los consideran osteoblastos en reposo (Webster, 1988).

Al final de la secuencia de remodelación, cuando no se requiere más síntesis de matriz ósea, los osteoblastos pierden su capacidad sintética y quedan como osteoblastos inactivos, células de la línea de formación ósea o bien resultan atrapados en el frente de calcificación, incluyéndose en el hueso como osteocitos. Los osteocitos comunican con otros a través de un sistema de canaliculos por donde circulan sus finas prolongaciones citoplasmáticas, y además con los osteoblastos de superficie u osteoblastos inactivos a través de del mismo sistema.

La matriz extracelular está formada en un 90% por colágeno, principalmente tipo I, y en un 10% por proteínas no colagénicas (NCPs). La mayoría de estas proteínas son

proteínas fosforiladas (osteonectina), proteínas que contienen ácido gamma-carboxiglutámico (osteonectina, proteína matriz-gla), proteoglicanos, sialoproteínas (osteopontina) y proteínas séricas. La función y distribución de estas proteínas no es del todo conocida, pero se cree que participan activamente en la mineralización de la matriz (Linde, 1987).

Los cristales de hidroxiapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , constituyen la parte mineral del tejido óseo. Aunque los mecanismos de mineralización aún se debaten, se ha sugerido que la mineralización es iniciada por formación de cristales en vesículas que se forman en la matriz extracelular, a raíz de la desintegración de los osteoblastos. Estas vesículas, de 25 a 250 nm de diámetro contienen una sustancia amorfa, y son responsables de la mineralización en los lugares en los que no existía hueso formado previamente, jugando por tanto un papel en la osificación intramembranosa (Linde, 1987). En otros casos, la mineralización comienza a modo de pequeños núcleos de mineralización sobre la matriz colágena en ausencia de vesículas de matriz extracelular (Arsenault y Ottensmeyer, 1984).

Una vez iniciada ésta se forman núcleos minerales en asociación con las fibras de colágeno, probablemente unidos a determinadas secuencias aminoácidas. Otros autores, por el contrario, han sugerido que los cristales de hidroxiapatita se forman sobre una base de material orgánico, denominándose a este hecho “nucleación heterogénea” o “nucleación secundaria a la existencia de cristales previos”. Según Roberts (1988), aproximadamente el 65% del mineral es producido por osteoblastos y la maduración subsiguiente del hueso es un proceso acelular.

Los osteocitos son las células encargadas de mantener la integridad estructural de la matriz mineralizada. Intervienen además en la liberación o depósito cálcico para el mantenimiento de la homeostasis del calcio en el cuerpo. Esta actividad en la regulación del calcio es controlada directamente por la concentración de este en el plasma e indirectamente por las hormonas paratiroidea (PTH) y calcitonina.

El hueso es remodelado continuamente por unidades de remodelación de hueso. Estas unidades son un grupo de células, entre las que se incluyen osteoclastos, macrófagos, preosteoblastos y osteoblastos, que viajan a través de la cortical o a lo largo

de la superficie trabecular. En el hueso cortical los osteoclastos de la unidad de remodelación forman un tunel de resorción que es inmediatamente ocupado por osteoblastos para formar tejido óseo secundario. La remodelación trabecular se da en la superficie del hueso, pero es similar a la remodelación de la cortical.

Los osteoblastos y los osteocitos también parecen responder a diminutas corrientes piezoeléctricas inducidas por la deformación ósea, incrementando o disminuyendo de forma apropiada la formación local de hueso y promoviendo complementariamente la actividad de los osteoclastos locales por la secreción de factores humorales locales. De este modo, el hueso es remodelado para adaptarse al esfuerzo mecánico al que es sometido.

#### 1.17 La resorción ósea

La resorción ósea es dependiente de la actividad del osteoclasto. Los agentes promotores de ésta producen su efecto incrementando la formación de osteoclastos y activando los ya existentes. La opinión de una resorción ósea resultante de la acción directa de hormonas ha cambiado. Actualmente se considera que existen otras células que, además de factores hormonales y paracrinos, dirigen a los osteoclastos. Esto se basa en la observación que las hormonas responsables de la resorción ósea tienen receptores que claramente responden a células osteoblasticas; sin embargo, no se han encontrado receptores para estas hormonas en los osteoclastos (Chambers y Fuller, 1985).

#### 1.18 La reparación ósea

La reparación ósea que tiene lugar tras un trauma, generalmente ocurre en dos fases; una reparación inicial y una segunda remodelación (Hulth, 1989). Tras el trauma, son liberados distintos mediadores desde el tejido, así como desde los componentes celulares de la sangre. Granulocitos, monocitos y linfocitos migran a la herida acompañados de células mesenquimales pluripotenciales. Estas células producen en el lugar del trauma un exudato con citoquinas y mediadores de la inflamación que reclutan más células inflamatorias y factores de crecimiento. Dependiendo del estímulo, las células migran, proliferan y se diferencian en células endoteliales, fibroblastos, condroblastos y osteoblastos, los cuales producirán vasos y un nuevo tejido conectivo local que reemplazará al coágulo que se origina como consecuencia de la hemorragia

que produce el trauma. Las células con propiedades fagocíticas como los macrófagos digerirán los restos de tejido. Después los condroblastos y los osteoblastos formarán un callo.

La reparación típica de un hueso largo se hace a costa de un callo cartilaginoso, mientras que en los huesos planos se hace a costa de un callo óseo. El callo óseo es formado rápidamente por osteoblastos, dándose lugar a un hueso trabecular inmaduro, que proporciona una base provisional que posteriormente se condensa y modela, hasta ser sustituido por hueso lamelar y remodelado por unidades remodeladoras de hueso.

### 1.19 Las células formadoras de hueso: osteoblastos

El término *osteoblasto* describe una línea de células que cambia sustancialmente sus propiedades en los diferentes estadios de desarrollo o diferenciación. Los osteoblastos totalmente diferenciados sintetizan matriz, que posteriormente es mineralizada. Así, los procesos que concluyen en la formación ósea, incluyen el reclutamiento y la replicación de precursores mesenquimales de osteoblastos, que se encuentran en el periostio y en la médula ósea adyacente a la superficie endosteica, su diferenciación desde preosteoblastos a osteoblastos, y la regulación de su actividad (Heersche y Matsumoto, 1995).

Los osteoblastos, conocidos por su situación en el hueso y por su capacidad para sintetizar matriz osteoide, tienen reconocidas diversas propiedades, como la síntesis de colágeno tipo I (COLL-I), osteonectina, osteopontina (OPN), sialoproteína ósea (BSP), osteocalcina (OCN), y marcada actividad fosfatasa alcalina (ALP); otras propiedades como su respuesta a hormonas (PTH) y factores de crecimiento también son características de esta población. Los cambios en diferentes combinaciones de algunas de las propiedades están relacionadas con los diversos grados de maduración. Así, por ejemplo la síntesis de colágeno tipo I decrece con la maduración, la actividad fosfatasa alcalina disminuye cuando existe cierto grado de mineralización, la osteopontina aparece antes que ciertas proteínas de la matriz como la sialoproteína ósea y la osteocalcina; sin embargo es la sialoproteína la que antes se detecta en osteoblastos diferenciados formando hueso; y la osteocalcina aparece con la mineralización (Figura 1.1).





Según Weyant y Burt (1993), en un estudio realizado en 598 pacientes con un total de 2098 implantes, la tasa de supervivencia específica por implante a los 5,6 años resultó del 89,9%, mientras que la tasa de supervivencia específica por paciente resultó ser del 78,2%.

La probabilidad de fracaso es 1,3 veces mayor en pacientes en los que ya ha sido removido un implante, lo que les induce a pensar que existen factores sistémicos implicados, que afectan la supervivencia de todos los implantes en un paciente dado. En cuanto a los implantes fracasados, el tiempo medio de remoción tras la inserción fue de 292 días. El riesgo de fracaso resultó menor a medida que transcurrió el tiempo desde la inserción.

El fenómeno de integración ósea del implante se basa en el concepto de formación de hueso por autoinducción, descrito por Urist (1965), que injertó matriz ósea diafísal acelular, desvitalizada y descalcificada en 300 animales. Los histiocitos, células gigantes de cuerpo extraño y células inflamatorias de tejido conectivo fueron estimuladas por degradación de los productos de la matriz muerta para repoblar el área del implante, siendo los primeros más numerosos que ninguna otra forma celular. Estos transfieren actividad colagenolítica al sustrato para causar disolución de la matriz. El proceso es seguido inmediatamente por formación de nuevo hueso por autoinducción, en la cual tanto las células inductoras como las inducidas derivan de células en crecimiento del hecho.

La célula inductora es una descendiente de un histiocito móvil; la célula inducida es un histiocito fijo o una célula perivascular de tejido conectivo. La diferenciación de la célula osteoprogenitora tiene lugar por alteraciones locales en los ciclos metabólicos celulares, no del todo conocidos.

#### 1.21 Formas de aumentar la osteointegración

Se han probado diversas posibilidades de incrementar el hueso alrededor del implante. Algunas, como la utilización de la hormona del crecimiento y el sistema adhesivo a la fibrina han obtenido un éxito escaso.

Una inducción acelerada de la osteogénesis con el uso de proteínas precipitadas por etanol procedentes de polvo de hueso de rata desmineralizado. Análisis histológicos y

bioquímicos revelan una secuencia temporal de diferenciación condrogénica, formación de cartílago calcificado, neovascularización, diferenciación osteoblástica, formación ósea, remodelación osteoclastica y desarrollo de médula hematopoyética en 21 días, incluso en ausencia de matriz ósea (Stampata y cols., 1992).

La regeneración tisular guiada (RTG) consiste en la exclusión del epitelio y el tejido conjuntivo de la región de la herida, interponiendo una membrana no reabsorbible o reabsorbible entre el colgajo y la superficie de la herida o la apófisis alveolar. Así que permite la cicatrización y se protege el coágulo de fibrina que aparece, permitiendo una neoformación de cemento radicular, hueso alveolar y fibras del ligamento periodontal con una orientación funcional insertadas en el cemento radicular y hueso alveolar (Pontoriero y cols., 1988). La RTG, usada para reparar defectos óseos creados durante la inserción del implante, llamada regeneración ósea guiada (ROG), ha logrado muy buenos resultados. La eficacia de esta técnica para producir nuevo hueso en áreas edentulas con deficiente o irregular hueso alveolar previamente a la inserción del implante o durante es utilizada rutinariamente en las consultas donde se practica la cirugía oral.

### 1.22 Influencia de los factores sistémicos en la osteointegración

La formación de hueso es un proceso complejo que incluye la migración y proliferación de las células mesenquimales primitivas, la diferenciación de las células precursoras en osteoblastos, maduración de estos, formación de la matriz, y finalmente, mineralización. En el proceso de osificación endocondral existen una serie de pasos intermedios adicionales, como la diferenciación y el crecimiento de los condrocitos, formación y mineralización del cartílago, invasión vascular y resorción de dicho cartílago. La osteogénesis es controlada a múltiples niveles, entre los que se distinguen la diferenciación de osteoblastos, proliferación y formación de la matriz (Reddi, 1982).

Los ciclos secuenciales de formación y resorción del hueso están controlados por factores de crecimiento secretados localmente.

Las citoquinas son polipéptidos sintetizados por células hematológicas o que actúan sobre ellas para regular el crecimiento y la diferenciación celular. Se consideran *factores de crecimiento* las moléculas con la misma actividad, pero que actúan o son sintetizadas por otros tipos celulares.

Las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) son factores reguladores del crecimiento en la extendida familia TGF- $\beta$  que parecen intervenir en la diferenciación osteoblástica.

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) es un importante mitógeno para las células de origen mesenquimal, estimula la proliferación de las células osteoblásticas e incrementa indirectamente la síntesis de colágeno, aunque también ejerce un efecto sobre éste, estimulando su degradación (Canalis y cols., 1989).

Los factores de crecimiento insulín-like, IGF-I (también llamado somatomedina) e IGF-II estimulan la formación de colágeno (McCarthy y cols., 1989).

Además de estos factores existen una gran cantidad de hormonas sistémicas, como la PTH, 1,25(OH)<sub>2</sub>, calcitonina, glucocorticoides, insulina, tiroxina, hormona del crecimiento (HGH) y esteroides gonadales (GH), que intervienen en la formación de hueso.

### 1.23 Estructura y composición de la interfase hueso-implante: Tiempos de la osseointegración

En un estudio realizado sobre 61 conejos Nueva Zelanda (Sennerby, 1992), se analiza la respuesta del tejido óseo de 3 a 180 días después de la inserción en la tibia por medio de morfometría, escáner y microscopía electrónica de transmisión. Inicialmente la inserción del implante causa una hemorragia y un hematoma a lo largo de la línea de interfase entre implante y hueso. La respuesta celular puede evidenciarse a los 3 días: células mesenquimales se orientan a lo largo de la superficie de la médula ósea cortada y también pueden visualizarse macrófagos y células multinucleares gigantes. La formación de nuevo hueso comienza a partir del día 7 después de la inserción, y se localiza junto a la superficie endosteal. El día 14 aparece hueso trabecular en la superficie periosteal. Al mismo tiempo se ponen en marcha los mecanismos de remodelación del hueso original, en forma de conos de propagación perpendiculares al implante. El día 28 el hueso trabecular formado en el periostio cubre completamente la superficie del implante; el número de células mesenquimales disminuye y los osteoblastos pasan a ser el tipo de célula predominante en el tejido de interfase.

Una porción de las células epiteliales adyacentes al implante de titanio pueden constituir una especie de anclaje hemidesmosomial a la superficie del implante similar a la que se forma alrededor del diente natural (Donley y cols., 1991).

Existen dos tipos de interfase descritas con los implantes de titanio; la interfase perimucosal entre implante y tejido blando y la interfase endoòsea en la que el hueso alveolar contacta con el implante. Para la obtención de esta interfase varios procesos se producen desde que la superficie entra en contacto con el tejido óseo.

Cuando se coloca un implante, su primer encuentro con el bio-ambiente es totalmente caracterizado por el contacto con moléculas de agua. Estas ligan rápidamente la superficie y forman una capa mono o bivalente la cual estructura es muy diferente de la del agua líquida (Vogler, 1998). La colocación específica de las moléculas de agua en la superficie es susceptible del número atómico de las componentes de la misma.

En superficies muy reactivas, las moléculas de H<sub>2</sub>O pueden formar una superficie hidroxilada (terminaciones OH).

En un segundo tipo de superficie liga las moléculas de H<sub>2</sub>O fuertemente, pero aún, moléculas no disociadas. Ambas dos superficies son hidrofílicas, superficies humectables. En un tercer tipo de superficie, el enlace H<sub>2</sub>O-superficie es más débil, este es el tipo de superficie no humectable o hidrofóbica.

Los conceptos de hidrofobicidad y hidrofílicidad son directamente relacionados con la fuerzas de enlace del agua a la superficie a una escala molecular, que sucesivamente es reflejada en el ángulo de contacto por gotas de agua.

Cuando el revestimiento de agua se ha formado (dentro de nanosegundos), iones Cl<sup>-</sup> y Na<sup>+</sup>, entran en la capa intermedia y son incorporadas en el revestimiento de agua como iones hidratos. El orden específico de estos iones, y su cáscara de agua, esta influenciada por las propiedades de la superficie.

Aún más, las biomoléculas en el biolíquido circundante el implante alcanza la superficie y entra en una compleja serie de eventos, incluso la adsorción inicial, a lo mejor cambios conformacionales, denaturización y/o reposición de la sí llamado efecto “efecto Vroman”, cuando (típicamente) las proteínas más pequeñas son con el tiempo remplazadas por proteínas más grandes.

Desde entonces existen muchas proteínas diferentes en el biolíquido, la composición de la capa proteica será una mezcla de las proteínas que llegan precozmente y aquellas que llegan después pero tienen un enlace más fuerte con la superficie.

Un importante aspecto que hay que subrayar es que las diferentes superficies proveen oportunidades diferentes para los enlaces de superficie (Norde W, 1996; Hlady V y Buijs J, 1996). Así, la mezcla de proteínas en la superficie y las del estado conformación serán diferentes dependiendo de la conformación original de la superficie. En superficies muy hidrofílicas, es más probable que los enlaces proteicos con sus áreas hidrofílicas ligan la superficie, mientras que en superficies muy hidrofóbicas, las proteínas producen enlaces con sus segmentos hidrofóbicos más estrechos a la superficie, y sin intervención de moléculas de agua.

Cuando la capa de proteínas se ha formado (probablemente nunca totalmente estática, sin embargo cambia lentamente en composición y estado conformacional, desde la composición de la parte exterior del biolíquido las células aparecen en el escenario. Son agregados biológicos de 100 a 10000 veces más largos que las proteínas y enormemente más complejas de las proteínas en estructura y función. Estas interactúan con la superficie cubierta de proteínas, a través de las extensiones celulares, a través de la membrana, a través de los receptores de membrana proteínas-receptor.

La especificidad de la interacción superficie-proteínas se encuentra en menor parte, de cómo la capa proteica está compuesta y organizada, dependiendo de cómo la superficie liga agua, iones, y diferentes biomoléculas.

Otro importante mecanismo con el cual la superficie puede afectar a las células, y consecuentemente el tejido, es si la superficie relaja iones o moléculas que pueden penetrar la membrana celular o activar los receptores.

Estos estímulos pueden ser de naturaleza inorgánica como es el caso de los iones  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{PO}_4^-$  desde el calcio fosfato, o más complejas moléculas orgánicas, como pueden ser hormonas de crecimiento o enzimas. Estímulos negativos pueden ser la corrosión producida que puede ser alérgica.

El tercer importante factor puede ser que las interacciones proteínas-superficie y células superficie son influenciadas por la microtopografía de la superficie. Superficies curvadas, protrusiones, picos, cavidades, que tienen medidas y radios de curvatura comparable con aquellos de entidades biológicas (Proteínas 1-10 nm, células 1-100  $\mu\text{m}$ ).

En la cicatrización periimplantar la población celular osteogénica proviene de la médula- incluyendo pericytos vasculares, células stromales, células mesenquimales indiferenciadas, y en menor grado, osteocitos y osteoblastos que pueden migrar desde las nuevas superficies óseas. La población celular osteogénica migra a través del andamio temporal creado por el extravaso y la sangre coagulada.

La cicatrización endoósea consta de tres fases: la osteoconducción, la formación de hueso *de novo*, y la remodelación ósea. El primero de estos 3 fenómenos la osteoconducción incluye la migración de potenciales células osteogénicas al sitio de la futura matriz a la superficie del implante. El segundo, la formación de hueso *de novo* en el implante es la así dicha osteogénesis de contacto. La hemorragia causada por los procedimientos de implantación produce la formación del coágulo de sangre o hematoma que comprende predominantemente eritrocitos y plaquetas.

Normalmente el coágulo dura pocos días pero puede llegar a superar las dos semanas. Sucesivamente se desarrolla el coágulo de fibrina. Además de la formación del coágulo, dos posteriores mecanismos contribuyen a la hemostasis. El primero, la vasoconstricción a nivel del punto de ruptura de los vasos que limita la cantidad de sangre entrante en el tejido traumatizado.

El segundo, la retracción del coágulo condensa el tapón hemostático y reduce el sitio de la herida. La retracción es causada por la acción de las fuerzas de tracción debidas a las plaquetas activadas presentes en la condensación de la fibrina en el coágulo.

Estos estadios precoces pueden tener mucha importancia en la cicatrización periimplantaria por 3 motivos. Primero, hay que considerar que los componentes orgánicos que interactúan con el material implantado son las proteínas y otras macromoléculas más bien que células. Las células que sucesivamente interactuarán con

la capa de proteínas que se han adherido a la superficie del implante, mas que con la superficie directamente. Segundo, se ha demostrado que la liberación de citokinas y factores de crecimiento desde la plaquetas degranuladas en el coagulo sanguíneo tiene un afecto estimulante sobre la regeneración de fractura ósea (Einhorn T.A et al, 1991). Tercero, el tipo de superficie del implante podría tener un importante efecto en los estadios precoces de las reacciones de las células sanguíneas. Kanagaraja et al, Nygren et al, Hong et al, demostraron que la rugosidad del substrato influencia el numero, el grado de activación, de las plaquetas, y la aglomeración de células rojas de la sangre es una función de la topografía de la superficie del substrato.

En el hueso el daño infligido provoca en la parte final de los canales de Volkmann la cesación de la circulación en la parte final rota del os fragmentos causa isquémia y necrosis. La necrosis es causada por la perdida de oxigeno remediata por los osteocitos. La necrosis es un complejo fenómeno que consta de mecanismos de feedback entre los muchos de factores de señales, mitogenicos, y quimioattractivos, y es el prelude a la demolición del coagulo por los leucocitos. La diapédesis de los leucocitos en el coagulo de los vasos post-capilares es causado por factores de adhesión de las células inflamatorias a las células endoteliales (Leukotrienes), y chemioattractivos, como el PDGF y el TGF- $\beta$ . Muchos de estos factores son liberados por las plaquetas activadas y las células endoteliales así como los mismos leucocitos.

Inicialmente los neutrofilos son mas numerosos que los macrófagos pero rápidamente los macrófagos predominan. Los dos tipos de células son inicialmente envueltos en el coagulo y en la demolición del tejido necrótico a través de los dos mecanismos de la digestión fagocítica intracelular y extracelular. Los macrófagos pueden tener un importante role en el desarrollo de la interfase (Thomsen P, Erikson L.E, 1991).

#### 1.24 Formación del tejido de granulación

La formación de tejido de granulación tarda normalmente tres semanas, la abundancia de capilares, que llega a mas del 60% de la masa del tejido de granulación, da al tejido su peculiar apariencia granular.

Los macrófagos son atraídos al centro de la herida (sitio de implantación), los eventos vasculares como el drenaje por metabolitos y los productos de degradación. La

necesidad de oxígeno supera la cantidad disponible dentro del coágulo donde todavía no ha sido establecida un flujo suplente, produciéndose así un ambiente hipóxico.

El metabolismo anaeróbico se manifiesta en un incremento local de la concentración de lactato. Además la demolición de tejido necrótico por macrófagos lleva a la liberación de mucopolisacáridos ácidos provenientes del tejido necrótico mismo y enzimas lisosomiales de las células que han sido degradadas. Esto, junto con la alta concentración de lactato baja el pH. Una disminución en el gradiente de oxígeno hacia el centro de la herida produce una señal quimiotática para las células endoteliales y mesenquimatosas (Arnold F. y West D.C, 1991).

La angiogénesis empieza fundamentalmente desde la vénulas, donde las células endoteliales degradan la base subendotelial de la membrana y migran y proliferan para formar nuevos capilares huecos. Además las puntas de estos nuevos capilares migrados a lo largo del gradiente quimiotático hacia el centro de la herida, existen diferentes tipos de contactos entre capilares que llevan a la formación de anastomosis. Finalmente, las células fibroblásticas secretan una matriz reticular que provee al soporte mecánico por el creciente sistema vascular.

La aposición directa de hueso a la superficie implantaria o osteogénesis de contacto es el efecto clínico deseable en la cicatrización periimplantaria porque provee a la necesaria estabilidad del implante para permitir funciones de carga. La osteogénesis de contacto es gobernada por dinámicas histológicas de la cicatrización perimplantar que permite la osteoconducción, y por la formación *de novo* de hueso en la superficie del implante.

Durante la formación de hueso *de novo* a la superficie sólida, las células osteogénicas producen una matriz lineal de cemento (cement-line), de aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  de espesor. A nivel ultraestructural, esta matriz interfacial exhibe una morfología heterogénea y consta de varios componentes orgánicos e inorgánicos. El contenido inorgánico es por mayoría compuesto por calcio y fósforo, incluyendo hidroxiapatita, mientras que los componentes orgánicos son proteoglicanos y glicoproteínas.



La evidencia apunta a la osteopontina como mayor glicoproteína de la matriz de cemento (cement-line), subrayando la potencial importancia de la osteopontina en la elaboración de la matriz interfacial. Esta matriz está formada por células de un fenotipo osteogénico especializado previo a la expresión de la sialoproteína ósea en el hueso. Estas células requieren ácido ascórbico para expresar plenamente su fenotipo osteogénico, que incluye la formación de matriz de colágeno.

Que esta matriz interfazial además forme a las superficies del implante durante la osteogénesis de contacto, indica que la matriz podría tener un rol de pivote en el fenómeno del enlace del hueso al implante.

### 1.25 Osteoconducción

La osteoconducción es la infiltración de nuevos capilares a lo largo de tejido óseo nuevo desde el lecho del implante hacia y por dentro de la zona (Einhorn T.A, 1995), lo cual implica una migración de células osteogénicas.

El hueso inmaduro o lamelar que sea comienza a crecer encima del hueso reabsorbido. La matriz ósea no tiene una capacidad intrínseca de crecer o de inducir el crecimiento. Por lo tanto, una vez formada esta matriz no se mueve hacia el tejido biológico circundante. Así que aquello que invade la cámara de hueso o extendiendo por encima de la superficie del hueso reabsorbido (o del implante), es una población de células osteogénicas migratorias.

Una vez que estas células inician la formación de matriz ósea, paran de migrar, secretan la matriz del hueso, pero son distintas de la población de células osteogénicas migratorias.

El crecimiento invasivo de hueso en una zona de cicatrización endosea es el resultado de una migración celular osteogénica y reclutamiento antes de la formación del hueso. La osteoconducción a lo largo de la superficie del implante solo puede ocurrir cuando el frente de células migratorias alcanza la superficie implantar.

En la migración celular hay una estrecha relación entre la célula, su substrato y el citoesqueleto. La célula desarrolla una protrusión de su eje principal formando un lamelopodio. Después de la formación y la fijación del lamelopodio, las células utilizan

interacciones adhesivas para las tracciones y energías necesarias para el movimiento celular. El último paso del ciclo migratorio es la formación de adhesiones en la parte de atrás de la célula seguida por su despegamiento y retracción.

Se ha visto que la integrina está relacionada en la migración celular (Wu C.Y. et al, 1995). También existen proteínas en la matriz extracelular con actividad anti adhesiva que juegan un rol en la migración celular: tenascina, trombospondina, laminina, mucina, proteoglicanos (Chiquet-Ehrismann R, 1995).

La matriz ósea podrá después colocarse debajo, encima de la superficie ósea, llegando a la continuidad entre la espículas óseas previamente formadas y el hueso en la superficie ósea.

La migración celular es la fase más importante de la osteoconducción por dos razones. Primero la migración celular está relacionada con la contracción de la herida durante la fase de cicatrización y tiene importantes implicaciones con respecto a la retención del coágulo en la superficie del implante. Segundo, las células que migran no son osteoblastos (que son maduros, polarizados, y células que secretan matriz), si no células de potencial osteogénico. Así que la osteoconducción siempre precede el fenómeno de la formación de hueso “de novo” por células semejantes.

#### 1.26 Proteínas relacionadas con la adhesión celular

Las proteínas de la matriz extracelular tienen un rol fundamental en la adhesión de los osteoblastos en la superficie implantar. La matriz extracelular del hueso está compuesta por el 90% de proteínas colágenicas (colágeno tipo I 97% y colágeno tipo V 3%) y 10% proteínas no colágenicas (osteocalcina 20%, osteonectina 20%, sialoproteínas óseas 12%, proteoglicanos 10%, osteopontina, fibronectina, factores de crecimiento, proteínas óseas morfogenéticas, etc). Todas estas proteínas están sintetizadas por el hueso.

En el pasado se habló de la adhesión empíricamente, haciendo mención de una serie de macromoléculas capaces de promover el anclaje de las células, y posteriormente éstas fueron aisladas en diversos grados de pureza y caracterizadas como fibronectina, laminina, epibolina, epinectina y vibronectina.

Recientemente se aisló el tripeptido arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) (Ruoslati, 1987). Las secuencias de RGD son reconocidas por receptores de la superficie celular, sobre todo por integrinas, que son proteínas eterodiméricas. Las integrinas pueden reconocer sólo una simple proteína que contenga el peptido RGD. Así, células diferentes con diferentes integrinas pueden enlazar específicamente a diferentes proteínas RGD.

La posible aplicación práctica de esta información puede ser la utilización de biomateriales de recubrimiento con sustancias que promuevan el anclaje de una población celular deseada a expensas de otras o bien el anclaje celular no específico por incorporación de peptidos con la secuencia RGD en polímeros de la superficie de los implantes.

Por contener Arg-Gly-Asp y secuencias poliacídicas, la osteopontina y la sialoproteína ósea se consideran jugar un rol clave en la adhesión celular y en el enlace mineral (Butler W.T, Ritchie H, 1995; Gorski J.P, 1998). Se ha postulado que esta zona interfacial ofrece un mecanismo de enlace entre el tejido duro del organismo y el biomaterial, sin embargo la debilidad intrínseca de las líneas celulares va en contra de esta posibilidad (Brunski J, 1999).

Algunas de las proteínas óseas tienen propiedades quimiotáticas y de adhesión, porque notoriamente contienen una secuencia Arg-Gly-Asp que es específica en la fijación de receptores de la membrana celular como integrinas (fibronectina, osteopontina, sialoproteína ósea, trombospondina, colágeno tipo I, vitronectina), (Grzesik W.J, Robey P.G, 1994).

Recientes estudios de inmunocitoquímica demuestran que la capa interfacial electrónica densa contiene muchos glicosaminoglicanos (Linder L, 1985), en especial manera la osteopontina y la sialoproteína ósea así como proteínas plasmáticas, como  $\alpha_2$  glicoproteína HS (Nancy A. et al, 1998; Ayukawa Y. et al, 1998).

Estudios demuestran el rol de la osteopontina como proteína predominante de las glicoproteínas *in vitro* (30) y *in vivo* (31), mientras se ha visto en cultivos de hueso la restringida presencia de sialoproteína ósea (26, 29). La ausencia o la penuria de

proteínas sericas, como la albumina, indica una deposición selectiva de moléculas en la interfase (Nancy A. et al, 1998).

La formación de hueso en la región periimplantaria va en dos direcciones: no solo hacia el biomaterial si no hacia el mismo tejido óseo.

En experimentos que consisten en cultivar células óseas en discos recubiertos con proteínas de matriz extracelular, se ha visto que los osteoblastos humanos adhieren preferentemente a la fibronectina respecto al colágeno tipo I, IV, la vitronectina pero débilmente a la laminina y colágeno de tipo V. En contraste, no adhieren al colágeno tipo III (Gronthos S. et al, 1997).

Otros experimentos utilizan péptidos sintetizados artificialmente como GRGDS (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser) (Grzesik W.J, Robey P.G, 1994), o RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) (Puleo D.A, Bizios R, 1991). Después de mezclar el péptido al medio de cultivo se demostró que el péptido RGDS inhibe parcialmente la adhesión de las células óseas de calvaria de rata a discos recubiertos de fibronectina de una forma dosis dependiente aunque el péptido control RGES tiene un efecto mínimo sobre la adhesión celular (Puleo D.A, Bizios R, 1991). Un péptido GRGDS casi completamente bloquea la adhesión a la sialoproteína ósea y la vitronectina y disminuye ligeramente la adhesión a la fibronectina, el colágeno tipo I y la trombospondina (Grzesik W.J, Robey P.G, 1994).

### 1.27 Proteínas del citoesqueleto

Los sitios de adhesión entre el cultivo celular y la superficie del sustrato son llamados contactos focales o placas de adhesión. Los contactos focales son uniones cerradas donde la distancia entre la superficie del sustrato y la membrana celular está entre 10-15 nm.

Las caras externas de los contactos focales presentan unas proteínas receptoras específicas como las integrinas. En la parte interna algunas proteínas como la talina, paxillina, vinculina, tensina son conocidas como mediadoras de la interacción entre los filamentos de actina y las proteínas receptoras de membrana (integrinas) (Figura 1.2).



La familia de las integrinas esta compuesta por 22 heterodimeros de dos tipo de sub-unidad  $\alpha$  y  $\beta$ . Se conocen 16 sub-unidad  $\alpha$  y 8 subunidad  $\beta$ . La diversidad de estructuras esta asociadas con varias posibilidades de enlace con el ligando. Cada sub-unidad esta compuesta por un largo dominio extracelular, un dominio transmembrana y un corto dominio citoplasmático.

Ha sido demostrado que las integrinas interactuan directamente con el substrato de titanio (Gronowics G, y McCarthy M.B, 1996).

La integrina atravesando la membrana actúa como una interfase entre los compartimentos intra y extra celulares y puede trasladar el enlace de los ligandos externos a informaciones internas que induzcan adhesión, proliferación o migración celular y consecuentemente la regulación del crecimiento celular y la diferenciación.

Las actinas establecen enlaces con el citoskeleto de las celulas que llegan a la superficie del implante después de la migración a través de la matriz a la cual ellas también adhieren. El numero de integrinas en la superficie de la célula, y su afinidad para las proteinas en la superficie del substrato, son dependientes de factores como iones y la acción de agentes reguladores intracelulares asi como extracelulares (Damsky C.H, 1999). Cambios en el numero de uniones y su distribuciones en la superficie de las células puede determinar un cambio en el fenotipo por alteración de la expresión génica (Gronowics G, y McCarthy M.B, 1996).

La expresión de integrina en el hueso y en células de cultivo ha sido demostrada, todos los tipos de celulas óseas expresan las su-unidades  $\alpha_1$  y  $\alpha_5$  (Hughes D.E, 1993). Las sub-unidades  $\beta_1$  parecen ser el receptor predominante involucrado con la adhesión osteoblastica al colágeno y laminina y está parcialmente relacionado con en la adhesión con la fibronectina (Gronthos S. et al, 1997)

Como las adhesiones celula-substrato se basan en receptores tipo integrina, las aderencias juncionales contienen caderinas que median la adhesión entre células (CAM).

Las caderinas son glicoproteínas transmembranas actuantes con parejas intracelulares: catenina que interactúan con proteínas intracelular (Yamada K.M, Geiger B, 1997).

La asociación con  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$  catenina es un prerrequisito para la función adhesiva de las caderina. Las caderinas se asocian en un modelo de interacción homofílico a cremallera entre moléculas de caderinas expuestas sobre el plasma de la membrana de las células adyacentes (Takeichi M, 1995).

El reconocimiento y la adhesión precede y controla la comunicación a través de las uniones canal (Civitelli R, 1995). Las comunicaciones intracelulares ocurren a través de intercambios directos de iones a través de uniones canales o a través de señales producidos por acción de CAM.

Las uniones canales (gap junctions) son constituidas por homohexameros derivados de una familia de proteínas llamada connexina. Cuando una connexina de una célula (compuesta por 6 moléculas de connexina) está con una estructura similar en la célula vecina, se forma un canal transcelular (Civitelli R, 1995).

Las adherencias juncionales o los desmosomas proveen a un anclaje para circundar las células y permitir un intercambio directo de iones o pequeñas moléculas entre células. Las integrinas, CAM moléculas y las uniones canales regulan la expresión génica por un señal de transducción inducido por la adhesión célula-célula o célula-substrato. Las integrinas y las caderinas tienen directas interrelaciones con el citoesqueleto (actina) a través de la  $\alpha$ -actina, talina y cateninas.

El agrupamiento y la ocupación por parte de la integrina provoca el reclutamiento de la tensina y la adhesión focal de la quinasa, su fosforilación y sucesivamente el reclutamiento de talina, vinculina, y  $\alpha$ -actina, (Craig S.W, Johnson R.P, 1996).

Varias otras formas de señal intracelular son activadas por la adhesión celular: la fosforilación de la proteína tirosina, la activación de la proteína quinasa mitógeno activada, el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$ , alteraciones del pH y cambio del lípido inositol. Las moléculas de  $\beta$ -catenina pueden interactuar con el sistema de caderinas pero también

con fascina (una molécula involucrada en la formación de agregaciones de F-actina) e con factores de transcripción (Yamada K.M, Geiger B, 1997).

Algunas otras moléculas como la quinasa de adhesión focal pueden jugar un rol mecánico en el enlace de un número de moléculas de señales y del citoesqueleto en paralelo con su actividad kinásica.

Talina, vinculina y  $\alpha$ -actina ligan las fibras de F-actina a la membrana del plasma. El reajuste de las agregaciones de fibras de F-actina cambia en la forma celular produciendo protrusiones con forma de dedo o con forma de hoja (filopodia o lamellopodia respectivamente).

Las señales dependientes de la forma de la célula podrían ser procesadas por la matriz nuclear que es físicamente coligada con el citoesqueleto a través de laminas nucleares. Subsecuentemente, la activación de la placa de adhesión es esencial por el señal de transducción y por la regulación de la expresión génica.

Los cambios ECM mediados inician un intercambio entre el estado proliferativo y de diferenciación.

### 1.29 Influencia del material sobre la adhesión celular

La topografía, química, y la energía de superficie son características que determinan como las moléculas son absorbidas por la superficie y como la misma orienta las orienta (Boyan B.D, 1996). De la primera fase de adhesión de las proteínas depende influencia la morfología, la capacidad de proliferación y la diferenciación. Por razones termodinámicas la superficie contiene enlaces insaturados que llegan a la formación de capas reactivas que interactúan con el bio ambiente alrededor.

Las técnicas de preparación de la superficie y de esterilización tienen un rol crucial sobre la adhesión celular in vitro (Vezeau P.J. et al, 1996; Stanford C.M. et al, 1994).

Los efectos sobre la superficie además que a la preparación están debidos a la técnica de esterilización (Baier R.E. et al, 1982). Dependiendo del método de



esterilización, el titanio comercialmente puro tienen un espesor de óxido de 2-6 nm antes de implantación (Lausmaa J. et al, 1988).

El espesor del óxido en implantes desinsertados son de 2 a 3 veces más anchos (Lausmaa J. et al, 1988; Sundgren J.E. et al, 1985). Además, estudios de superficie analíticos muestran que la composición química del óxido cambia por incorporación de Ca, P, y S (Lausmaa J. et al, 1988; Sundgren J.E. et al, 1985).

Las características de hidrofiliidad y hidrofobicidad son de gran importancia para la adhesión celular, esta es generalmente mejor en superficies hidrofílicas (Altankov G, Groth T, 1994).

La energía de la superficie puede influenciar la absorción y la modificación estructural de las proteínas en el material (Boyan B.D. et al, 1996) también es un factor importante en la adhesión celular las superficies cargadas positivamente contraen contactos tan estrechos con las células que difícilmente se consigue distinguir la membrana celular del sustrato, mientras que en superficies cargadas negativamente se consigue notar solo contactos focales entre células y sustrato (Shelton R.M. et al, 1998)

El rol de la vitronectina en la adhesión celular *in vitro* ha sido estudiado, la presencia de vitronectina es esencial para la distribución espacial, la adhesión y la proliferación en una región cargada positivamente en células óseas (Thomas C.H et al, 1997). El rol de la adsorción de la plasma fibronectina en la adhesión celular ha sido establecido (Altankov G, Groth T, 1994). Además está claro que no solo la naturaleza sino la conformación de las moléculas biológicas adsorbidas influyen la consecuente adhesión celular. Cambios en la conformación de la plasma fibronectina afectan las conformaciones del dominio celular y la afinidad de la fibronectina con su receptor de superficie celular (Iuliano D.J. et al, 1993).

Existe una relación directa entre la rugosidad y la energía de superficie de los materiales. En un estudio se evaluó la adhesión celular en materiales de polimetilmetacrilado con varios grados de rugosidad. Se demostró que la componente apolar de la energía de superficie incrementa significativamente con la rugosidad

aunque la componente básica disminuye y que la adhesión celular tenía relación con el grado de rugosidad y la hidrofobicidad (Lampin M. et al, 1993).

### 1.29 Contracción de la herida

Es razonable asumir que la migración de células stromales con potencial osteogénico ejerce tracción en toda la matriz extracelular de una forma similar a las poblaciones fibroblásticas durante la reparación dérmica. La migración celular se acompaña siempre con la tracción con el matriz circundante que suporta el proceso locomotor (Harris et al, 1980).

La generación de fuerzas contráctiles con la matriz extracelular puede ser explicada con una continua oposición de fuerzas desde atrás en el área ventral y fuerzas hacia delante en el área dorsal de las células migratorias que se transmiten a la matriz extracelular por contactos adhesivos. La fuerza de tracción ejercida por los fibroblastos migratorios causa una reorganización local y deformación de la matriz extracelular (Harris AK e tal, 1981) y como fenómeno macroscópico puede causar la retracción de la herida.

La tracción celular y la migración son diferentes fenómenos porque las células marcadamente móviles como macrófagos y leucocitos polimorfonucleares ejercen una tracción insignificante, mientras que los fibroblastos menos móviles, o las plaquetas sessiles, ejercen fuerzas traccionales muy fuertes (Harris A.K. et al, 1981).

Estos últimos causan la retracción del coágulo, in cuanto las fuerzas de tracción provocadas por los fibroblastos son suficientes para impulsarlos de 100 a 1000 veces más rápidas de la normal locomoción celular, y podrían ser involucradas como medio para las células para influenciar la orientación de la matriz extracelular porque se encuentran en la alineación ordenada de las fibras de colágeno a lo largo de los centros de tracción (Harris AK et al, 1981).

### 1.30 La retención del coágulo

En la cicatrización endosea periimplantaria, la contracción del tejido de granulación y la retracción del coágulo de fibrina son los dos transducidos a la superficie del implante y podrían resultar en el despegamiento de la matriz de fibrina o del tejido de cicatrización desde el implante. Es razonable pensar que, de una forma

similar a los fibroblastos, las células osteogénicas podrían generar fuerzas traccionales cuando migran en un coágulo de fibrina.

El ácido ialurónico junto con la fibrina forman una red tridimensional que funciona de andamio para la cascada de los eventos de cicatrización de la herida (Weigel et al, 1986). Es razonable que el acumulo de fuerzas contráctiles podrían ser transducidas a la superficie del implante a la cual el coágulo de fibrina está ancorado.

Las fuerza contractiles podrían exceder a las fuerzas adhesivas, podría ocurrir así el despegamiento del coágulo. La solución de continuidad entre el implante y el tejido de cicatrización circundante podría comprometer el proceso de osteointegración (Davies J.E, 1998), y la retención del coágulo por la superficie del implante se considera un prerrequisito esencial para la migración celular a la superficie del implante.

La interfase fibrina-implante tiene que resistir a la fuerzas contráctiles del a contracción de la herida y de retracción del coágulo.

Las características de un biomaterial son determinadas por la química y la topografía de la superficie. Algunos autores no han encontrado una influencia significativa de la topografía de la superficie en la respuesta ósea (Huré G et al, 1996), otros han mostrado que la topografía superficial tiene una profunda influencia sobre la integración endosea (Carlsson L et al, 1988; Buser et al, 1991; Wong M et al, 1995; Wennerberg et al, 1997; Klokkevold P.R. et al, 1997).

La capacidad de osteoconducción de una superficie podría ser gobernada por su habilidad a retener el coágulo adherido de fibrina y resistir a las fuerzas retroactivas generadas por la actividad migratoria de las células osteogénicas que son requeridas por la osteoconducción. La combinación de la contracción de la herida y la influencia de la topografía de la superficie del implante sobre la retención del coágulo podrían afectar la osteointegración (Davies J.E, 1998).

### 1.31 Formación de Hueso

La formación de hueso requiere no solo el reclutamiento y la migración de una población de células con potencial osteogénico si no también la diferenciación de esta población en una de células secretorias maduras. En la cicatrización periimplantaria, la

población con potencial osteogénico migra a través del coágulo de sangre y asumiendo la retención del coágulo, alcanza la superficie del implante en el sitio de la herida.

Las células que alcanzan la superficie empiezan la síntesis de la matriz en la superficie sólida. Aquellas células que se diferencian antes de alcanzar la superficie secretarán la matriz. Como resultado, se interrumpirán la migración y no alcanzarán la superficie. Así que la osteoconducción se manifestará como una espícula ósea que avanza hacia la superficie diana. La progresión de tales espículas óseas ha sido observado ocurrir con una media de 73  $\mu\text{m}$  (Winet H et al, 1990) a 85  $\mu\text{m}$  por día (Winet H et al, 1988).

Los osteoblastos diferenciados, que secretan activamente, serán transferidos como resultado de la secreción de la matriz, o serán englobadas como osteocitos en la matriz que ellos mismos producen. La translocación de osteoblastos polarizados, con actividad secretoria activa, con concomitante producción de matriz es llamada crecimiento aposicional y es un fenómeno totalmente distinto respecto a la osteoconducción. Por lo tanto la formación de hueso durante las dos fases de cicatrización y la fase anabólica de remodelación comprenden los dos distintos fenómenos: la formación de hueso “de novo” y la formación aposicional de hueso.

### 1.32 Formación de Hueso “de Novo”.

Cuando el nuevo hueso esté formado, eso señala una continuidad de la actividad de síntesis de la población de células osteogénicas diferenciadas, o osteoblastos. Donde el tejido es continuo el cese provisional de la secreción de matriz en el crecimiento aposicional está marcada por líneas remanentes y en la formación de hueso “de novo” la llegada de una nueva población de células en la superficie opuesta está marcada por la secreción de una línea cementicia.

El término “formación de hueso de novo” describe la cascada biológica de eventos que ocurren durante el inicio de la formación de hueso por la población celular nuevamente diferenciadas de células osteogénicas. Estas células son sin duda la más importante población que forma hueso en los sitios de cicatrización implantar así como andamio para la construcción del tejido.

En un estudio realizado sobre implantes removidos al cabo de veinte años de inserción (Trisi y cols, 1993), no por fracaso de integración en el tejido sino por fractura del cuello del implante se hizo una preparación de éste junto con el hueso circundante para ser estudiado a microscopio óptico y microscopio electrónico de barrido (MEB). Se demostró la presencia de contacto directo en una fracción de la superficie del implante. La interfase mostraba huecos de grosor constante (entre 1 y 5  $\mu\text{m}$ ) en todos los casos. En la parte ósea, el borde se encontraba representado por hueso calcificado con una capa orgánica y no calcificada de 1  $\mu\text{m}$  de espesor, similar al tejido osteoide, interpuesto en algunas áreas.

En pequeñas porciones de la superficie de titanio fueron observados fragmentos de hueso calcificado directamente anclados a la superficie del metal. Se observó también una lamina electrodensa en la interfase ósea. De acuerdo con Sennerby (1991) ésta parece lógica desde el punto de vista biológico, ya que se piensa que la calcificación comienza y acaba en esta localización. Pueden observarse osteocitos muy cerca de la superficie del implante, y a mayor aumento es posible evidenciar la presencia de pequeños canaliculos óseos desde los osteocitos hasta la interfase. La evidencia de pequeños agujeros en la cara ósea de la interfase observados a microscopía electrónica de barrido soportan este hallazgo y refuerzan la hipótesis de que los canaliculos de los osteocitos terminan en contacto con la superficie del metal.

El primero en hablar de líneas cementicias fue Von Ebner en 1875 (Von Ebner V, 1875) que registró que los osteones estaban demarcados por hueso circundante por una distinta matriz que llamó líneas cementicias “Kittlinien” sugiriendo la función biológica de cementar de un osteon secundario a la matriz ósea circundante. El término líneas cementicias se utiliza reconociendo la única génesis de esta matriz y el estado de diferenciación de las células responsables de su formación. La composición de las líneas cementicias es diferente a la del hueso alrededor en cuanto están desprovistas de colágeno, la proteína más importante del tejido óseo.

Las líneas cementicias son generalmente consideradas punto débiles por las frecuentes rupturas que ocurren en esta zona. Tests mecánicos confirman que la fuerza de la interfase entre tejido y implante es significativamente inferior a la fuerza intrínseca del hueso (Edwards J.T. et al, 1997).

La cascada de eventos en la formación de hueso “de novo” se divide en cuatro etapas:

1. la adsorción de proteínas óseas no-colagenicas a la superficie sólida.
2. la iniciación de la mineralización por las proteínas absorbidas
3. el continuo de la mineralización resultante del crecimiento de cristal
4. el ensamblaje de una matriz de colágeno recubriendo la matriz interfacial con la mineralización con la matriz de colágeno.

Se han detectado islas mineralizadas en zonas inmediatamente avanzadas al colágeno del frente óseo, de forma similar se han visto las mismas islas en tejido de granulación (Brighton C.T, 1991) existente en sitios de cicatrización periimplantar (Brighton C.T, 1991). Por supuesto, la expresión de proteoglicanos y glicosaminoglicanos así como la presencia de osteopontina y sialoproteína, han sido reportadas durante la cicatrización de la fractura ósea, mientras la osteonectina, así como la expresión de la fosfatasa alcalina, han sido mostradas en el tejido de granulación así como durante la formación del callo óseo; la osteocalcina estuvo presente solo durante la formación del callo óseo (Strafford H.J et al, 1994).

La formación de tejido óseo “de novo” en una superficie sólida como es el caso del implante ocurre cuando las células osteogénicas diferenciadas están en contacto con la superficie.

Así que durante la formación de hueso de novo con superficie sólida, la diferenciación de las células osteogénicas produce una matriz cementicia mineralizada de aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  de espesor. A nivel ultraestructural, esta matriz interfacial exhibe una morfología heterogénea y consta de muchos componentes orgánicos e inorgánicos. El contenido inorgánico contiene minerales como calcio y fósforo, incluso hidroxiapatita, mientras que los componentes orgánicos son probablemente proteoglicanos y glicoproteínas. La osteopontina parece evidentemente la mayor glicoproteína de esta matriz inorgánica, recalcando la potencial importancia de la osteopontina en la elaboración de matriz interfacial. La matriz está formada por células de fenotipo osteogénico especializado anterior a la expresión de la sialoproteína ósea. Estas células necesitan ácido ascórbico para expresar plenamente su fenotipo osteogénico, que

incluye el montaje de matriz de colágeno. Aquello que esta matriz osteogénica forma con la superficie del implante durante la osteogénesis de contacto y el hueso indica que esta matriz podría tener un rol de pivote en el proceso del enlace del hueso con la superficie de los implante endosseo.

### 1.33 Crecimiento Aposicional

Aunque las células osteogénicas migratorias no son polarizadas, se trasmutan en sesiles siguiendo la polarización. El comienzo del crecimiento aposicional es marcado por la polarización celular, y a la transición desde la actividad celular migratoria a la secretoria. Cuando la producción y la secreción de proteínas ha empezado, el núcleo empieza a moverse hacia el lado apical de la célula, mientras el ergastoplasma va hacia la parte basal. Por lo tanto, la polarización celular ocurre después que la formación de hueso ha empezado.

El crecimiento aposicional de hueso está gobernado por la secreción de matriz ósea de colágeno por osteoblastos polarizados. Como resultado de acumulación de matriz en su parte basal, las células retroceden pasivamente en dirección apical. La reducción de la población de las células secretorias ocurre como resultado de la captura de las células individuales en la matriz, como osteocitos. Esto se manifiesta con una proliferación celular limitada. La secreción de matriz ósea, de toda forma, se limita al lado de de las células secretorias que rodea el ya existente hueso.

### 1.34 Relación entre Osteoconduccion y crecimiento aposicional

El crecimiento de hueso se puede dividir en dos tipos diferentes. Primero, la osteoconducción, junta con la formación de hueso “de novo”, produce el crecimiento a lo largo de la superficie sólida. Segundo, el crecimiento aposicional, produce un mas grande crecimiento de hueso en dirección perpendicular a la superficie.

La osteoconduccion permite un crecimiento mas rápido del hueso que el crecimiento aposicional, porque el hueso puede ser secreto simultáneamente en varias direcciones a lo largo de un eje en dirección del crecimiento. Contrariamente a esto, en el crecimiento aposicional, la osteogénesis se limita a un único punto en el eje de la dirección de crecimiento. Por lo tanto ni la actividad migratoria por si misma, ni una mayor actividad secretoria por las células individuales es responsable de un aumento del

crecimiento a lo largo del eje, si no el reclutamiento y la migración de mas células secretan matriz ósea.

### 1.35 Osteogénesis de contacto y osteogenesis a distancia.

No todas las situaciones de cicatrizaciones periimplantaria permite por si misma la colonización de la superficie implantaria, especialmente en el caso de la osteogenesis a distancia (Steflic D.E. et al, 1998). Varias morfologías de interfase hueso-implante han sido descritas en la literatura (Steflic D.E. et al, 1998). Existen dos tipos de osteogenesis: a distancia y de contacto.

En la osteogenesis a distancia, nuevo hueso se forma en la superficie del viejo en el sitio periimplantario. La superficie del hueso provee a población de células osteogenicas que deposita una nueva matriz que invade el implante. El nuevo hueso no se forma en el implante si no empieza a circumdarlo acercándose gradualmente.

Este patrón de osteogénesis es el de la osseointegracion en la superficie mecanizada donde el inicio de la mineralizacion del tejido óseo cicatricial no se desarrolla en el implante si no hacia el mismo, posterior a la muerte del tejido intervenido.

Al revés, en el proceso de la osteogénesis de contacto, el nuevo hueso se forma primero en el implante. La superficie del implante viene colonizada por osteoblastos antes de que llegue la matriz ósea. Este fenómeno es el mismo que pasa en los sitios de remodelación ósea cuando una superficie reabsorbida de viejo hueso se popula por celulas osteogénicas antes que nuevo hueso se deposite.

El factor común que relaciona la remodelación ósea y la osteogénesis de contacto es que el hueso se forma en el primer momento por diferenciación de células osteogénicas. La asi llamada formación de hueso “de novo” (Davies J.E. et al, 1991). Resulta claro que un requisito de la formación de novo es que las celulas óseas deben primero colonizar la superficie del implante antes de que la síntesis de la matriz extracelular haya empezado. Por lo tanto, la osteogenesis a distancia culminará en una aproximación al implante mientras que la osteogenesis de contacto en un aposición



directa a la superficie. Es inevitable que los dos patrones de osteogenesis ocurran en cada sitio de cicatrizacion endossea.

La estructura y la composición de la interfase hueso-implante en el caso de osteogenesis de contacto (Davies J.E, 1998): es cuando el hueso forma en directa aposicion con el implante. Una directa aposicion del hueso al implante es el resultado clinico deseable para la cicatrizacion peri-implantaria porque provee la estabilidad y el anclaje necesarios al implante para conseguir la distribución equilibrada de fuerzas. La osteogenesis de contacto esta gobernada por la histodinamica de la cicatrizacion periimplantaria que tienen que ver con la osteoconduccion, y por la formación de el hueso “de novo” en la superficie del implante (Davies J.E, 1996).

#### 1.36 Métodos de investigación de la rugosidad superficial utilizados para superficies de Titanio.

Métodos de investigación por topografía, morfología, y estructura. Los implantes utilizados recientemente tienen una topografía compleja, así que es muy importante utilizar metodos de scala ancha, como los siguientes:

- SEM: microscopía electrónica de barrido
- TEM: microscopía electrónica de transmisión
- XRD: difracción de rayos-x
- AFM: microscopia de fuerzas atómicas
- STM: microscopia de efecto túnel
- MFM: microscopia de fuerzas magneticas
- SNOM: microscopia optica de barrido de campo
- IM: microscopia de interferencia
- MSP: perfilometria stilo mecanica
- LPM: perfilometria láser de no contacto
- CLSM: microscopía laser de barrido confocal

Métodos de investigación por espesor de capa. Para establecer el espesor de la capa de oxido, metodos ópticos normalmente utilizados por ....., especialmente ellipsometria, sin embargo se puede averiguar el espesor de la capa de oxido indirectamente con métodos utilizados por las propiedades químicas ( como XPS y SIMS):

- ELM: elipsometría
- XPS: espectroscopia fotoelectronica de rayos-x
- SIMS: espectroscopia de masa ionica secundaria
- AES: espectroscopia electrónica de Auger

Investigation metodos por propiedades químicas: la biocompatibilidad de los implantes depende de capa exterior, de manera que es muy importante identificar la estructura química de la misma:

- XPS
- AES
- ToF-SIMS: espectroscopia de “tiempo de vuelo” de masas ionicas secundaria
- ISS: espectroscopia de dispersión ionica
- HREELS: Espectroscopia de alta resolución de pérdida de energía de electrones
- NEXAFS: espectroscopia de la fino-estructura de la absorción de la radiografía del cercano-borde
- FTIR: Espectrofotómetro de Infrarrojo de Transformada de Fourier

Métodos de investigación de las reacciones de superficie. Después de la implantación, muchos procesos tienen lugar en organismo humano (absorción de proteínas, adhesividad celular), para investigar estos se utilizan los metodos de:

- ELM
- SPR: resonancia de superficie plasmada
- QCM: microbalanza de cristales de cuarzo
- OWLS: espectroscopía optica de ondula ción de luz
- RM: espejo de resonancia

Métodos de investigación de energia superficial: la interacción entre el implante y el tejido circumdantedepende de la energía superficial, y este factor puede ser investigato con los siguientes métodos:

- AFM
- LFM: microscopia de fuerzas laterales

- SFA: aparato de fuerzas de superficie

Metodos de investigación de la planificación y orientación de la superficie: la orientación y la conformación de la massa molecular de la superficie es muy importante para las reacciones con las células. Se puede averiguar mas sobre los enlaces químicos y la modificaciones moleculares utilizando los siguientes metodos:

- AFM:
- NEXAFS
- HREELS
- FTIR
- XPS

Son estos los metodos de investigación mas frecuentemente utilizados en el estudio de superfcies de titanio (Suba C. et al, 2005).

Las técnicas están limitadas por la resolución lateral y/o vertical y la accesibilidad a los detalles de la superficie, además de por su longitud de medida máxima o el rango de área y/o de altura capaces de ensayar.)

La microscopia de fuerza atomica ofrece la más alta resolución tanto vertical como lateral (atómica a nm). Alta versatilidad en términos de condiciones de medida en diversos ambientes.

### 1.37 Fenomenos interfaciales: tensión superficiales.

La tensión superficial o interfacial y de un fluido e suna magnitud física que indica la fuerza local existente en los fluidos que tienden a minimizar el área interfacial de la interfase, y es responsable tanto de la forma como de la deformación que adquieren los fluidos en la interfase.

Todo sistema tiende a disminuir espontáneamente su área, es decir, a distribuir su volumen exponiendo la menor cantidad de superficie para tener mayor estabilidad. Por ejemplo, cuando se ponen en contacto dos gotas de un mismo liquido tienden a unirse para formar otra mayor y reducir así la relación superficie/volumen. Si esto no fuera cierto, los líquidos tenderían a dividirse en gotas cada vez mas pequeñas.

Suponiendo dos fases en contacto, una líquida y otra gaseosa, las moléculas del líquido están rodeadas por todos lados por otras iguales con las que ejercen fuerzas atractivas de cohesión (Fig. 1.1). A pesar de la agitación térmica que puede desplazar las moléculas de un lado a otro, la resultante de estas fuerzas es nula debido a la simetría y existe un equilibrio. Sin embargo, en la superficie, hay una fuerte asimetría, ya que en la fase gaseosa, es decir, en el aire, hay muchas menos moléculas y, además, lejos de la superficie, donde podrían interaccionar con la superficie del líquido (Fig. 1.3).

Como consecuencia, la resultante de las fuerzas atractivas en la superficie no es nula sino que está dirigida perpendicularmente a la superficie y hacia el interior del líquido. Como las interacciones son atractivas, las moléculas tenderán a colocarse en el interior, donde ejercen más interacciones, tendiendo a disminuir el volumen de la sustancia y a disminuir también la superficie interfacial.

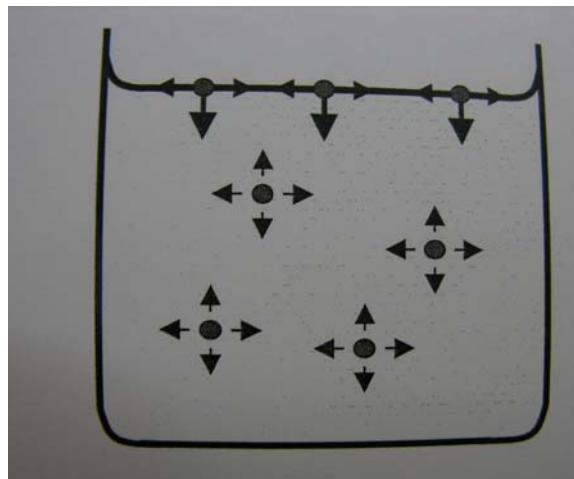


Fig. 1.3: Tensión superficial de un líquido. Se puede observar la asimetría de fuerzas en la superficie que genera una resultante dirigida hacia el interior y la simetría en el interior que genera una situación de equilibrio.

Así, en la superficie de un líquido se crea una fuerza dirigida hacia el interior de la sustancia, formándose una membrana tensa que ejerce una presión hacia el interior y que actúa ofreciendo una resistencia a la extensión o a la penetración. Este es el concepto de tensión superficial.

Desde un punto de vista termodinámico, la tensión interfacial se puede determinar como la energía libre adicional por unidad de área causada por la presencia de la interfase y representa el trabajo necesario para incrementar el área interfacial del

líquido en la unidad de superficie, ya que la tensión interfacial se opone al incremento de la misma.

Así, experimentalmente se ha podido comprobar que para aumentar la superficie de un sistema hay que efectuar un trabajo sobre el mismo y este trabajo es proporcional al incremento del área superficial:

$$dW = \gamma dA$$

donde  $dW$  es el incremento del trabajo,  $\gamma$  es la tensión superficial y  $dA$  es el incremento de la superficie.

Por lo tanto la tensión superficial se puede definir como la fuerza por unidad de longitud (mN/m) o bien como la energía libre por unidad de superficie (mJ/m<sup>2</sup>).

El término tensión superficial se suele utilizar cuando una de las fases en la interfase es gaseosa, mientras que el término tensión interfacial se mantiene en general para definir cualquier tipo de interfase líquido-gas, líquido-líquido o líquido-sólido.

Probablemente, la primera persona que habló de los fenómenos de superficie fue Galileo. En 1612, Galileo depositó una fina película de oro sobre el agua y notó como la superficie del sólido estaba por debajo del nivel del agua (Drake, 1981). No tenía el concepto de tensión superficial, pero probablemente tuviera una idea correcta de los conceptos de humectabilidad y mojabilidad (Good, 1993).

De todas formas, a pesar de este precedente histórico, la primera descripción teórica fue realizada simultáneamente por Laplace (1805) y Young (1805) observando el ascenso y descenso de un líquido en un capilar. De ahí que también se conozca a esta descripción como teoría de la capilaridad. La teoría se basa en la determinación de la diferencia de presión que hay entre los fluidos homogéneos separados por la interfase curva, a la que se denomina presión capilar.

Básicamente, la expresión de Laplace y Young relaciona la diferencia de presión de los fluidos en la interfase curva con la tensión interfacial y la curvatura de la interfase mediante la ecuación:

$$\Delta P = \gamma \left( \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)$$

Donde  $\gamma$  es la tensión interfacial,  $R_1$  y  $R_2$  representan los dos radios principales de curvatura, que determinan la curvatura de la interfase en los dos planos perpendiculares que contienen a la normal local a cada punto de la interfase y  $\Delta P$  es la diferencia de presiones en la interfase.

Más tarde se estableció otra expresión de la ecuación Young-Laplace conocida como ecuación de Young, en la que se establece que en condiciones de equilibrio termodinámico entre las tres interfases sólido-vapor, sólido-líquido y líquido-vapor al colocar líquido sobre una superficie sólida, viene dada por:

$$\gamma_{SV} - \gamma_{SL} = \gamma_{LV} \cos \Theta$$

donde  $\gamma_{SV}$ ,  $\gamma_{SL}$  y  $\gamma_{LV}$  son las tensiones interfaciales correspondientes a las interfases sólido-vapor, sólido-líquido y líquido-vapor, respectivamente, y  $\Theta$  es el ángulo la tangente a la gota en el punto de contacto entre el sólido y el líquido, que por definición, corresponde al llamado ángulo de contacto.

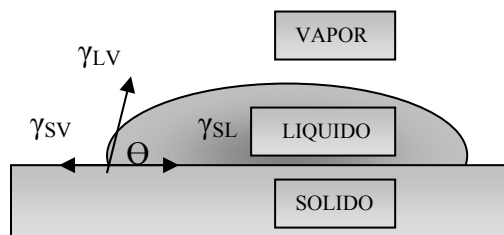


Figura 1.4.: Gota sésil sobre una superficie sólida que contiene las tres fases líquido, vapor y sólido y sus interfases. El ángulo de contacto es el ángulo formado por la tangente de la interfase líquido-vapor y la interfase sólido-líquido en el punto de contacto.

La línea curva que rodea la gota común a las tres fases se denomina línea de contacto o línea de las tres fases.

La ecuación de Young tiene gran importancia, ya que establece que las tensiones interfaciales son propiedades de equilibrio, y esto sirve como base para poder explicar los fenómenos interfaciales más comunes como la adsorción, la extensión, el mojado y la adhesión. La ecuación es válida siempre que tengamos definidos los valores de

equilibrio de los parámetros interfaciales, lo que no sucede en el caso de que la superficie no sea plana, lisa, isótropa, homogénea.

Además establece que las tensiones interfaciales son propiedades de equilibrio, y esto nos permite determinar de modo indirecto la tensión interfacial sólido-líquido y sólido-vapor, así como describir las propiedades físico-químicas de la superficie como su carácter liófilo/liófilo, su rugosidad, la existencia de impurezas y de grupos funcionales, etc (Miller C. Y Neogi P, 1985; Neuman A.W. y Spelt J.K, 1996).

Entre los métodos que pueden dar medida de la tensión superficial, se encuentra el basado en la geometría de la gota. Este método ofrece grandes ventajas respecto al resto de las técnicas convencionales (Holgado, 1996):

- 1° Se necesitan pequeñas cantidades de líquido para su realización.
- 2° Se puede aplicar tanto a interfases líquido-vapor como a interfases líquido-líquido.
- 3° Permiten aislar la interfase del exterior, evitándose la contaminación ambiental y, además, pudiéndose llevar un control de la temperatura de la temperatura tan importante en la medida de la tensión interfacial.
- 4° El sistema no interfiere en la interfase, lo que permite tener una medida más exacta de los parámetros interfaciales.

El procedimiento experimental en las técnicas basadas en la geometría de la gota se basa en la formación de dos tipos de gotas: sésil y pendiente, que constituyen dos interfases curvas estáticas clásicas, para posteriormente evaluar la geometría de las mismas. La gota sésil se obtiene al depositar una pequeña cantidad de líquido sobre la superficie (Fig. 1.3), mientras que la gota pendiente se obtiene suspendiendo una gota en el extremo de un capilar (Fig. 1.3).



Figura 1.5.: medición del ángulo de contacto.

### 1.38 Ángulo de contacto

Cuando se deposita una gota de líquido sobre una superficie sólida, esta adopta una forma controlada por la energía libre de las tres interfases involucradas sólido-líquido, sólido-vapor, y líquido vapor como se muestra en la figura 1.5. El ángulo de contacto es el ángulo que forma la tangente de la interfase líquido-vapor con respecto a la superficie sólida (interfase sólido-líquido) en el punto de contacto o línea de tres fases.

El ángulo de contacto está muy relacionado con los conceptos de extensión y mojado de tal forma que un líquido se extiende más o menos sobre una superficie sólida según sea el valor del ángulo de contacto menor o mayor respectivamente. Así, si el ángulo de contacto tiene un ángulo muy pequeño, próximo a cero, se dice que el líquido “moja” totalmente la superficie, puesto que se extiende completamente sobre la misma. Por el contrario, si el ángulo de contacto es próximo a  $180^\circ$ , el líquido se contraerá, pudiéndose observar claramente que la gota se separa de la superficie; en este caso, el líquido se dice que no “moja” a la superficie sólida.

El ángulo de contacto que se mide experimentalmente no coincide, en general, con el ángulo de contacto de equilibrio o ángulo de contacto de Young, sino que forma parte de un intervalo de valores asociados a los posibles estados metaestables del sistema (Neumann A.W. y Spelt J.K, 1996; Drelich J, 1997; Decker E.L, 1999).

Suponiendo que una gota resbalara por un plano inclinado, se pueden definir dos ángulos de contacto. Uno el ángulo de contacto de avance, que es el que forma la gota en el frente de avance. Otro es el ángulo de contacto de retroceso, que es el que forma la



gota en la zona de retirada. Si esta gota resbalara sobre una superficie homogénea, lisa y sólida, el ángulo de contacto de avance y retroceso serían iguales. Sin embargo, en las medidas del ángulo de contacto es posible observar diferencias entre el ángulo de contacto de avance y el ángulo de contacto de retroceso. La diferencia existente entre el ángulo de contacto de avance y retroceso se denomina histéresis y responde a la expresión:

$$H = \Theta_a - \Theta_r$$

donde H es la histéresis,  $\Theta_a$  es el ángulo de contacto de avance y  $\Theta_r$  es el ángulo de contacto de retroceso.

La aparición de la histéresis en la medida del ángulo de contacto puede estar desencadenada por muchos factores pero todos ellos están relacionados con la existencia de irregularidades y heterogeneidades químicas y morfológicas en el substrato. Entre las causas que pueden provocar histéresis se encuentran la contaminación tanto del líquido como del substrato, la rugosidad de la superficie, la heterogeneidad química y morfológica o la porosidad.

Las superficies reales no van a cumplir en general las condiciones de idealidad con lo cual la validez de la ecuación de Young es relativa. Por ello, en la bibliografía (Johnson R.E, Dettre R.H, 1969; De Gennes P.G, 1985; Schwartz L, Garoff S, 1985; De Coninck, 1994; Marmur A, 1994; Neumann A.W, 1996; Collet P y cols, 1997) se pueden encontrar multitud de formulaciones que tratan de justificar o completar la ecuación de equilibrio de Young para que incorpore las discrepancias encontradas en las superficies reales, intentando proporcionar un sentido físico al valor del ángulo de contacto.

El procedimiento más habitual para la obtención del ángulo de contacto se basa en la visualización directa del ángulo que forma la gota líquida depositada sobre la superficie sólida mediante el uso de un goniómetro (Neumann A.W. and Good R.J, 1979).

La técnica utilizada en los estudios se basa en la geometría de la gota de líquido, se determinan los parámetros interfaciales a partir del perfil de la gota. El procedimiento experimental depende del tipo de interfase curva estática objeto de estudio. El tipo

utilizado fue el del a gota sésil: se deposita un agota de liquido sobre una superficie sólida e naire o bien inmerso en un líquido menos denso que el de la gota.

Tradicionalmente después de formar dicha interfases e colocaba un goniómetro para visualizarla.

En la actualidad, gracias al avance que se ha producido en la tecnología informática, se ha optado por almacenar las imágenes del goniómetro directamente en el ordenador para que se encargue de su análisis, y determine de una forma mucho mas precisa y automática el ángulo de contacto utilizando técnicas de tratamiento digital de imágenes.

La determinación de la tensión interfacial de la gota mediante esta técnica se hace de manera indirecta utilizando la ecuación de Young-Laplace y la imagen de la interfase presente en la fotografía. Para ello, es necesario comparare el perfil de la gota experimental con el que se obtendrá a través de la ecuación de Young-Laplace. Dado que la resolución exacta del a ecuación de Young-Laplace es complicada, los resultados que inicialmente se obtenían con esta técnica eran muy pobres. Sin embargo, actualmente, la aplicación del Análisis Numérico combinado con el Tratamiento Digital de Imágenes permite realizar ajustes mucho mas precisos. Entre los métodos numéricos destacar el algoritmo ADSA (axisymmetric Drop Shape Análisis) elaborado por el grupo del profesor Neuman (Neumann A.W, Spent J.K, 1996) como uno de los métodos de ajuste más precisos que se han elaborado hasta ahora, y que es ampliamente utilizado por distintos laboratorios (Noordmans J, Busscher H.J, 1991; Nahringbauer I, 1995).

Este método es un algoritmo numérico de ajuste muy preciso cuyo funcionamiento se basa en la búsqueda del a curva, solución de la ecuación de Young-Laplace, que mejor concuerda con el perfil experimental, lo que nos permite conocer de modo indirecto los parámetros interfaciales que caracterizan dicho perfil experimental como la tensión interfacial, el área interfacial, el volumen de la gota, el radio de contacto, el ángulo de contacto, el radio de curvatura del ápice, etc.

Existen otras derivaciones del método ADSA, en nuestro estudio se utilizó el ADSA-P que se adapta al perfil de la gota a partir de su proyección en el plano vertical.

El empleo del ordenador para la adquisición de datos conlleva, además del proceso de adquisición de imágenes, un posterior análisis digital de las imágenes para extraer

aquella información relevante, que en este caso, equivale a la obtención de las coordenadas de perfil experimental de la gota.

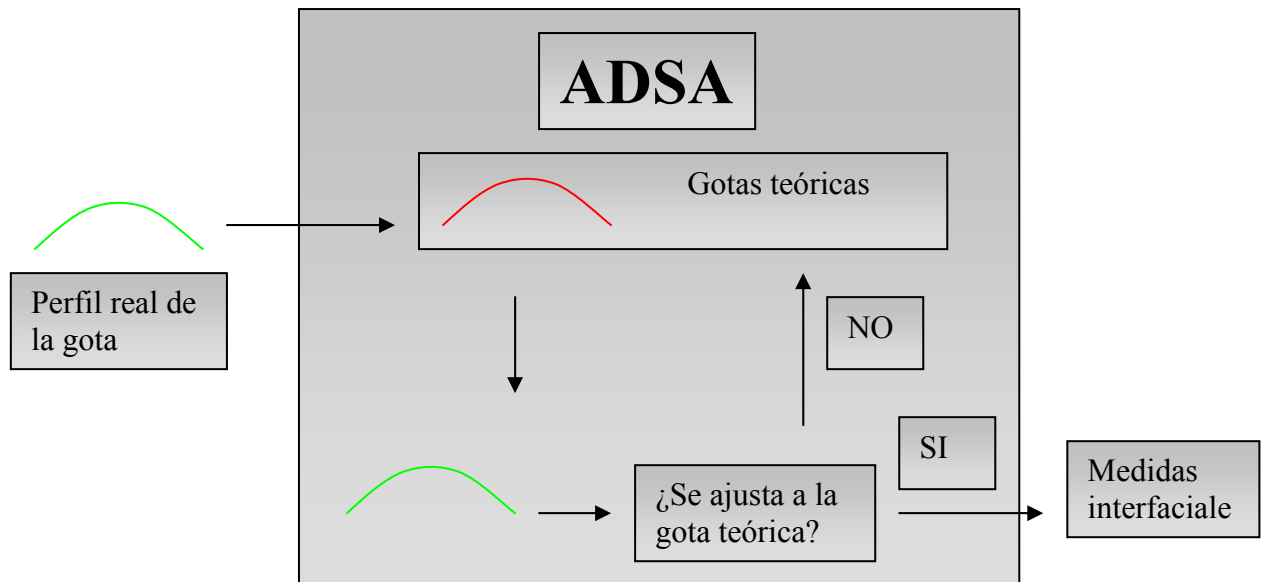


Figura 1.6.: Diagrama de flujo del a aplicación del método ADSA para la determinación de medidas interfaciales a partir de las coordenadas experimentales obtenidas a través del tratamiento digital de imágenes. Por lo tanto, la aplicación del método ADSA consiste en buscar el mejor ajuste posible entre las coordenadas experimentales y teóricas.

# Capítulo 2: Objetivos y diseño del estudio

En este capítulo se plantea el objetivo principal que ha tenido este trabajo, concretándolo en otros más detallados. Posteriormente, se describe el diseño del estudio realizado para la consecución de este objetivo.

## 2.1. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo ha sido el estudio cuantitativo y cualitativo de la rugosidad de varias superficies de titanio, para lo cual ha sido necesario la caracterización del titanio y la comprobación de la respuesta de adhesión y celular.

Este objetivo general se ha concretado en otros objetivos, con los que se ha buscado lo siguiente:

1º Aplicar la técnica ADSA (Aximmetric Drop Shape Análisis) en la medida del ángulo de contacto del titanio.

2º Identificar la influencia de la heterogeneidad química y morfológica del titanio en el ángulo de contacto.

3º Evaluar la influencia del tratamiento de arenado, grabado ácido, y arenado y grabado ácido en la humectabilidad del titanio.

4º Evaluar la influencia del tratamiento de arenado, grabado ácido, y arenado y grabado ácido en la rugosidad del titanio.

5º Evaluar la influencia del tratamiento de arenado, grabado ácido, y arenado y grabado ácido del titanio en la adhesión celular.

6º Evaluar la influencia del tratamiento de arenado, grabado ácido, y arenado y grabado ácido del titanio en la morfología celular.

7º Evaluar la influencia del tratamiento de arenado, grabado ácido, y arenado y grabado ácido del titanio en la topografía superficial de las superficies.

## 2.2. Diseño del estudio

Para la consecución de estos objetivos, el estudio consta de distintos experimentos agrupados en dos apartados diferenciados. En el primer apartado, se realiza la caracterización de la superficie del titanio con la finalidad de estandarizar las condiciones de trabajo y controlar algunas variables. Para este fin se analizan factores como la rugosidad, la influencia de la heterogeneidad química y morfológica del titanio en el ángulo de contacto.

En un segundo apartado, una vez demostrada y controlada la posible influencia de estas variables, se valora la rugosidad y la humectabilidad de cuatro superficies diferentes, y se realizan pruebas *in vitro* de adhesión celular.

Este proyecto se ha realizado en colaboración entre los Departamentos de Estomatología y Física Aplicada de la Universidad de Granada, y el Departamento de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sassari (Italia).

A continuación se describen diversos aspectos metodológicos seguidos en los distintos experimentos realizados en este trabajo. Tras eso, se realiza una descripción de cada experimento, detallando su material y método, sus resultados y su discusión.

# Capítulo 3: Material y método

En este capítulo se detallan los elementos necesarios y el proceso seguido para la realización de los experimentos. En primer lugar, se describen la preparación de los especímenes y los dispositivos y técnicas utilizados de forma general. Posteriormente, se desarrolla la aplicación de la preparación de los especímenes y de estos dispositivos y técnicas en la realización de cada experimento en particular.

## 3.1. Preparación de los especímenes

El material base empleado ha sido Ti c.p. Grado II, los discos se han obtenido a partir de la mecanización de barras de 6 cm por un diámetro de 12 mm del material referido (Manfredi Pure Titanium, S. Secondo di Pinerolo, Italia). Se cortaron en un micrótopo Accutom 50 (Struers, Alemania) (Fig. 3.1) utilizando discos de corte diamantados.



Figura 3.1.: Micrótopo utilizado par acortar las barras de titanio.

Una vez obtenidos los discos se han pulido manualmente con discos de SiC de 240, 320, 400, 600, 800, 1200 grit (Fig. 3.2.). El ultrapulido se ha realizado con partículas de aluminio de 1, 0,3, 0,05  $\mu\text{m}$  (Fig. 3.3.) hasta llegar a un pulido a espejo (Fig. 3.4.).

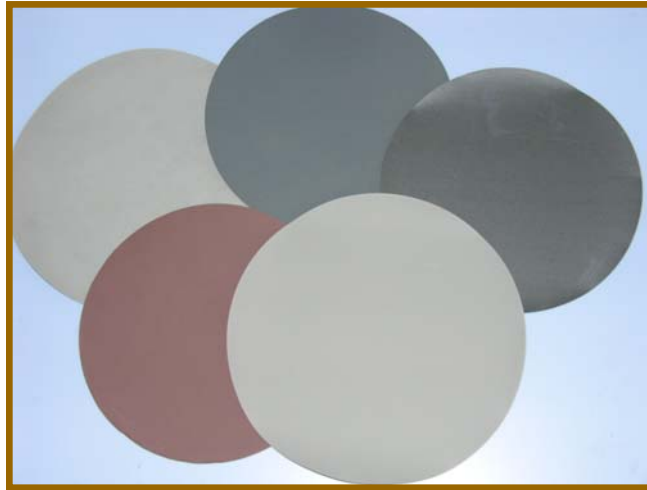


Fig. 3.2.: Discos abrasivos utilizados en el pulido



Fig. 3.3.: Partículas de aluminio utilizadas en el ultrapulido



Fig. 3.4.: Discos de titanio después del tratamiento de pulido

#### Superficie arenada

Los discos lisos se han lavado en baño de agua destilada en ultrasonidos y, posteriormente, se han secado con aire forzado antes de ser arenados con las partículas de proyección. El arenado se ha llevado a cabo en una maquina arenadora de laboratorio de pequeñas dimensiones (1,5 m de ancho, 0,75 m de profundidad y 0,90 m de alto). La máquina dispone de una boquilla fija.

Se han empleado partículas abrasivas comerciales de óxido de aluminio ( $Al_2O_3$ ), estas partículas están compuestas por el 99,78% de  $Al_2O_3$ , el 0,18% de  $NaO_2$ , y 0,04% de  $Fe_2O_3$  (% en peso).

Las condiciones del arenado para todos los discos tratados han sido:

- Presión de proyección: 0,25 MPa,
- Tiempo de proyección mínimo: 3 minutos, para garantizar una tasa de recubrimiento de la rugosidad de un 100 %,
- Distancia de proyección entre el disco y la boquilla: 3 cm,
- Ángulo de impacto del haz de partículas: 60°.

#### Superficie grabada

Los discos después de ser pulidos se han grabado con ácido fluorhídrico al 10% por 5 min se han lavado con agua destilada en baño de ultrasonido antes del proceso de pasivado.



### Porceso de Pasivado

Los discos tras el arenado y/o el grabado ácido se han lavado en ultrasonidos con acetona al 70% durante 20 min y se han secado con aire forzado. La pasivación ha consistido en un ataque químico con una disolución de ácido nítrico al 30% durante 3 min.

Finalmente, todos los discos se han lavado en ultrasonidos con acetona al 70% por 20 min y se han secado con aire forzado, y sucesivamente se han lavado en agua destilada por 30 min y secado con aire forzado.

### 3.2 Dispositivos y técnicas utilizados: medida de la tensión superficial y el ángulo de contacto con el método ADSA (axisimetric Drop Shape Análisis).

El sistema ADSA es un programa que implementa un método numérico para la evaluación de la tención superficial y el ángulo de contacto a partir de la geometría de la gota. Fue desarrollado por Rotenberg et al. (1982) y mejorado por Cheng et al. (1990). El método ADSA ajusta las coordenadas de la gota obtenida por un tratamiento digital de imágenes a una ecuación teórica. La ecuación teórica utilizada es la ecuación de capilaridad de Laplace (1805):

$$\Delta P = Y \left( \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)$$

donde Y es la tensión interfacial, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan los radios principales de curvatura y ΔP es la diferencia de presiones en la interfase.

El método ADSA desarrolla dos técnicas relacionadas, que son la técnica axisymmetric drop shape analysis profile (ADSA-P) (Cheng et al, 1990; Cheng y Neumann, 1991) y la técnica axisymmetric drop shape análisis contact diameter (ADSA-CD) (Cheng et al, 1990; Duncan-Hewitt et al, 1989).

La técnica ADSA-P determina la tensión superficial de un liquido-fluido y el ángulo de contacto a partir de la geometría de un menisco axisimetrico formado por una gota pendiente o una gota sésil. A partie de perfil de la gota, ADSA-P busca el mejor ajuste entre las coordenadas obtenidas experimentalmente y las coordenadas teóricas de forma que se satisfaga la ecuación la capilaridad de Laplace.

ADSA-P sólo necesita conocer, a parte de algunos puntos del perfil de la gota, la densidad del líquido y la aceleración local de la gravedad. Para conseguir datos realistas es muy importante que el perfil de la gota a analizar posea una geometría totalmente simétrica.

En este estudio se ha realizado la técnica ADSA-P en la medida de la humectabilidad de las superficies de titanio con agua destilada.

### 3.3.: Instrumento de medida.

Para la planificación del método ADSA y el procesamiento de las gotas sésiles, se ha utilizado un instrumento que consta de varios elementos. En la figura 3.4 se muestra un esquema del dispositivo para la técnica ADSA-P. La figura 3.5 muestra un aspecto del laboratorio de Física aplicada de la Universidad de Granada.

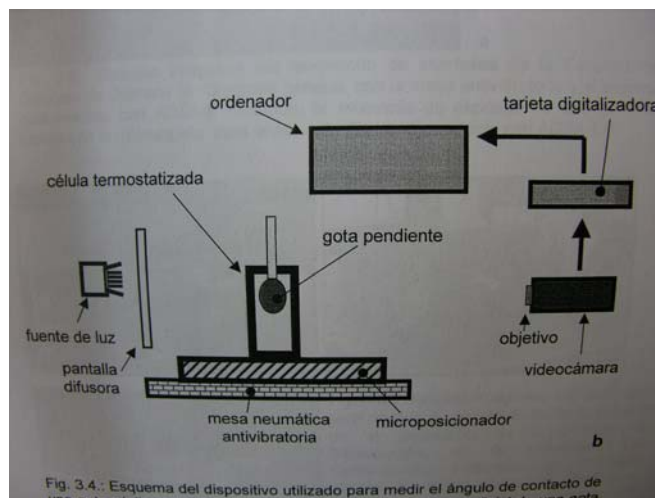


Fig. 3.5.: Esquema del dispositivo utilizado para medir el ángulo de contacto de una gota sésil con la técnica ADSA-P.

1º Mesa antivibratoria (Fig 3.5). todo el dispositivo se montó en una mesa antivibratoria Vibraplane (Kinetic System, Boston, MA, EE.UU.) para evitar pérdidas en la precisión de las medidas causadas por las vibraciones procedentes del edificio. La mesa está construida con un panel de acero procedentes del edificio. La mesa está construida con un panel de acero inoxidable con taladros roscados (n-6) para

poder montar cualquier elemento. Este panel está apoiado sobre cuatro patas que tenían un mecanismo neumático nivelador.

2° Microposicionador de superficies y gotas (Narishige, Tokio, Japón). Está compuesto por tres tornillos micrometricos que permiten mover libremente la superficie en cualquier dirección.

El microposicionador permite también alinear la horizontal de la superficie donde se apoyan las gotas sésiles o la rejilla utilizada en el proceso de calibración.

3° Microscopio. Es una de las piezas claves del dispositivo experimental para la adquisición de imágenes óptimas cuyo objetivo debe tener una ausencia casi absoluta de distorsiones geométricas en todo intervalo de aumentos utilizados. Se ha utilizado un objetivo en el microscopio que permite ampliar los aumentos hasta en un factor 6 sin ninguna pérdida apreciable; se trata de un objetivo Apo-Zoom Wild 400076 (Leica Instruments GMBH, Nussloch, Alemania) con una distancia focal de 200 mm y una apertura 1:6. la imagen que se obtiene se almacena en el ordenador. Físicamente, la imagen se captura desde una cámara de vídeo digital. El microscopio lleva adaptado una fuente de luz halógena anular modelo GLS 150 (Leica Instruments GMBH, Nussloch, Alemania).

4° Cámara de vídeo. Se utilizó una cámara CCD (charge couple device) de alta resolución modelo SSC-M370CE (Sony, Tokio, Japón) con una resolución de 752x582 píxeles en un área de 6,3x4,7 mm, con una sensibilidad de 0,3 lux.

5° Tarjeta Digitalizadora. Se ha utilizado una tarjeta digitalizadora de 768x576 píxeles para la tarjeta DT-3155 (Data Translation Frame Grabber Board, Malboro, EE.UU.) y una sensibilidad de 0,3 lux, con buffer de memoria (frame memory), para su posterior tratamiento o presentación en la pantalla del ordenador. Dependiendo del modelo de FG el buffer de memoria puede estar ubicado en la propia tarjeta digitalizadora o en la memoria RAM del ordenador. Finalmente, si se necesita visualizar la imagen digital en un monitor, habrá que realizar una nueva conversión de la imagen digital a una señal analógica, ya que

la mayoría de los monitores actuales, basados en tubos de rayos catódicos, requieren una entrada de ese tipo.

6° Ordenador. Para el procesamiento y análisis de imágenes se han utilizado un conjunto de ordenadores PCs: un PC 486 DX-33 con 4 Mb RAM, un PC 486 DX2-66 con 8 Mb RAM y un Pentium 100 con 16 Mb de RAM.

7° Retícula de calibración. Es otro de los elementos necesarios en el instrumento para poder analizar las gotas en las imágenes. La visualización de la retícula a través de la cámara CCD tiene un doble fin. Por un lado permite calibrar las gotas sesiles de las imágenes para conocer con exactitud las dimensiones físicas de las mismas. Por otro lado, permite conocer y corregir mediante software la posible distorsión geométrica que pudiera tener el dispositivo óptico. En este caso, se ha optado por una rejilla que contiene retículas cuadradas de 0,25 mm de lado (Gaticules Limited, Tonbridge, Reino Unido).

8° Plomada. Consiste en un hilo de nylon del cual cuelga un objeto pesado que se introduce en una cubeta de agua para amortiguar las oscilaciones. Se utiliza antes de iniciar la experiencias y antes de colocar la retícula para corregir la posible inclinación que tenga la alineación vertical de la cámara. La imagen de este hilo es visualizada por la cámara, y el programa Contacto (Holgado, 1996) analiza las coordenadas de dos puntos de la plomada frente a la vertical de la cámara de video.

9° Calibre circular. Con objeto de calibrar la extensión de la gota con tamaño conocido, antes de realizar las gotas obtenidas, se toma la imagen de un círculo de 0,3 cm. Esta medida se introduce en el ordenador para realizar los cálculos de ángulo de contacto.

10° Programas informaticos Dinaten, Imgdisp, Adsad. Facilitan al usuario todas las operaciones de captura, almacenamiento, procesamiento y análisis de las imágenes. Por otra parte, permiten evaluar los parámetros interfaciales (tensión

interfacial, ángulo de contacto, volumen medio, radio de contacto, etc.) de cualquier gota sésil.

11° Instrumental para depósito y creación de gotas. Es necesario para depositar la gota en la superficie de estudio o para la creación de una gota pendiente. Para el depósito de una gota sobre una superficie se han utilizado dos microjeringas (Labsystems Oy, Helsinki, Finlandia; Gilmont, Barrinton, IL, EE.UU.), una micropipeta de puntas desechables (Eppendorf, Hamburg, Alemaña) y un microinyector Microlab 500 (Hamilton, Reno, NV, EE.UU.) con jeringa de 0,025 ml (Hamilton, Reno, NV, EE.UU.).

### 3.4. Obtención de la medidas interfaciales

El proceso de obtención de las medidas interfaciales con la técnica ADSA-P (Fig. 3.4) sigue varias fases:

1° Posicionamiento del microscopio. El microscopio se posiciona horizontal, paralelo al plano horizontal.

2° Cálculo del ángulo de rotación. Para la evaluación de la gota pendiente, en la primera fase se calcula el ángulo de rotación de la cámara mediante la visualización y evaluación.

3° Calibrado. Se introduce la imagen que contiene la rejilla y se extraen los puntos de inserección (puntos control) para conocer la transformación geométrica a aplicar en cada zona de la imagen (Fig. 3.7)

4° Visualización de la gota (Fig 3.7). Se visualiza la imagen de la gota a analizar y se extrae automáticamente mediante el programa Contacto el perfil de la gota. Se corrigen las coordenadas del perfil con el ángulo de rotación de la cámara obtenido en la primera fase. Se aplica la transformación geométrica para cada punto del perfil y se obtienen las coordenadas físicas definitivas en cm libres de distorsiones.

5° Determinación de la tensión superficial o el ángulo de contacto. Mediante la técnica ADSA y con las coordenadas físicas de la gota se calcula la tensión superficial o el ángulo de contacto.

El dispositivo de medida construido contiene los siguientes sistemas:

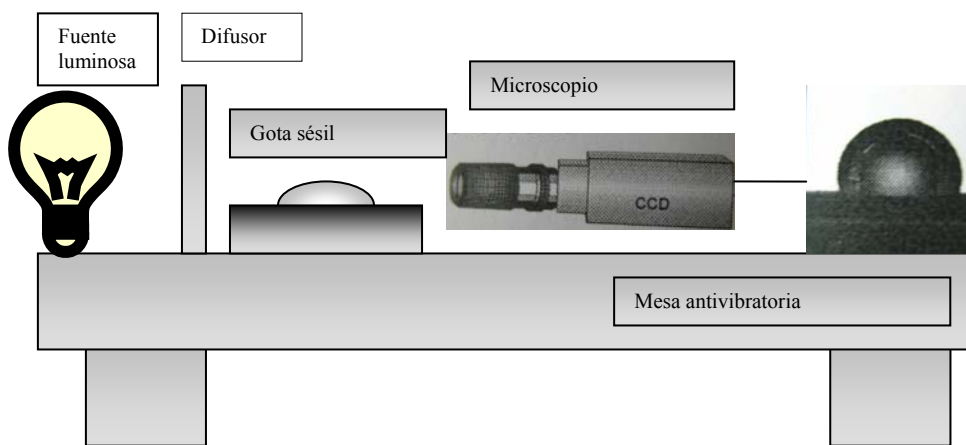


Fig 3.6.: Esquema del sistema óptico y de adquisición de imágenes. La interfase curvas e transilumina proporcionando una imagen digital con mayor contraste.

### **Procedimiento del instrumento en laboratorio.**

El protocolo de trabajo utilizado para obtener medidas precisas de los parámetros interfaciales es el siguiente:

- 1) Limpiar exhaustivamente todos los recipientes, superficies y utensilios que se van a utilizar en la experiencia y seguir las normas de limpieza y trabajo del laboratorio.
- 2) Comprobar que todos los dispositivos (ordenadores, cámaras CCD, inyector, termostato, etc..) funcionan correctamente.
- 3) Calibrar el instrumento en función del tipo de experiencia a realizar.
- 4) Montar en la mesa antivibratoria los elementos necesarios en función del tipo de experiencia a realizar:
- 5) Se coloca la muestra a analizar encima del microposicionador.

- 6) Se introduce en la jeringa la disolución o el líquido para formar la gota sésil.
- 7) Se captura la imagen utilizando el programa Dina Ten teniendo en cuenta que:
  - 8) La imagen debe estar bien enfocada y contrastada.
  - 9) Las gotas tienen que formarse utilizando una cantidad constante de líquido (cinco  $\mu\text{m}$  en nuestro estudio) y de forma que favorezcan la aparición de los efectos que modelan la curvatura de la interfase, la gravedad que tiende a alargar la gota y la tensión interfacial que tiende a contraerla.
- 10) Realizar el proceso de captura, almacenamiento y análisis de cuantas imágenes sean necesarias según el tipo de fenómeno interfacial a estudiar con el programa Dina Ten de forma programada antes de realizar la experiencia o bien de forma controlada según las necesidades del investigador. El programa se encarga de la análisis y obtención de medidas sobre las imágenes capturadas de perfil lateral.

La elección de la determinación del ángulo de contacto desde la vista lateral es debida al tipo de gota sésil, teniendo generalmente valores próximos o mayores de  $90^\circ$  es realmente difícil determinar los extremos de la gota con la superficie (gota sésil) (Fig 3.6).

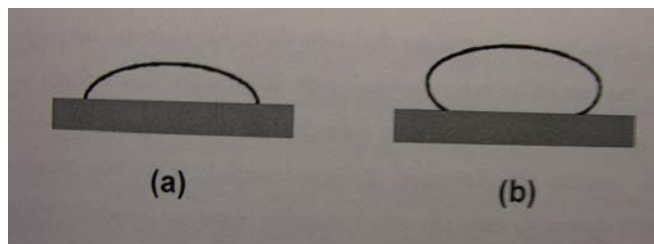


Figura 3.7.: (a) Gota sésil con ángulo de contacto mayor de  $90^\circ$ ; (b) gota sésil con ángulo de contacto menor de  $90^\circ$ .

Para cuantificar el ángulo de contacto, por cada corte se midieron consecutivamente tres gotas de agua destilada desionizada con un volumen de  $0,5 \mu\text{l}$  que fueron depositadas con microjeringa (Gilmont, Barrinton, IL, ee.uu.) (Fig. 3.7) En los cortes sólo se depositaron tres gotas para evitar la alteración del espécimen durante la segunda y tercera medida.



Fig. 3.8.: Medición del ángulo de contacto en una de las superficies estudiadas.

## Caracterización superficial

### 3.4. Microscopio electrónico de barrido

Dentro de las nuevas generaciones de microscopio electrónico de barrido se encuentran los de alta resolución conocidos como Fe-SEM con las que se puede obtener imágenes a mayor ampliación y mejor resolución. A la par de estos avances está la disminución del vacío necesario para el desplazamiento rectilíneo de los electrones dentro de la columna con los que se genera las imágenes de nuestras muestras. Así, podemos encontrar los microscopios de bajo vacío y los últimos llamados ambientales que posibilitan la visualización de muestras resilientes de mayor uso en muestras biológicas.

Todas las muestras necesitan un tratamiento de deshidratación que les proporciona estabilidad en medios de vacío que no contaminen la columna y estabilidad en el tiempo por ello los tratamientos son invasivos e irreversibles. El microscopio electrónico de barrido de alta resolución, modelo **Gemini** fabricado por LEO Alemania, es el que se usó en el presente estudio.

Las imágenes obtenidas proporcionan información morfológica y cualitativa; con ayuda de algunos tratamientos de imagen se logra extraer algunos datos semi-cuantitativos y cuantitativos pero siempre son indirectos.





Figura 3.9.: Microscópio de alta resolución modelo **Gemini** fabricada por LEO Alemania.

### 3.5. Evaluación de la superficie con microscopio confocal

El microscopio Confocal fue descrito por primera vez por Minski M. en 1957, originalmente llamado “microscopio de doble enfoque” (Jordan 2003). La microscopía tradicional siempre se ha limitado al estudio de muestras planas para situar toda su superficie a una misma distancia focal, cuando observamos una muestra con un microscopio convencional estamos iluminando simultáneamente toda la superficie y aunque recogemos principalmente la luz de los puntos que se encuentran enfocados, también recibimos información borrosa de los puntos que se encuentra fuera de la distancia focal. Esta información, que procede de múltiples reflexiones en las zonas desenfocadas de la superficie, hace que la imagen recogida pierda contraste y calidad. La microscopía confocal es un tipo de microscopía capaz de ofrecer información topográfica de la superficie en estudio, es decir en tres dimensiones, de una muestra determinada. Para ello utiliza un sistema capaz de seleccionar la información de los puntos que se encuentran exactamente a la distancia focal del objetivo del microscopio y desprecia los puntos fuera de distancia focal. Realizando un barrido (acercando y alejando la muestra al objetivo) podemos decidir a qué altura se encuentra cada uno de los puntos seleccionados – enfocados – y reconstruir una imagen tridimensional de la muestra de una forma no-invasiva. La imagen tridimensional obtenida puede ser almacenada digitalmente y procesada posteriormente para facilitar su estudio consiguiendo así, imágenes más definidas o seleccionando la información de determinadas regiones. (Tejera R. 2004)

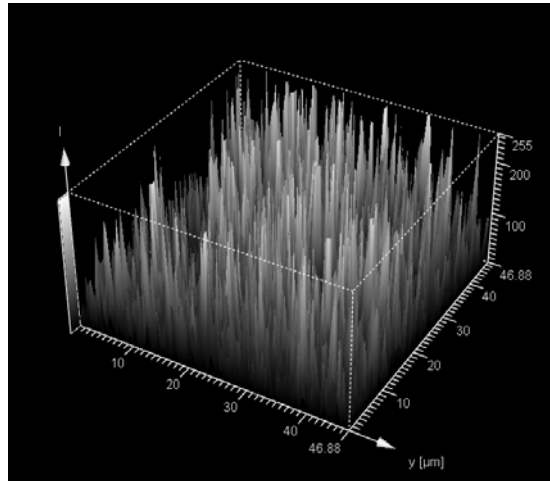


Figura 3.10.: Las diferentes imágenes captadas a diferentes alturas son ajustadas con un algoritmo para obtener la medida de la superficie barrida.

La microscopía confocal actual tiene dos ramas fundamentales: la microscopía confocal láser y la de luz blanca. Esta última, usa un haz de luz que atraviesa un diafragma de apertura mínima y es dirigido a través de un objetivo de microscopio hacia la muestra. La luz reflejada o dispersada por la muestra vuelve a atravesar el objetivo y el diafragma en sentido contrario y pasa posteriormente un segundo diafragma denominado apertura confocal. Detrás de la apertura confocal, un foto-detector recogerá una señal elevada cuando la muestra se encuentre enfocada, haciendo pasar mucha luz a través del diafragma, mientras que recogerá una señal muy débil cuando la muestra esté desenfocada.

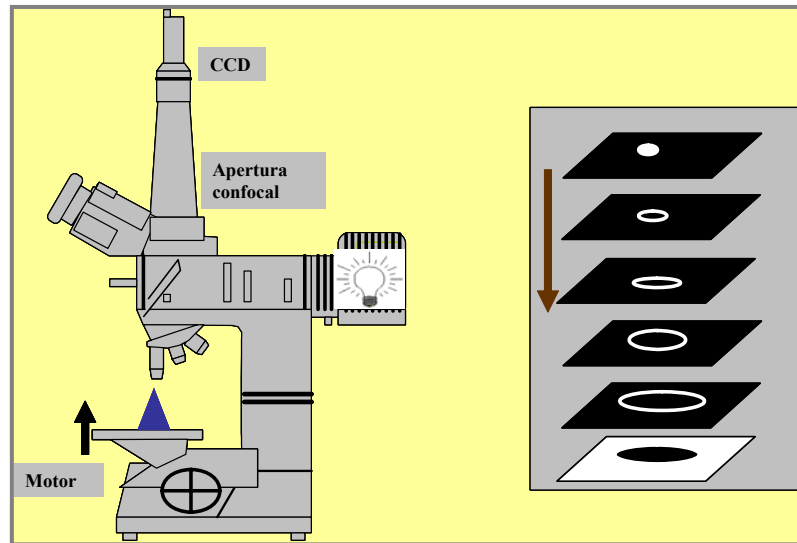


Figura 3.11. A la izquierda se muestra los componentes principales del microscopio confocal de luz blanca. A la derecha el modo y secuencia de obtención de las imágenes, por el movimiento descendente del portamuestra, en todas estas imágenes solo se forman cuando coincide la distancia focal con la zona enfocada.

La microscopía confocal de luz blanca se basa en el mismo fundamento que la microscopía confocal de luz láser. En este microscopio último, se sustituye el diafragma de pequeña apertura por un patrón de ranuras paralelas extremadamente finas. En este caso se necesitaría un conjunto de foto-detectores alineados de forma que pudieran recoger la información de todas las líneas de la rejilla. Esto se soluciona sustituyendo los foto-detectores por una cámara CCD (Charge Couple Device) que, al fin y al cabo, no es más que una malla de foto-detectores que recogerán toda la luz de las rejillas y que permitirá posicionar los puntos que se encuentren enfocados en la muestra. Esto se consigue analizando las intensidades de cada píxel de la imagen recogida por la CCD y permite escanear cada capa – imagen a una altura determinada – de una sola vez en lugar de tener que escanearla punto a punto.

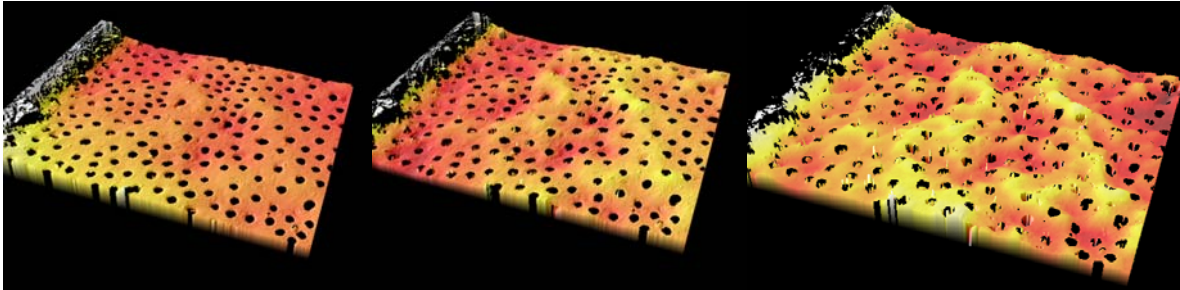


Figura 3.12. La limitada temporalidad de la superficie dentinaria desmineralizada colapsa al deshidratarse por ello se requiere instrumentos muy rápidos y no invasivos como el microscopio confocal. Nótese la deformación de la superficie dentinaria en 120 segundos.

Esto permite al microscopio confocal de luz blanca escanear miles de puntos por segundo haciéndolo idóneo para el estudio de muestras demasiado grandes para el microscopio confocal láser. Para conseguir la información de los puntos enfocados en cada capa el microscopio confocal incorpora una mesa posicionadora, controlada por unos motores piezoeléctricos, sobre la que se coloca la muestra. Esta mesa permite acercar y alejar la muestra al objetivo, en un movimiento vertical, para recoger la información de cada nivel o altura. También permite el movimiento en el plano horizontal para ubicar la región a estudiar o para realizar barridos sobre distintas regiones a fin de conseguir una topografía de mayores dimensiones. Debido a sus características y a la calidad de las topografías obtenidas con la microscopía confocal de luz blanca, estos microscopios se utilizan principalmente como rugosímetros de alta precisión. El microscopio confocal que vamos a utilizar en este trabajo es el PL $\mu$  de Sensofar-Tech S.L. que podemos ver en la Figura 3.9.

El microscopio PL $\mu$  posee cuatro objetivos de x10, x20, x50 y x100 aumentos de hasta centésimas de micra en el plano horizontal y de hasta décimas en el vertical del objetivo a utilizar. En la siguiente tabla podemos observar las condiciones de trabajo de cada uno de los objetivos del PL $\mu$ .

### 3.6 Evaluación de la superficie con microscopio de fuerzas atómicas (MFA)

Se utilizó un microscopio de fuerzas atómicas digital Nanoscope IV MultiMode (Digital Instruments, Santa Barbara, Ca, EE.UU.) (Fig.3.). Las medidas con este microscopio se realizaron en el departamento de física aplicada de la facultad de Ciencia de universidad de Granada.



Figura 3.13.: Microscopio de fuerzas atomicas

Durante la analisis el microscopio fue utilizado en función de (tapping mode). La punta palpadora está compuesta por  $\text{Si}_3\text{N}_4$  ( $k= (63\pm 8) \text{ N/m}$ ) y está montada en un un cantilever y de un haz láser que se refleja en el cantilever (Fig.3. ) El movimiento de la punta palpadora provoca variaciones en el reflejo del haz láser que son recogidos por un sensor conectado a un ordenador. La dimensión de la superficie estudiada fue de  $2500 \mu\text{m}^2$ .

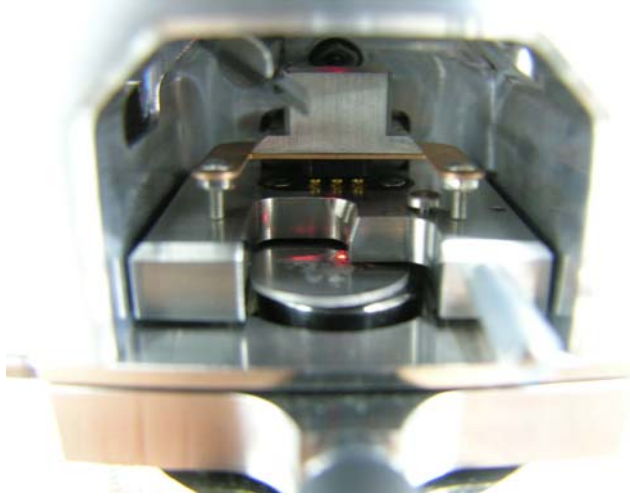


Figura 3.14.: Detalle del microscopio mientras estudia una muestra

El espécimen está montado en un tubo de material cerámico piezoeléctrico que permite movimientos en los tres ejes del espacio con precisión subnanométrica. El espécimen se pone en contacto con la punta palpadora con una fuerza no superior a los  $10^{-8}$ N y, mediante un barrido de la superficie, realiza un mapa topográfico. La resolución vertical es de aproximadamente 0,1 nm.

El MFA tiene la ventaja de mostrar la morfología de una superficie que no necesita procesamiento histológico alguno. Permite, por un lado, la observación de especímenes al fresco sin alterar su morfología o composición y, por otro lado, la realización de experimentos consecutivos en un mismo espécimen. Además, el mismo aparato mide la rugosidad Ra de una superficie, expresando los datos en nm.

Más específicamente la función tapping tiene como ventajas:

- La más alta resolución lateral de las muestras (1-5 nm).
- Movimientos más bajos y menor daño de las superficies de las muestras.
- Movimientos laterales están eliminados, así que no se producen rascaduras

Aunque sea ligeramente más lento que la opción con contacto

### 3.7 Rugosidad

Para la determinación cuantitativa de la rugosidad superficial de los discos se empleó el microscopio confocal de barrido, el microscopio de fuerza atómica (AFM) y se midió el ángulo de contacto.

#### Perfiles.

Se analizaron 3 discos de cada uno de los distintos grupos, y se realizaron 3 lecturas de rugosidad para cada uno de los discos.

#### Parámetros

Se calcularon valores para 4 parámetros de descripción vertical (o en altura) del perfil: Ra, Rq, Rmax, Srf area.

-Ra (Media aritmética de las desviaciones del perfil): es la media aritmética del valor absoluto de las distancias desde la línea media al perfil R ( $Y_i$ ) dentro de la longitud de muestra. Esta línea media es una línea de referencia para el cálculo de los distintos parámetros, que se determina por el método de los mínimos cuadrados respecto al perfil R, en cada longitud de muestra.

Ra se calcula en  $\mu\text{m}$  y es el parámetro habitualmente elegido para cuantificar de forma general la rugosidad de una superficie.

-Rq (Media de la raíz cuadrada de las desviaciones del perfil): es el valor medio de la raíz cuadrada de las desviaciones del perfil respecto a la línea media, dentro de la longitud de muestra. Este parámetro es más sensible que Ra a los valores extremos debido a la operación cuadrática. Rq tiene un significado estadístico ya que está asociado a la desviación estándar de la distribución de las alturas del perfil.

-Rmax (Máxima altura del perfil): es un valor extremo, y describe la distancia entre la altura del máximo pico  $Y_p$  y la profundidad del mayor valle  $Y_v$ , dentro de la longitud de muestra.

-Srf Area (superficie area):

### 3.8 Análisis estadístico

Para evaluar si las diferencias entre los valores obtenidos eran estadísticamente significativas se han llevado a cabo comparaciones múltiples con ANOVA con post hoc de Tukey, considerando como factor las cuatro superficies y como variables dependientes los valores de ángulo de contacto, los valores de rugosidad obtenidos con el microscopio confocal, los valores de rugosidad obtenidos con el microscopio de fuerzas atómicas. Se considera que las diferencias son estadísticamente significativas siempre que el p-valor  $< 0,05$ , y un intervalo de confianza al 95%.

Todos estos tests estadísticos se llevaron a cabo con la ayuda del programa SPSS.

### 3.9 Análisis química de la superficie con retrodispersión de electrones

Se utilizó un aparato que utiliza la retrodispersión de electrones para detectar la presencia de elementos químicos que se piensa pueden estar.

### 3.10 Evaluación de la superficie con microscopio electrónico de barrido

La microscopía electrónica de barrido se utilizó para el análisis morfológico de las diferentes superficies. La obtención de estos discos requirió del montaje y pulido previo de las muestras descrito anteriormente.

Los especímenes, se cementaron en portamuestras de aluminio para MEB y se cubrieron con carbono (Fig. 3. .) durante ...minuto a... mA utilizando una unidad de cobertura Polaron E-5000 (Polaron Equipment; Walford; Inglaterra) (Fig. 3. .). Los especímenes fueron observados en un microscopio electrónico de barrido Zeiss DSM 950 (Carl Zeiss, Alemania) (Fig. 3. .).





Fig. 3.13.: Microscopio electrónico.



Fig. 3.14.: Máquina Para el recubrimiento con carbon de las muestras previo a la lectura con microscopio electrónico.

Se llevó a cabo un análisis morfológico de la superficie, y un análisis cuantitativo de la amplitud de los poros de las superficies grabada y arenada-grabada utilizando un programa informático.

### 3.10 Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis de comparaciones de medias de la anchura de los poros entre la superficie grabada y arenada-grabada. Se considera que las diferencias son estadísticamente significativas siempre que el p-valor  $< 0,05$ , y se ha tomado un intervalo de confianza del 95%.

El análisis estadístico se ha llevado a cabo con la ayuda del programa SPSS.

### 3.11. Estudio de la adhesión celular

Los distintos ensayos se realizaron con la línea MG-63, esta es una línea tipificada de osteoblastos, que se obtuvo a partir de tejido óseo humano, procedente de un varón caucásico de 14 años con osteosarcoma (ATCC: CRL-1427); la cual, fue proporcionada por la ATCC (American Type Culture Collection), a través del Centro de Instrumentación Científica de nuestra Universidad.

### 3.12. Cultivo de la línea MG-63

Las células se cultivaron en frasco de cultivo 25 cm<sup>2</sup> de superficie (Falcon, Labware, Oxford, UK), con 10 ml de medio DMEM (Gibco, Cell Culture Products, Carlsbad, CA), suplementado con 100 UI/ml de penicilina (Lab Roger S.A., Barcelona, España); 50 µg/ml de gentamicina (Braun Medical S.A., Jaén, España); 2.5 µg/ml de anfotericina B (Sigma, St Louis, MO, USA); L-Glutamina al 1% (Sigma, St Louis, MO, USA); HEPES al 2% (Sigma, St Louis, MO, USA) y un 10% de suero bovino fetal (SBF), (Gibco, Paisley, UK) que previamente, había sido descomplementado en un baño a 56°C, durante 30 minutos. Las células se cultivan en este medio a 37°C, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% hasta conseguir un crecimiento semiconfluyente.

La línea MG-63, crece adherida a la superficie del frasco de cultivo, por lo que, una vez cultivados los osteoblastos según el procedimiento descrito anteriormente, es necesario despegarlos del frasco de cultivo, ya sea el subcultivo o para su estudio o tratamiento. Para despegar las células del frasco de cultivo, se utilizan 10 ml de una solución de Tripsina-EDTA (Sigma, St Louis, MO, USA) durante 10 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se neutraliza la actividad enzimática con otros 10 ml de medio DMEM suplementado al 10% con SBF. La suspensión celular obtenida se deposita en un frasco universal y se centrifuga a 1200 rpm durante 10 minutos. El sedimento obtenido se resuspende en medio de cultivo.

### 3.13. Efecto de diferentes superficies de titanio en la línea MG-63

Hemos estudiado el efecto de diferentes superficies de titanio sobre la adhesividad celular de la línea MG-63. Para este estudio hemos seleccionado un total de cuatro

superficies de titanio c.p., escogidas fundamentalmente por su utilidad clínica: lisa (control), arenada, grabada, arenada-grabada. Dichas superficies son colocadas en el seno de una suspensión celular de la línea MG-63 en condiciones de cultivo, con objeto de determinar *in vitro* el efecto de dichas superficies sobre la adhesión de esta población celular. Con dichas superficies hemos tratado, *in vitro*, la línea MG-63 con objeto de determinar su efecto sobre la adhesividad celular.

#### 3.14. Efecto sobre la adhesividad celular:

Las células utilizadas en nuestro estudio se suspenden en medio DMEM suplementado con un 10% de SBF y se ajustan a una densidad celular de  $2 \times 10^5$  células/ml. Dicha suspensión celular se dispone en placas de cultivo de 24 pocillos (Falcon, Becton Dickinson Labware, N.J., USA), a razón de 2 ml/pocillo; en las que previamente se han dispuesto los discos de titanio con las distintas superficies a estudiar (lisa, arenada, grabada, arenada-grabada). Posteriormente, las placas se incuban a 37° C en atmósfera de CO<sub>2</sub> (5%), Los discos son recogidos a distintos tiempos de incubación: 180 min, 24, 48 y 72 horas, con objeto de determinar el número de células adheridas a la superficie del disco. Una vez transcurrido el periodo de incubación, se recogen los discos y se tratan con 2 ml de una solución de Tripsina-EDTA a 37°C durante 10 minutos con agitación. Transcurrido este tiempo, se neutraliza la actividad enzimática con 2 ml de medio de cultivo suplementado al 10% con SBF. La suspensión celular obtenida se deposita en un frasco universal y se centrifuga a 1200 rpm durante 10 minutos en frío. El sedimento, así obtenido, se suspendió en 100 µl de PBS, para proceder al recuento del número de células, para lo cual se utilizó un citometro de flujo (Ortho Cytoron Absolute (Ortho Diagnostic System, Raritan, USA).

Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado.

Los resultados se han expresado en nº células/ml.

#### 3.15. Análisis estadístico

Para evaluar si las diferencias entre los valores obtenidos eran estadísticamente significativas se han llevado a cabo comparaciones múltiples con ANOVA con test de Tukey, considerando como factor el tratamiento de superficie y como variable dependiente el valor de adhesión celular.

Por otro lado se han llevado a cabo comparaciones multiples con el mismo tipo de análisis considerando como factor los intervalos de tiempo y como variable dependiente la adhesión celular.

Se escogió el intervalo de confianzaal 95%. Las diferencias son estadísticamente significativas siempre que el p-valor < 0,05.

Todos estos tests estadísticos se llevaron a cabo con la ayuda del programa SPSS.

### 3.16. Evaluación de la morfología celular mediante microscopio electrónico de barrido.

Un disco de cada serie se fijó con glutaraldehido (Agar Scientific, Reino Unido) al 2,5 % en tampón cacodilato (Agar Scientific, Reino Unido) durante 2 horas a 4 o 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 carbón y se visualizaron por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB) (XL30, Philips, Holanda).

# Capítulo 4: Resultados

Los resultados obtenidos se dividen en dos grupos. Por un lado, los correspondientes a la rugosidad, humectabilidad y morfología de las superficies estudiadas, y por otro lado, los relativos a la adhesión celular.

## 4.1 Influencia del tratamiento en la humectabilidad y rugosidad.

En este apartado se han estudiado varias variables dependientes: el ángulo de contacto, los parámetros de rugosidad obtenidos con el Microscopio de Fuerzas Atómicas y Microscopio Confocal; y la variable independiente: el tratamiento de superficie. Para cada parámetro se ha efectuado un análisis de la varianza (tablas 4.1, 4.3, 4.5, 4.7, 4.9, 4.11, 4.13, 4.15, 4.17) previo a las comparaciones múltiples y una vez averiguado que hay diferencia significativa entre las medias se ha utilizado el test de Tukey (tablas 4.10, 4.12, 4.14, 4.16, 4.18) para ver la entidad de estas diferencias estadísticas, en estas tablas están expresados los resultados como media (DE). En todos los parámetros de rugosidad hay diferencias significativas entre las cuatro superficies.

## 4.2 Influencia del tratamiento y intervalos de tiempo en la adhesión celular.

En este apartado se han estudiado como variables dependientes: la adhesión celular y como factor el tratamiento de superficie seleccionando casos en los intervalos de tiempo. Se ha utilizado como para los demás parámetros del apartado anterior un análisis de la varianza (tablas 4.19, 4.21, 4.23, 4.25) previo a las comparaciones múltiples entre medias y una vez averiguado que hay diferencia significativa entre las medias se ha utilizado el test de Tukey (tablas 4.20, 4.22, 4.24).

En la segunda parte de la adhesión celular se ha utilizado como variable dependiente: la adhesión celular y como factor los intervalos de tiempo seleccionando casos entre los tratamientos de superficie (tablas 4.27-4.34).

Tabla 4.1.: Resultados del análisis de la varianza previo a las comparaciones múltiples en cada grupo.

Variable dependiente: ángulo de contacto.

Ángulo de contacto en:	F	P
Superficies Titanio	47,732	,000

Tabla 4.2.: Media (DE) del ángulo de contacto en los distintos grupos de estudio, Anova. Test de Tukey.

Variable dependiente: ángulo de contacto.

Factor: Tratamiento de superficie.

Superficie	Media	Desv. estándar	P	Intervalo de confianza	
				Límite inferior	Límite superior
Lisa	62	4			
Arenada	53	3	,000	4,1	12,8
Grabada	46	2	,000	10,8	20,3
Arenada-grabada	40	2	,000	16,3	27,1

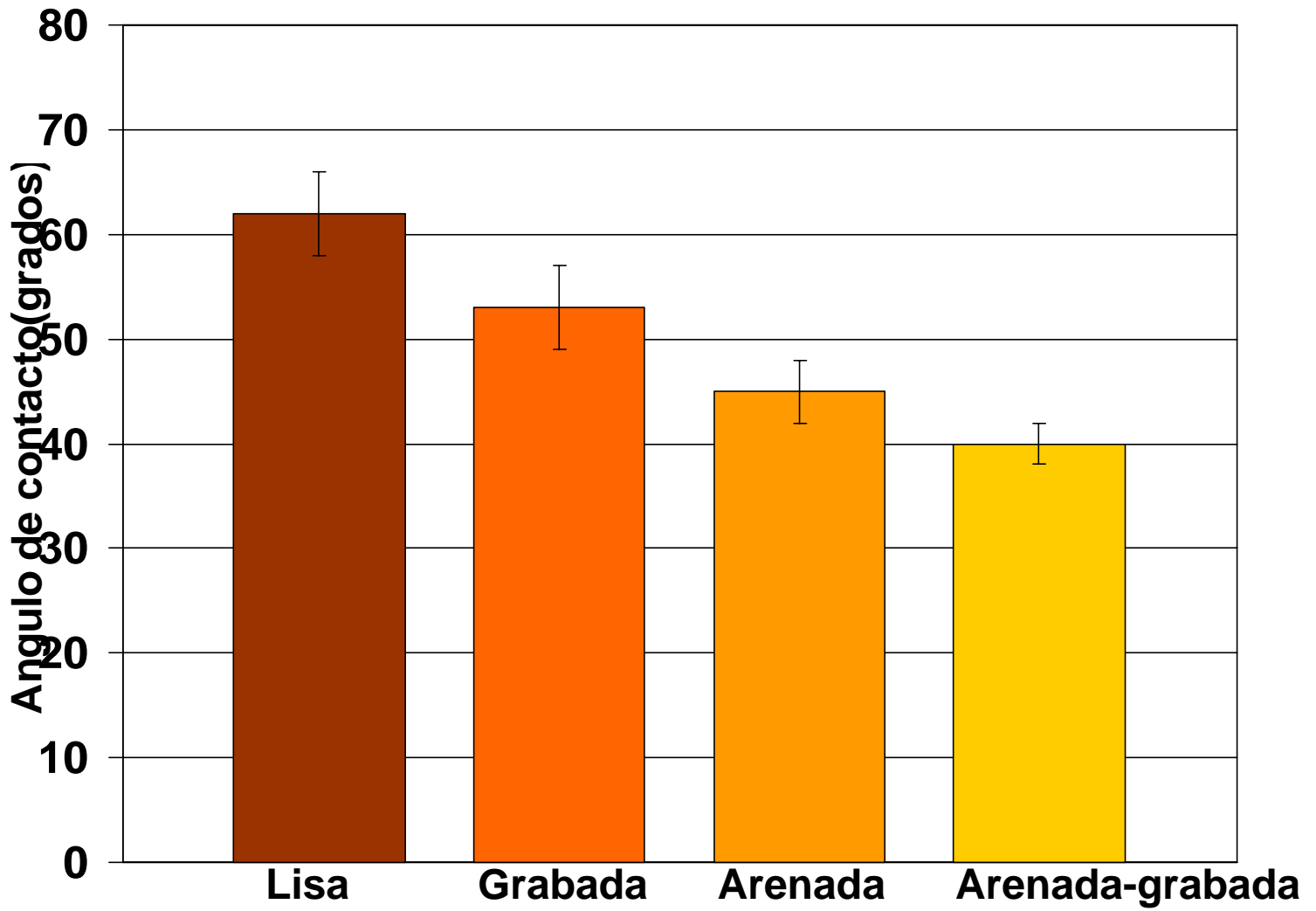


Figura 4.1.: Ángulo de contacto medio y desviación estandar obtenido en las cuatro superficies estudiadas.

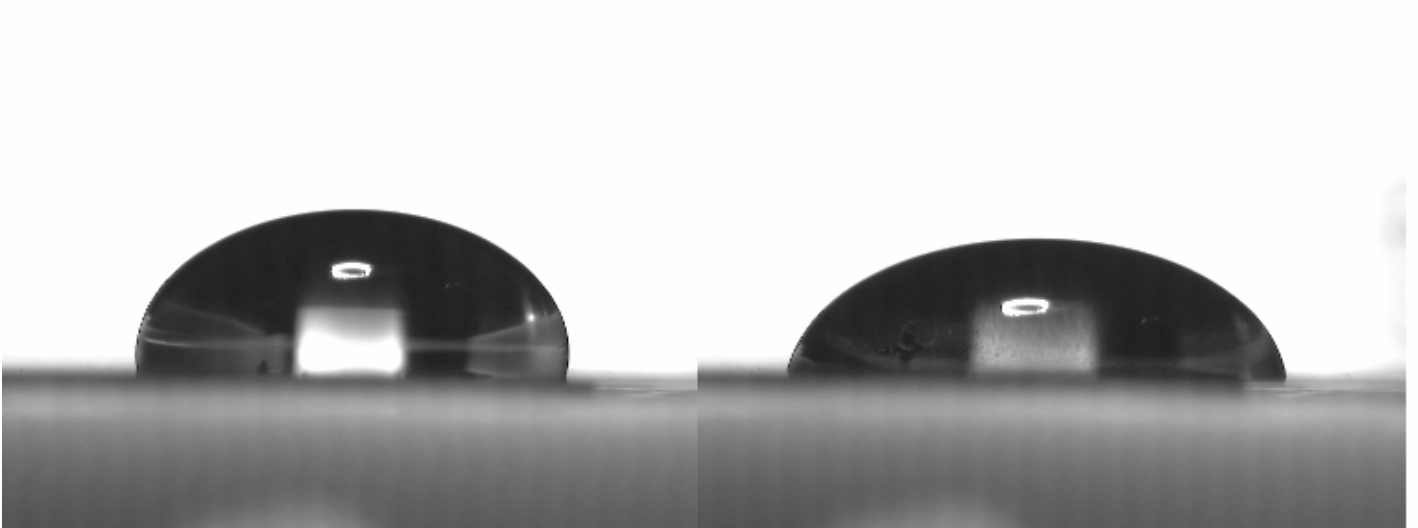


Figura 4.2.: Fotos de gotas sésiles en la superficies lisa y arenada.

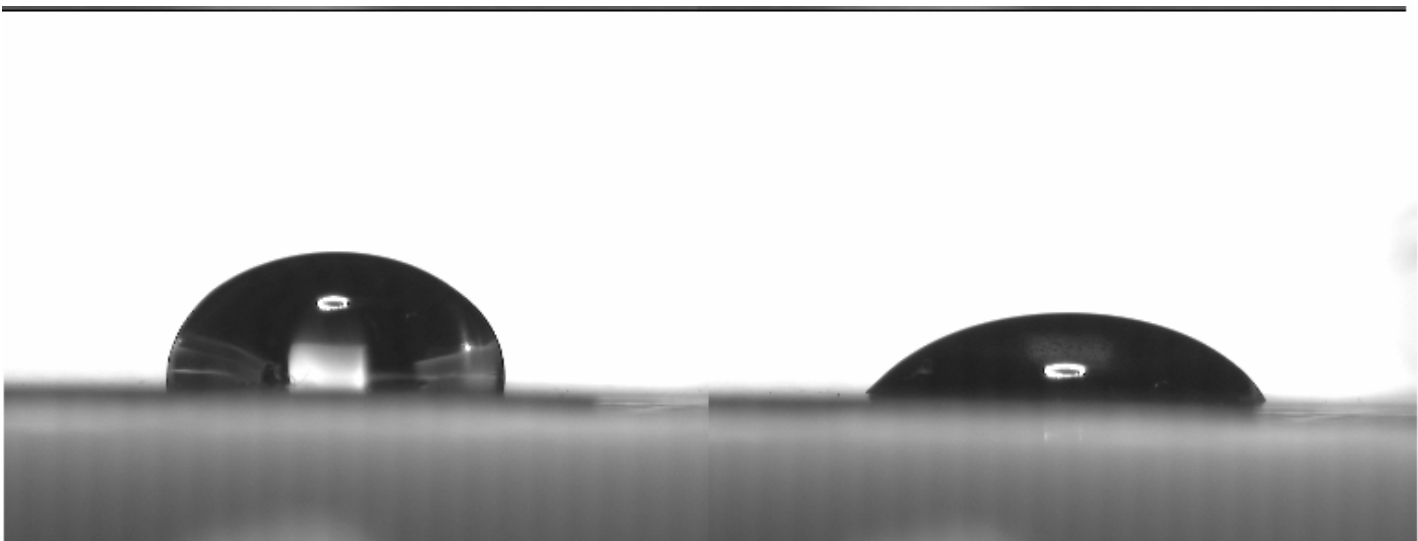


Figura 4.3.: Fotos de gotas sésiles en la superficies grabada y arenada-grabada.



Microscopio confocal de barrido

Tabla 4.3.: Resultados del análisis de la varianza previo a las comparaciones múltiples en cada grupo.

Variable dependiente: Microscopio confocal Ra con magnificación 20X.

Microscopio confocal 20X en:	F	P
Superficies Titanio	1,86	,000

Tabla 4.4.: Media (DE) del parámetro Ra con magnificación 20X del MCB en los distintos grupos de estudio. Anova. Test de Tukey.

Variable dependiente: Microscopio confocal parámetro Ra con magnificación 20X.

Factor: Tratamiento de superficie.

Superficie	Media	Desv. estándar	P	Intervalo de confianza	
				Límite inferior	Límite superior
Lisa	3,8	0,1			
Arenada	4,8	0,6	,000	-7,24	-5,46
Grabada	6,7	0,7	,000	-5,19	-3,22
Arenada-grabada	8,9	0,5	,000	-9,49	-7,25

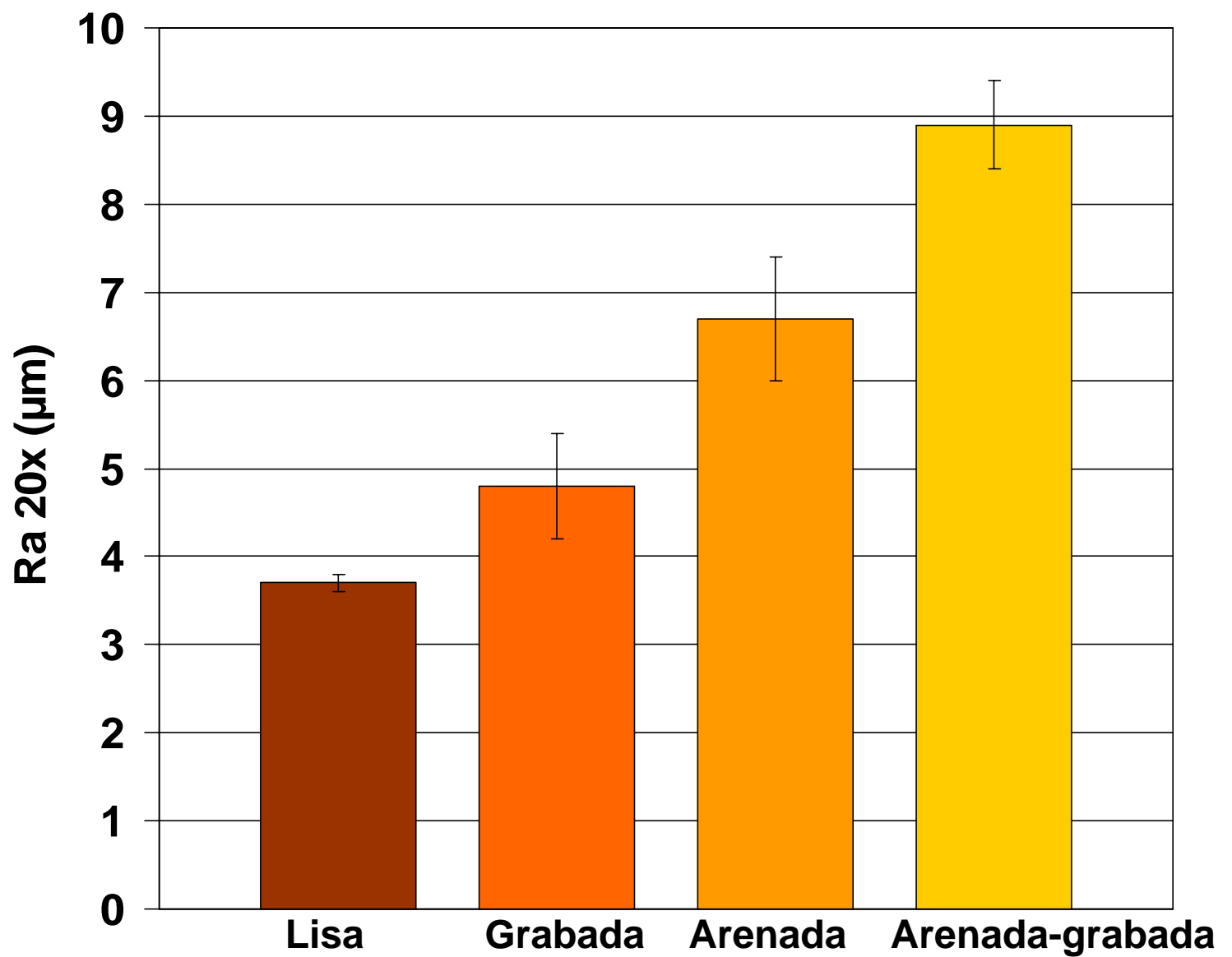


Figura 4.4.: Rugosidad Ra medida con microscopio confocal con una magnificación de 20X en las cuatro superficies estudiadas.

Microscopio confocal de barrido

Tabla 4.5.: Resultados del análisis de la varianza previo a las comparaciones múltiples en cada grupo.

Variable dependiente: Microscopio confocal parámetro Ra con magnificación 50X.

Microscopio confocal 20X en:	F	P
Superficies Titanio	2,85	,000

Tabla 4.6.: Media (DE) del ángulo de contacto en los distintos grupos de estudio. Anova. Test de Tukey.

Variable dependiente: Microscopio confocal parámetro Ra con magnificación 50X.

Factor: Tratamiento de superficie

Superficie	Media	Desv. estándar	P	Intervalo de confianza	
				Límite inferior	Límite superior
Lisa	1,5	0,4			
Arenada	2,5	0,3	,000	-3,09	-2,38
Grabada	3,1	0,4	,000	-2,68	-1,89
Arenada-grabada	4,4	0,3	,000	-4,87	-3,98

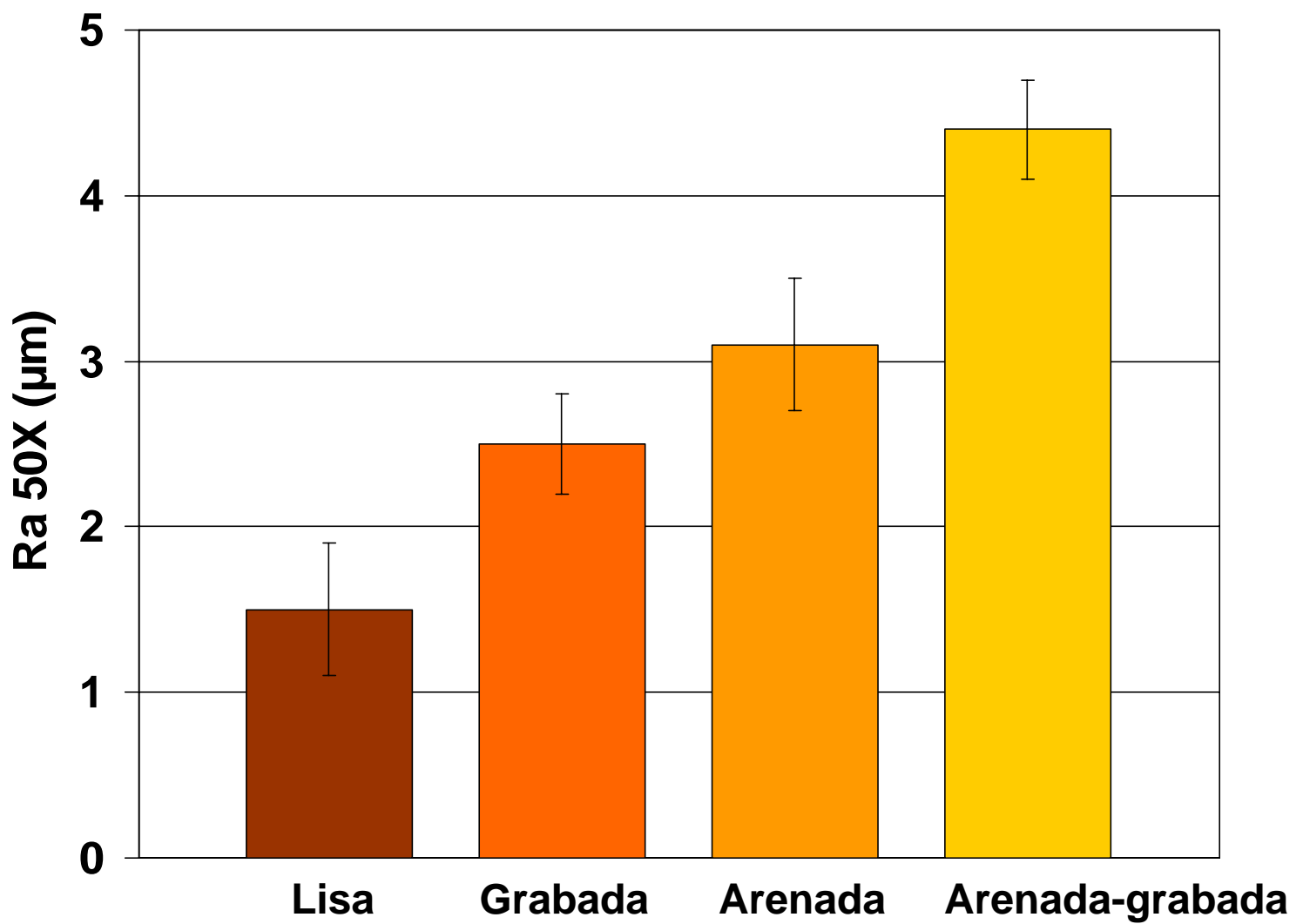


Figura 4.5.: Rugosidad Ra medida con microscopio confocal con una magnificación de 50X en las cuatro superficies estudiadas.

Tabla 4.7.: Resultados del análisis de la varianza previo a las comparaciones múltiples en cada grupo.

Variable dependiente: Microscopio confocal parámetro RMS con magnificación 20X.

Microscopio confocal RMS 20X en:	F	P
Superficies Titanio	3,46	,000

Tabla 4.8.: Media (DE) del parámetro RMS con magnificación 20X del MCB en los distintos grupos de estudio. Anova. Test de Tukey.

Variable dependiente: Microscopio confocal parámetro RMS con magnificación 20X.

Factor: Tratamiento de superficie.

Superficie	Media	Desv. estándar	P	Intervalo de confianza	
				Límite inferior	Límite superior
Lisa	4,3	0,4			
Arenada	7,8	0,3	,000	-8,16	-6,67
Grabada	5,5	0,6	,000	-5,92	-4,27
Arenada-grabada	9,7	0,3	,000	-10,2	-8,34

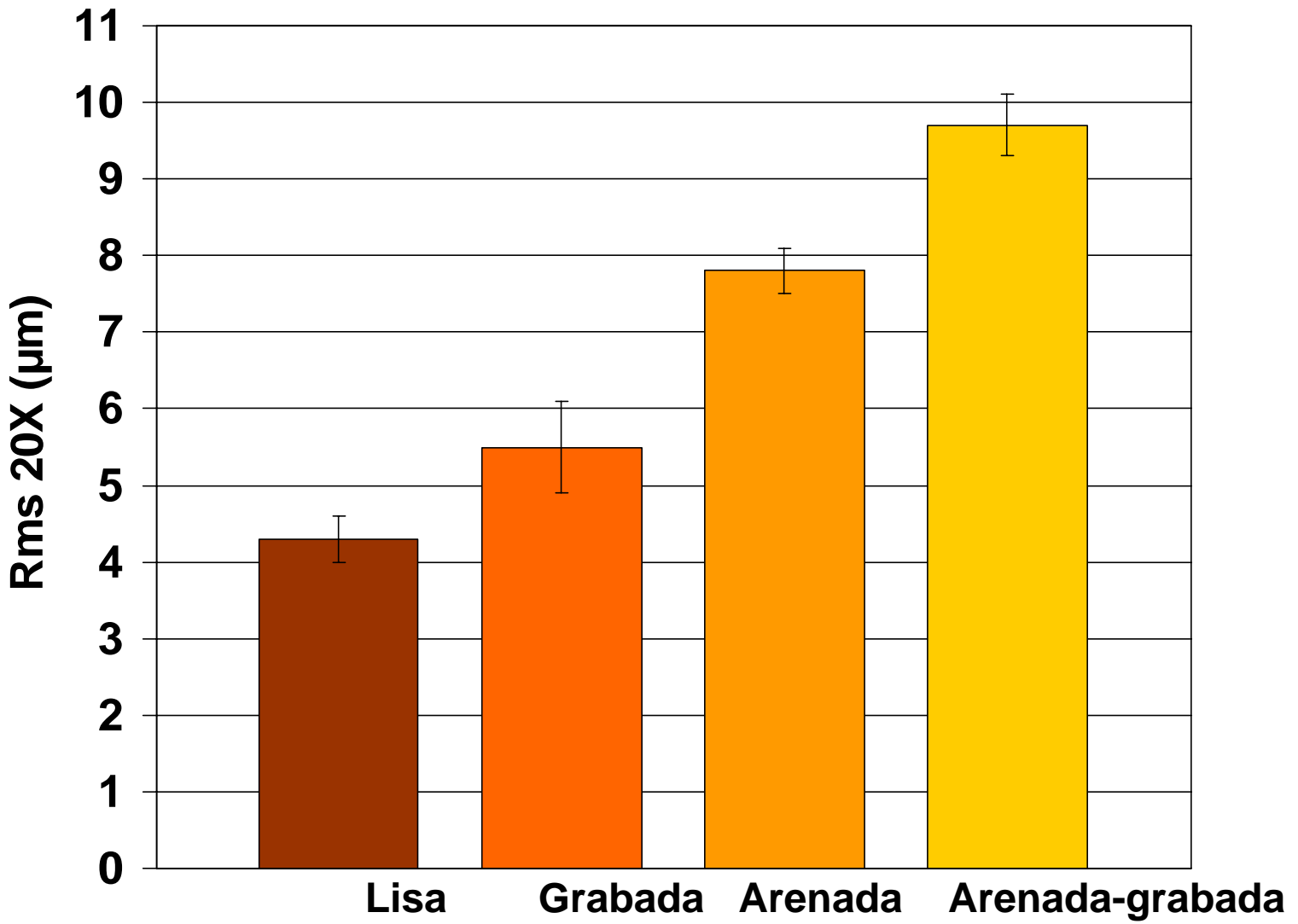


Figura 4.6.: Rugosidad Ra medida con microscopio confocal con una magnificación de 20X en las cuatro superficies estudiadas.

Tabla 4.9.: Resultados del análisis de la varianza previo a las comparaciones múltiples en cada grupo.

Variable dependiente: Microscopio confocal parámetro RMS con magnificación 50X.

Microscopio confocal RMS 50X en:	F	P
Superficies Titanio	2,42	,000

Tabla 4.10.: Media (DE) del parámetro RMS con magnificación 50X del MCB en los distintos grupos de estudio. Anova. Test de Tukey.

Variable dependiente: Microscopio confocal parámetro RMS con magnificación 50X.

Factor: Tratamiento de superficie.

Superficie	Media	Desv. estándar	P	Intervalo de confianza	
				Límite inferior	Límite superior
Lisa	1,8	0,6			
Arenada	3,5	0,4	,000	-3,67	-2,83
Grabada	3,8	0,5	,000	-3,77	-2,84
Arenada-grabada	4,5	0,3	,000	-4,79	-3,74

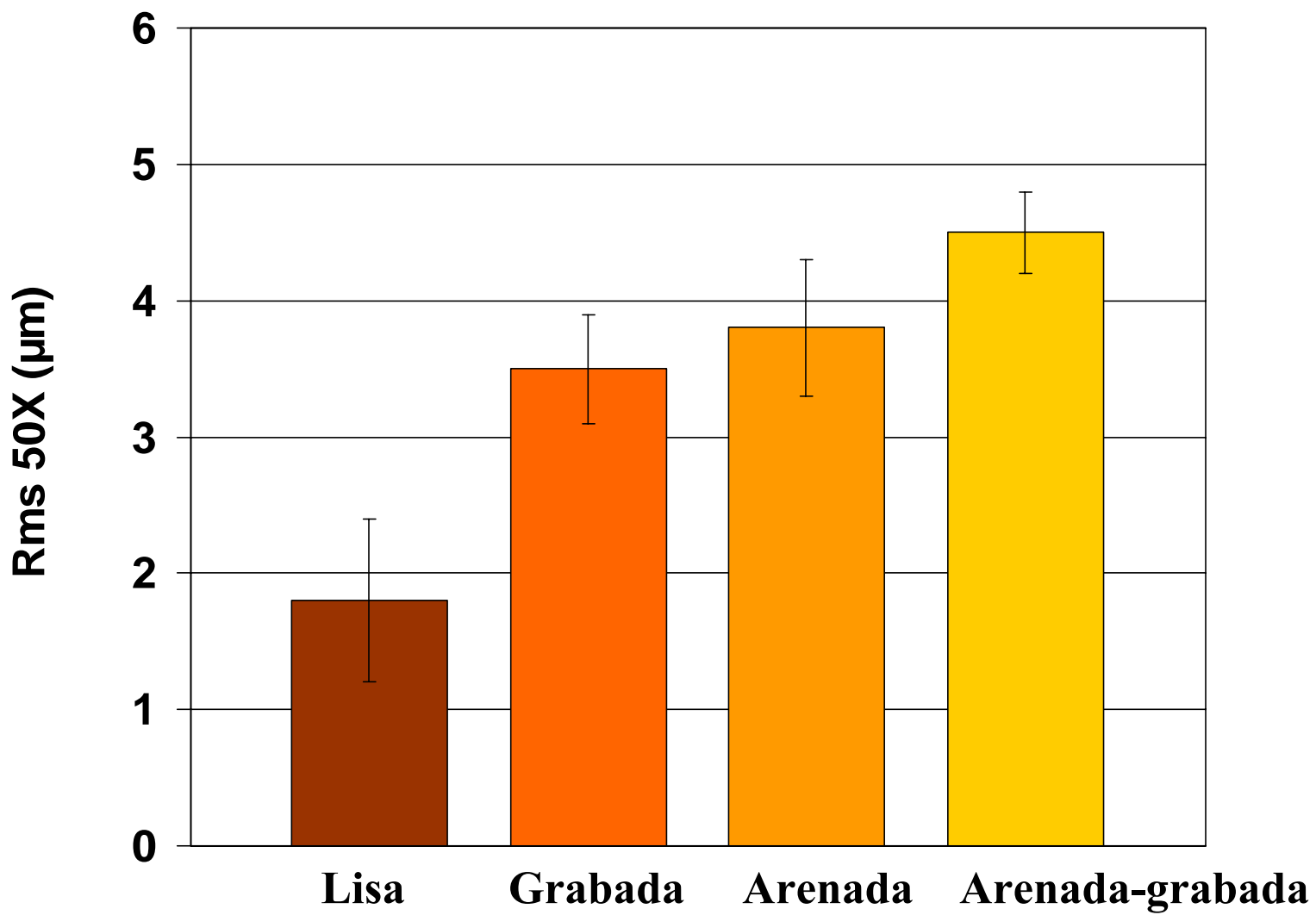


Figura 4.7.: Rugosidad Rms medida con microscopio confocal con una magnificación de 50X en las cuatro superficies estudiadas.



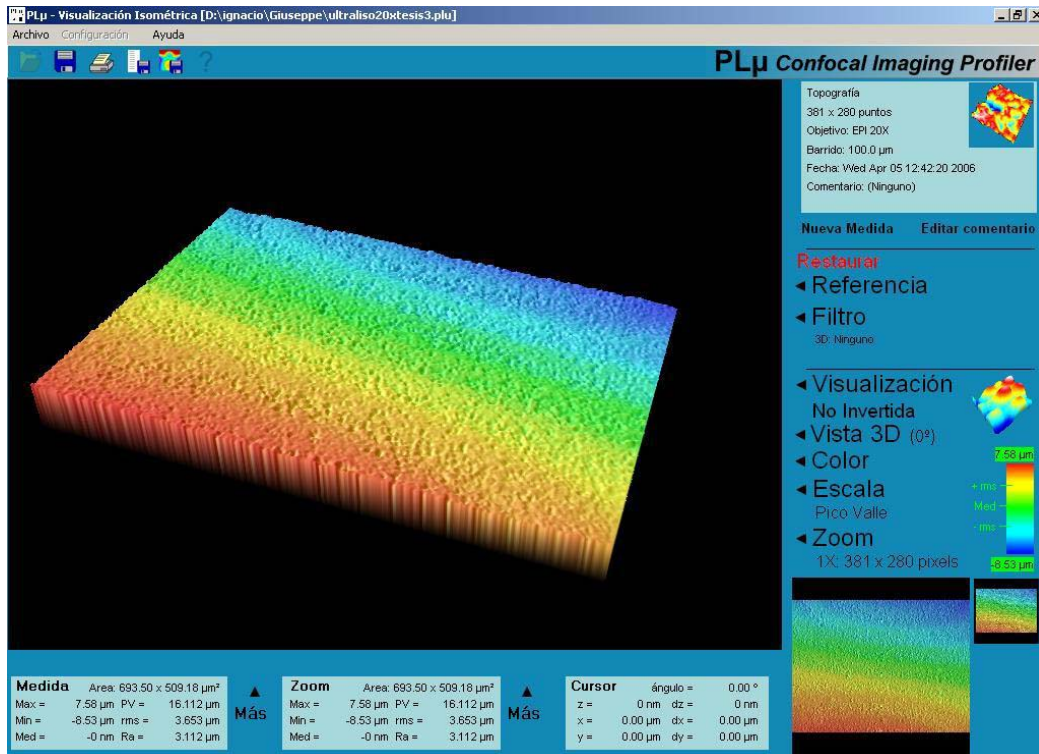


Figura 4.8.: Imagen tridimensional de MCB de la superficie lisa con aumento de 20x.

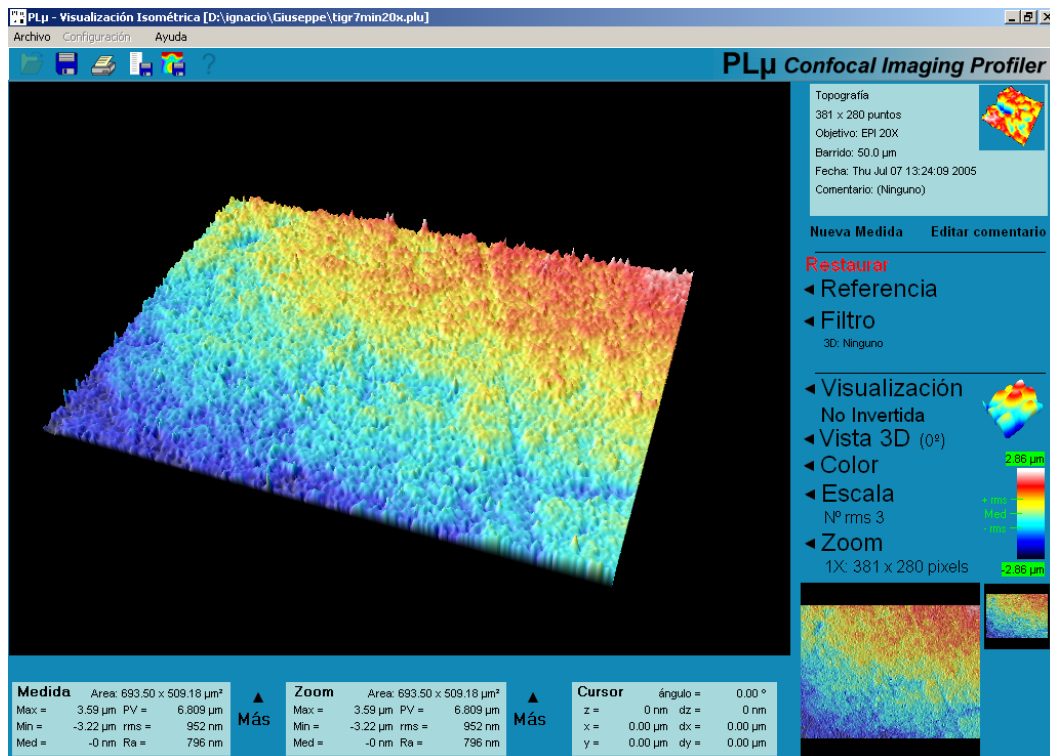


Figura 4.9.: Imagen tridimensional de MCB de la superficie grabada con aumento de 20x.

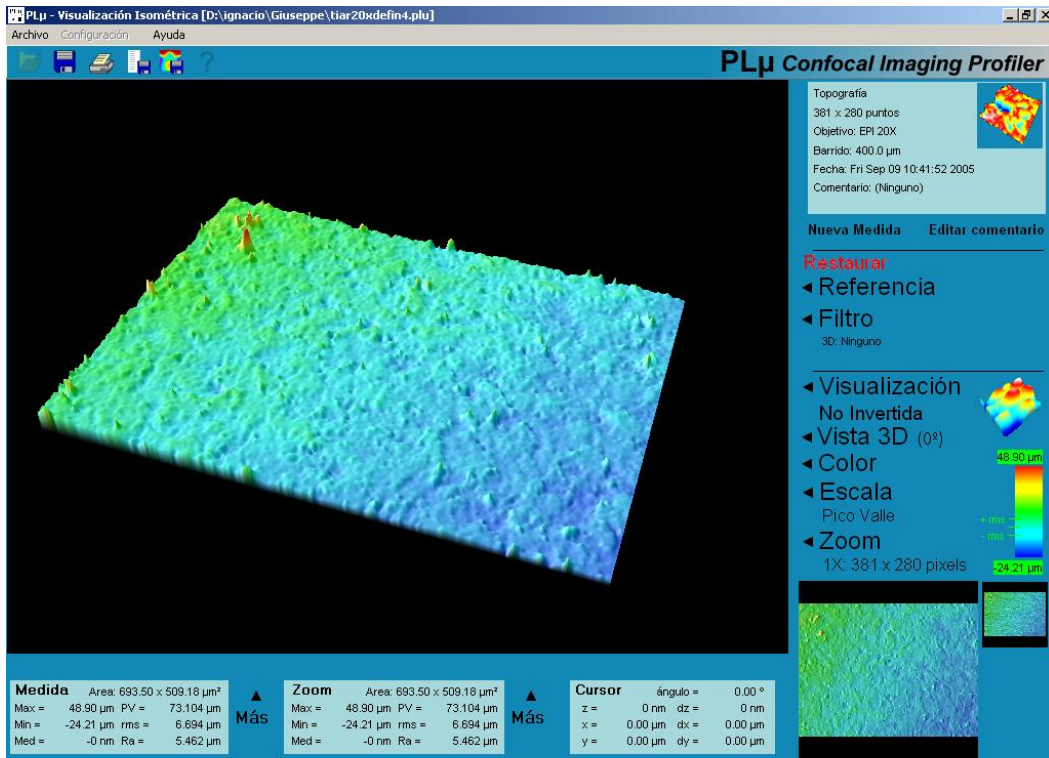


Figura 4.10.: Imagen tridimensional de MCB de la superficie arenada con aumento de 20x.

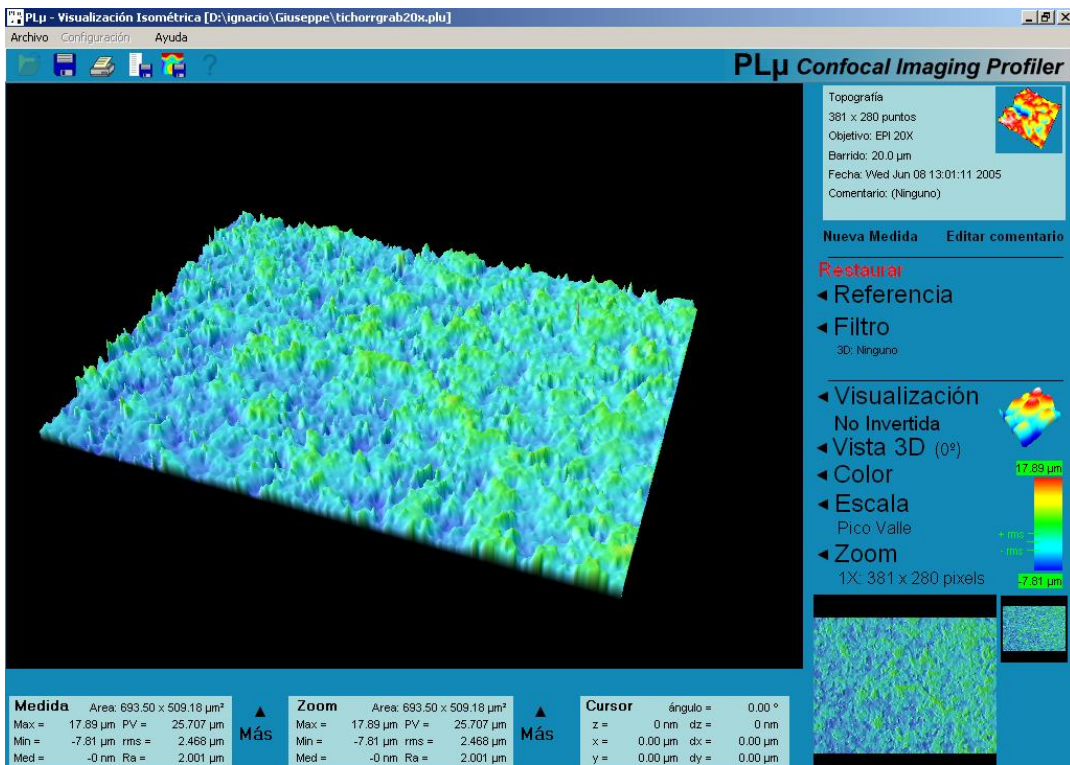


Figura 4.11.: Imagen tridimensional de MCB de la superficie arenada-grabada con aumento de 20x.

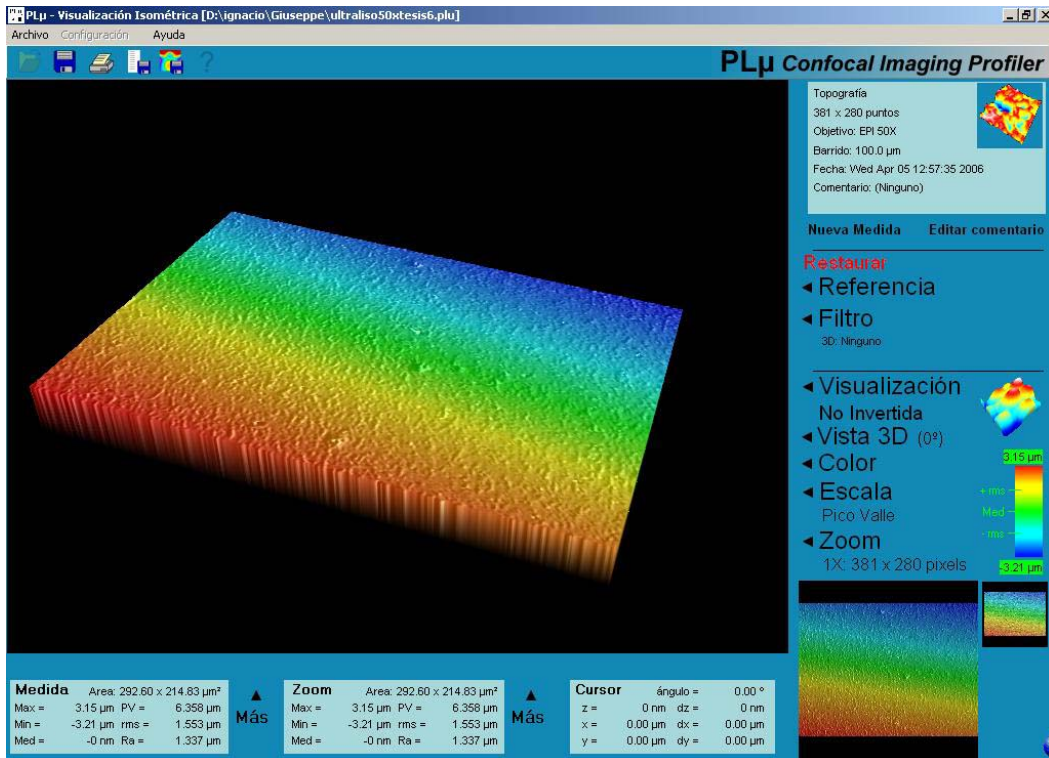


Figura 4.12.: Imagen tridimensional de MCB de la superficie lisa con aumento de 50x.

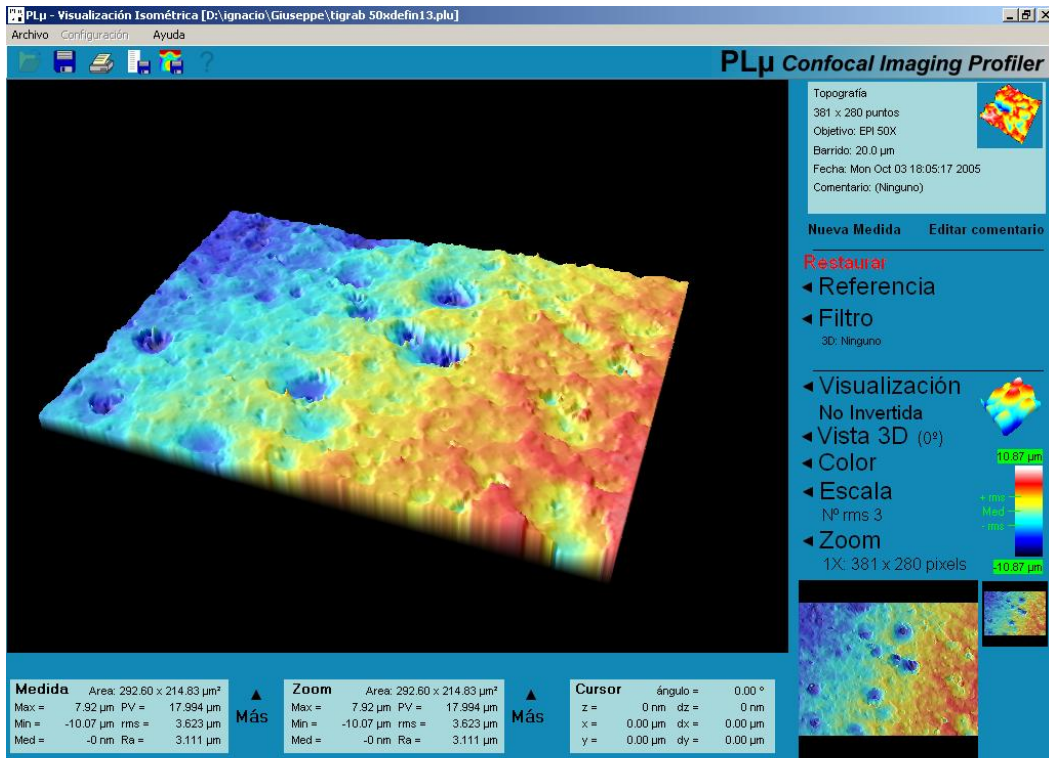


Figura 4.13.: Imagen tridimensional de MCB de la superficie grabada con aumento de 50x.



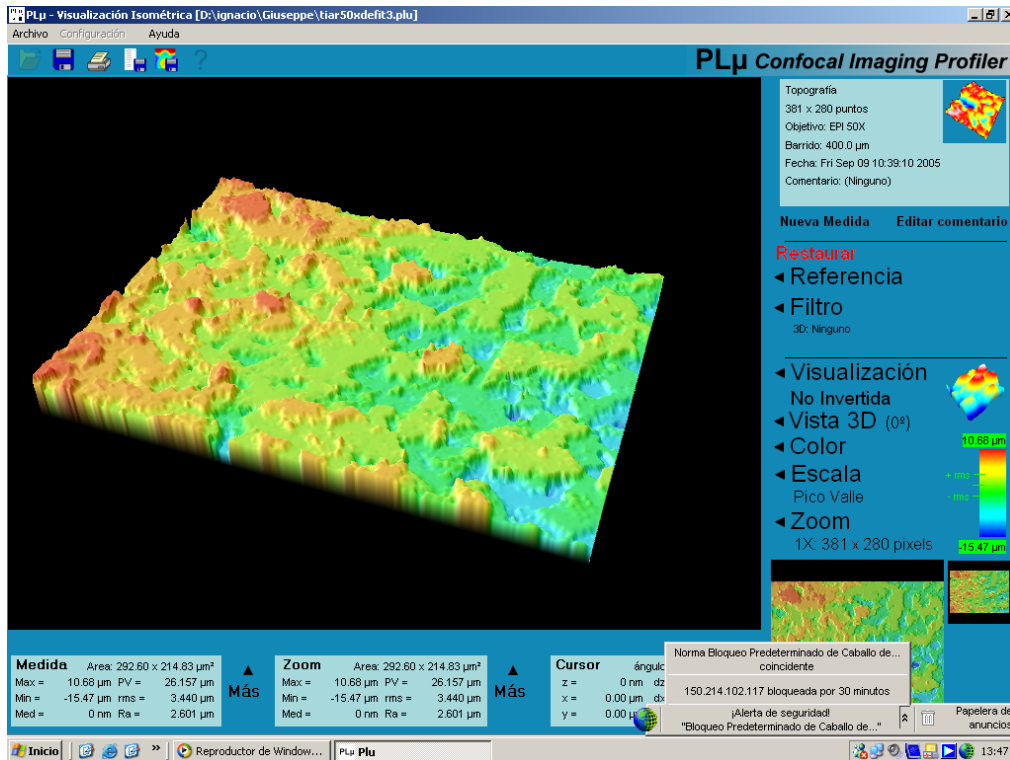


Figura 4.14.: Imagen tridimensional de MCB de la superficie arenada con aumento de 50x.

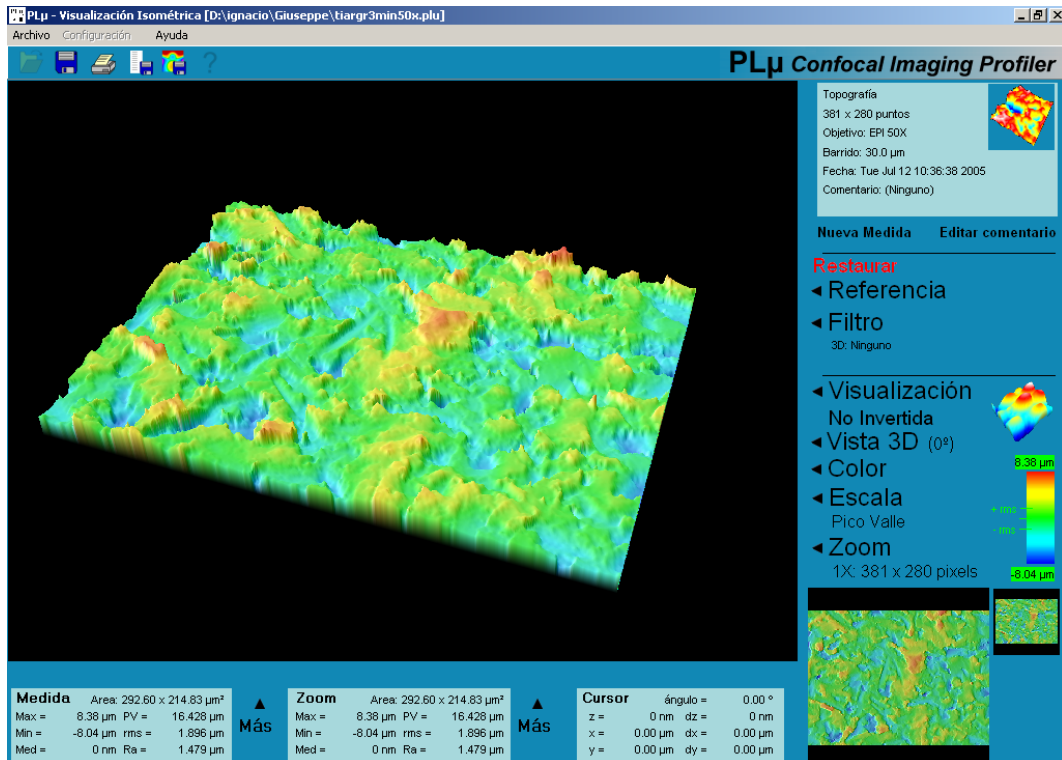


Figura 4.15.: Imagen tridimensional de MCB de la superficie arenada-grabada con aumento de 50x.

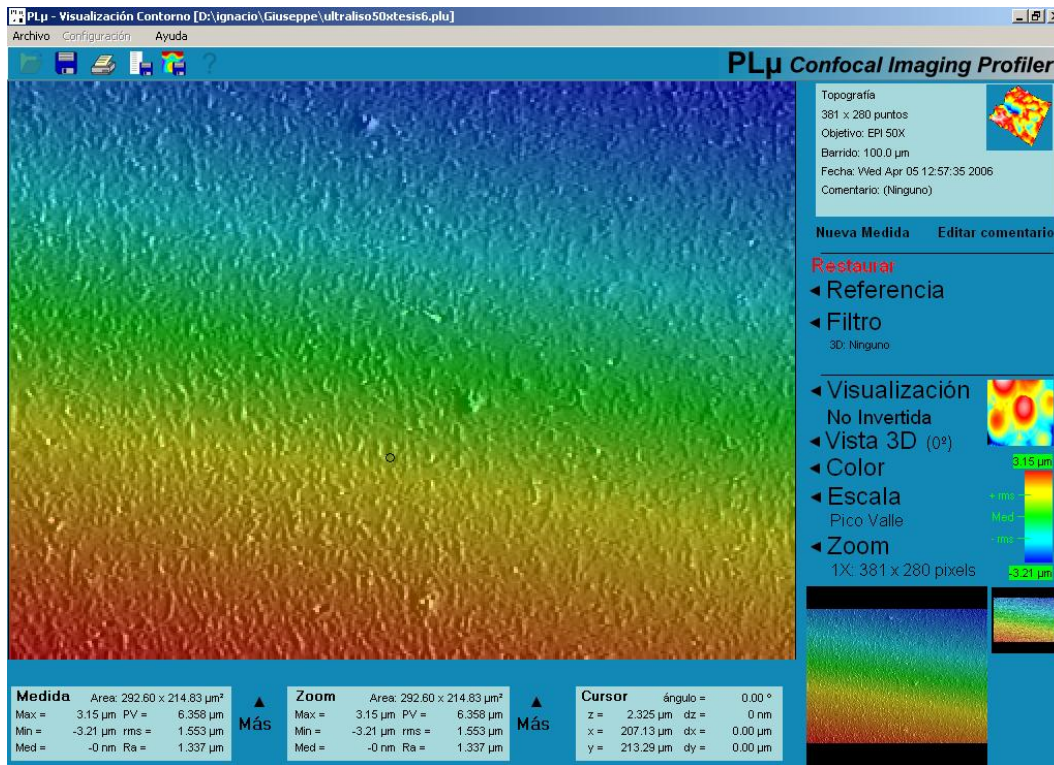


Figura 4.16.: Imagen bidimensional de MCB de la superficie lisa con aumento de 50x.

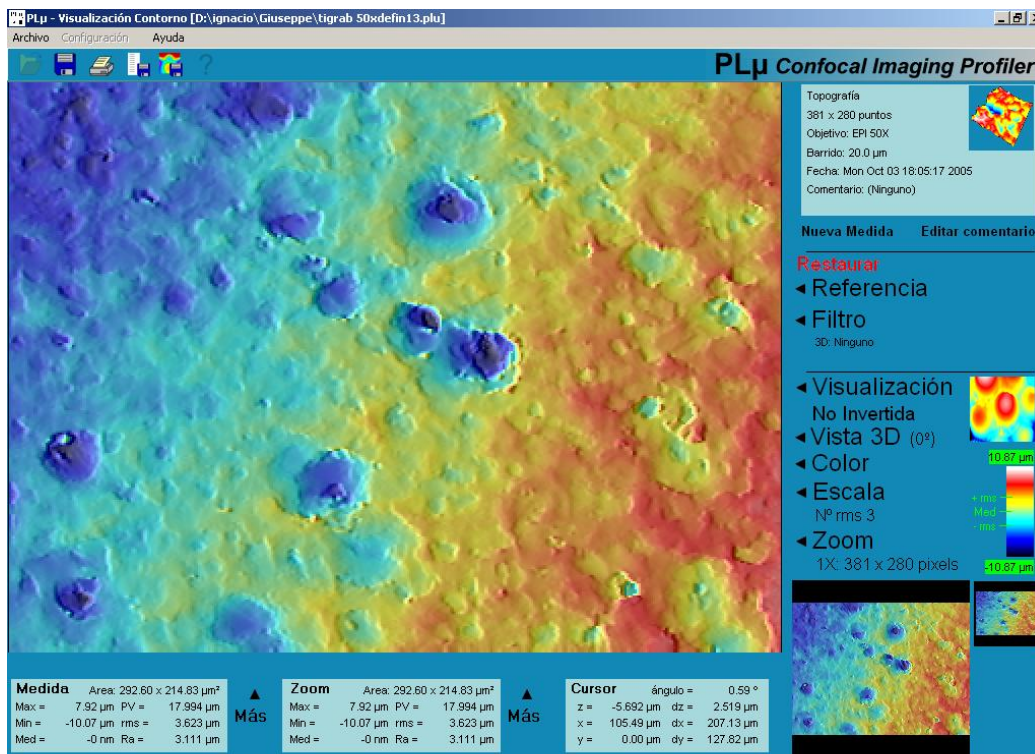


Figura 4.17.: Imagen bidimensional de MCB de la superficie grabada con aumento de 50x.



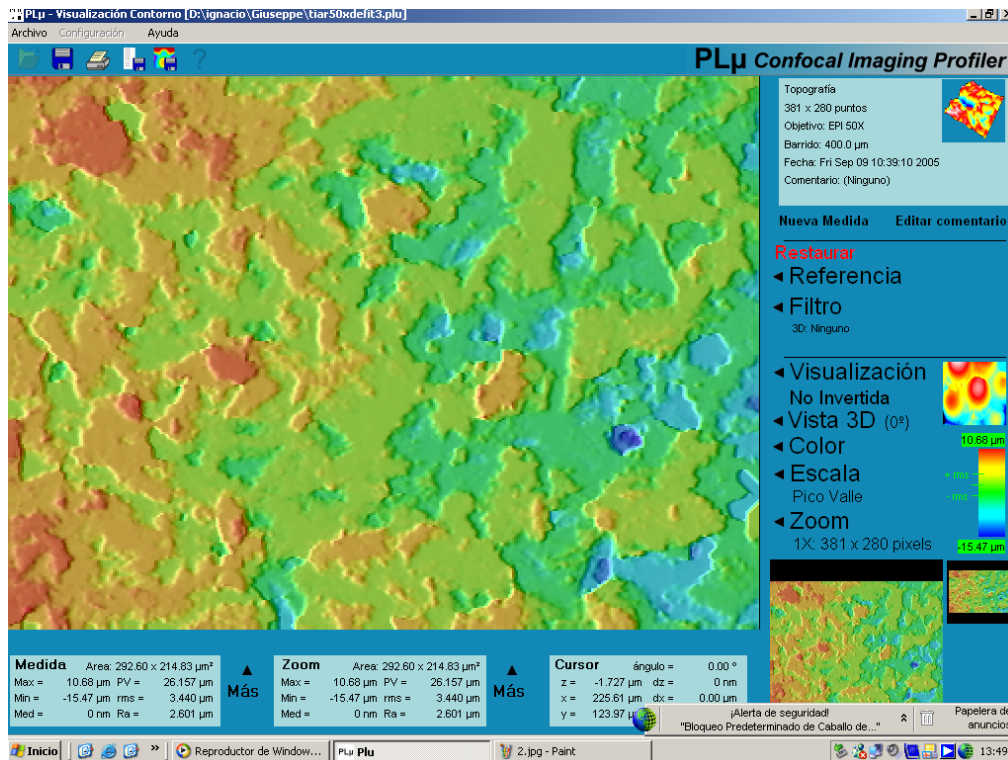


Figura 4.18.: Imagen bidimensional de MCB de la superficie arenada con aumento de 50x.

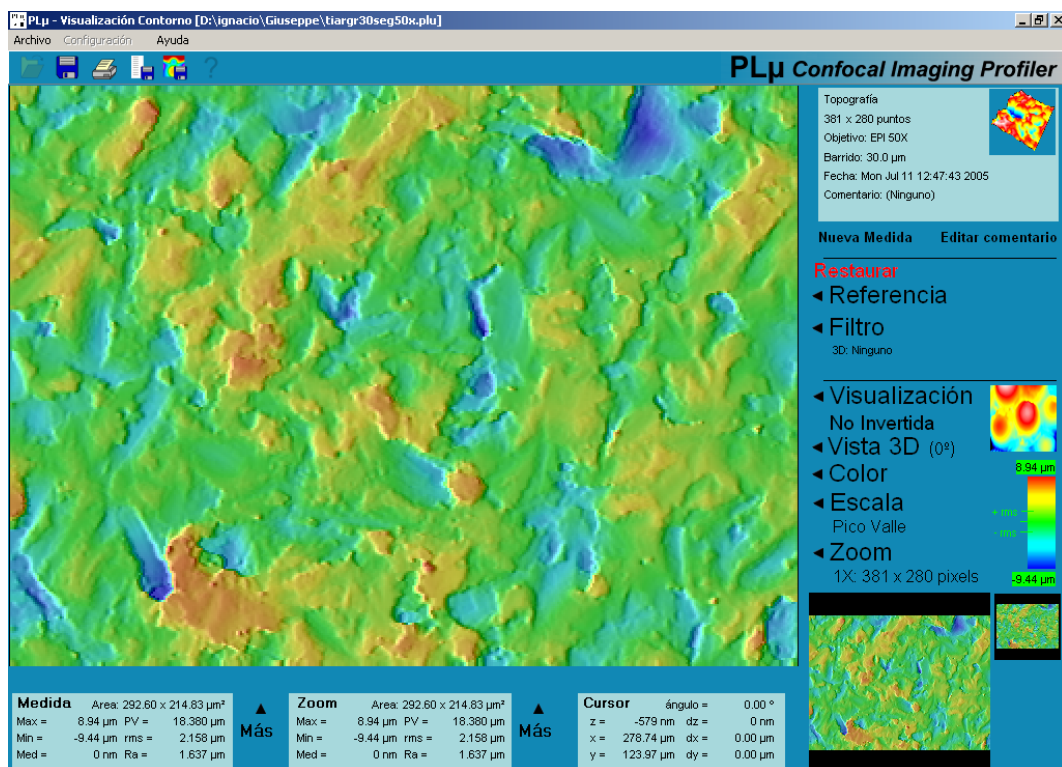


Figura 4.19.: Imagen bidimensional de MCB de la superficie arenada-grabada con aumento de 50x.

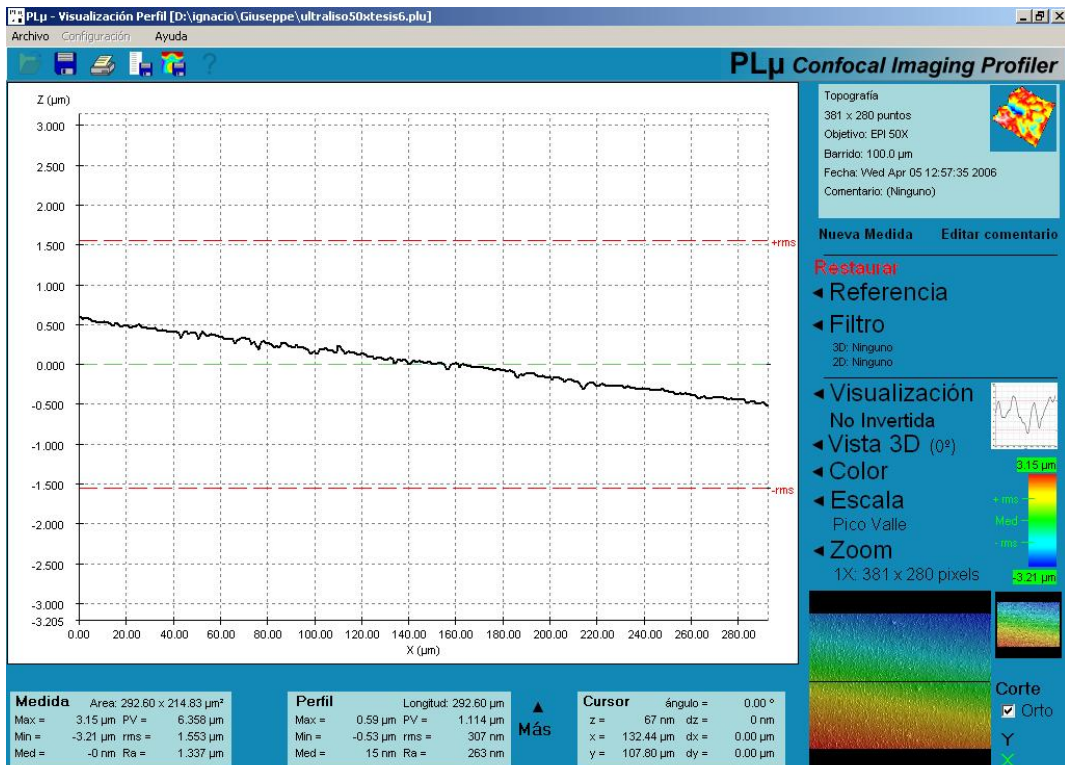


Figura 4.20.: Imagen del perfil de MCB de la superficie lisa con aumento de 50x.

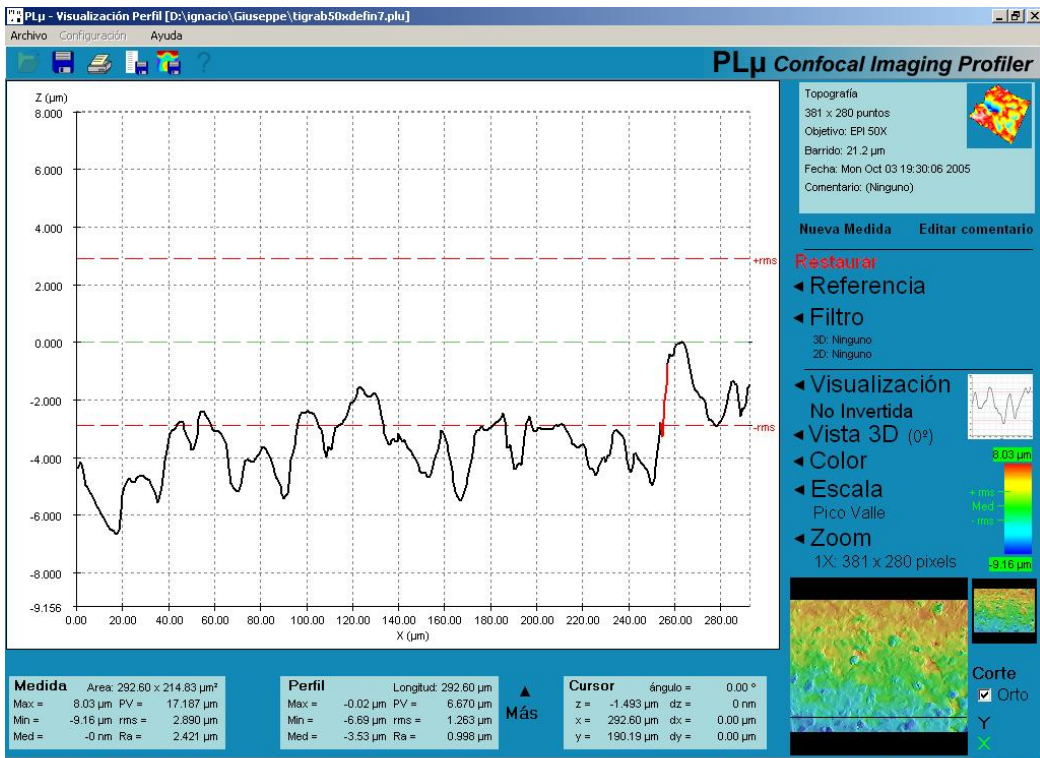


Figura 4.21.: Imagen del perfil de MCB de la superficie lisa con aumento de 50x.



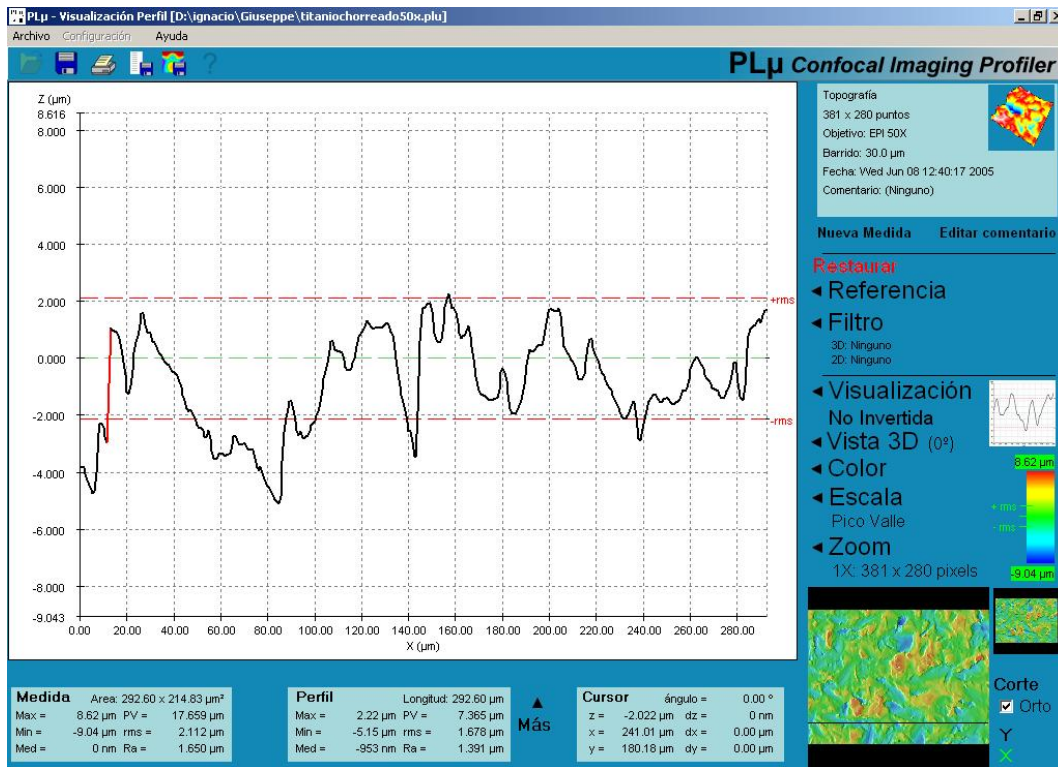


Figura 4.22.: Imagen del perfil de MCB de la superficie arenada con aumento de 50x.

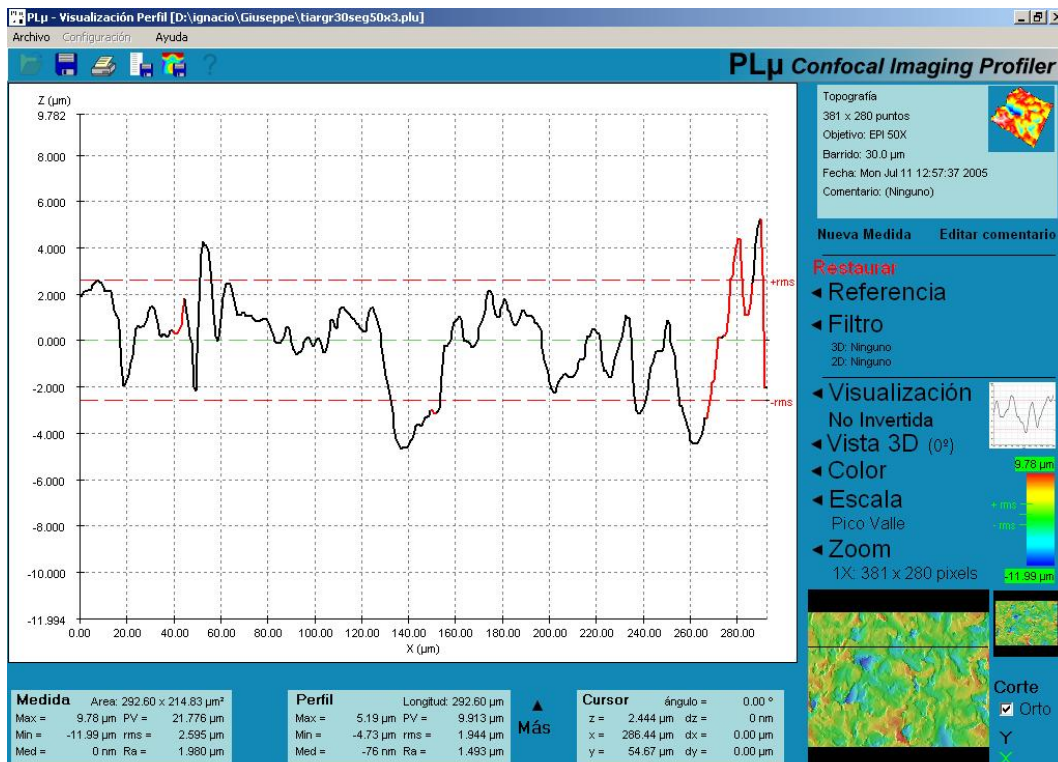


Figura 4.23.: Imagen del perfil de MCB de la superficie arenada-grabada con aumento de 50x.



Microscopio de fuerzas atómicas

Tabla 4.11.: Resultados del análisis de la varianza previo a las comparaciones múltiples en cada grupo.

Variable dependiente: Microscopio de fuerzas atómicas parámetro Ra.

MFA parámetro Ra en:	F	P
Superficies Titanio	3273,75	,000

Tabla 4.12.: Media (DE) del parámetro Ra del MFA en los distintos grupos de estudio. Anova. Test de Tukey.

Variable dependiente: Microscopio de Fuerzas Atómicas parámetro Ra.

Factor: Tratamiento de superficie.

Superficie	Media	Desv. estándar	P	Intervalo de confianza	
				Límite inferior	Límite superior
Lisa	140,4	16,8			
Arenada	208,8	18,8	,000	-96,88	-36,89
Grabada	860,5	29,8	,000	-748,96	-682,71
Arenada-grabada	1370	78	,000	-1263,43	-1188,23

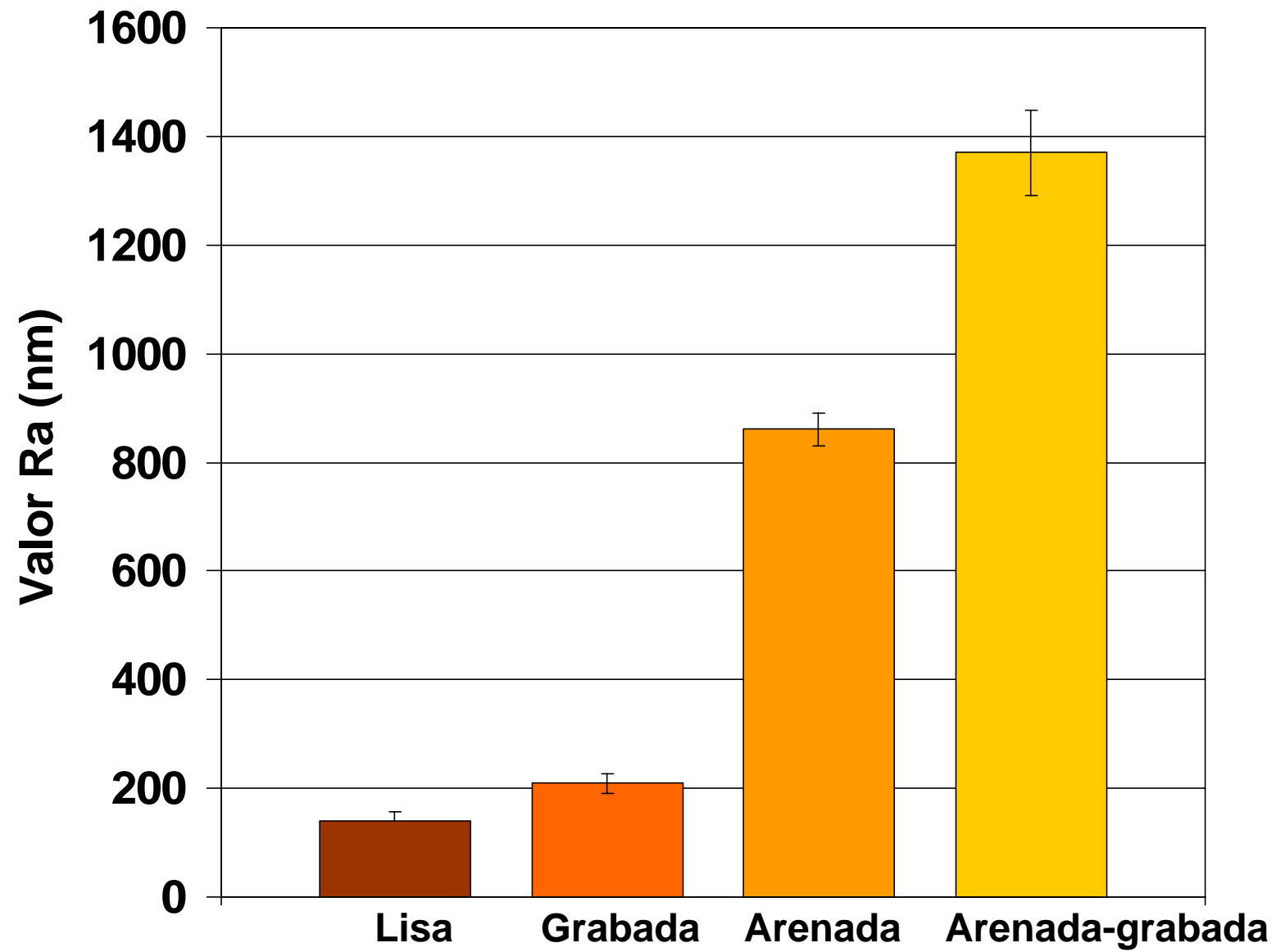


Figura 4.24.: Rugosidad Ra medida con microscopio atomico de fuerzas atomicas en las cuatro superficies estudiadas.

Tabla 4.13.: Resultados del análisis de la varianza previo a las comparaciones múltiples en cada grupo.

Variable dependiente: Microscopio de fuerzas atómicas parámetro Rq.

MFA parámetro Rq en:	F	P
Superficies Titanio	3273,75	,000

Tabla 4.14.: Media (DE) del parámetro Rq del MFA en los distintos grupos de estudio. Anova. Test de Tukey.

Variable dependiente: Microscopio de Fuerzas Atómicas parámetro Ra.

Factor: Tratamiento de superficie.

Superficie	Media	Desv. estándar	P	Intervalo de confianza	
				Límite inferior	Límite superior
Lisa	149	41,8			
Arenada	268,5	43,3	,000	-126,02	-114,03
Grabada	1022	45	,000	-880,47	-867,23
Arenada-grabada	1639	57,8	,000	-1497,82	-1482,79

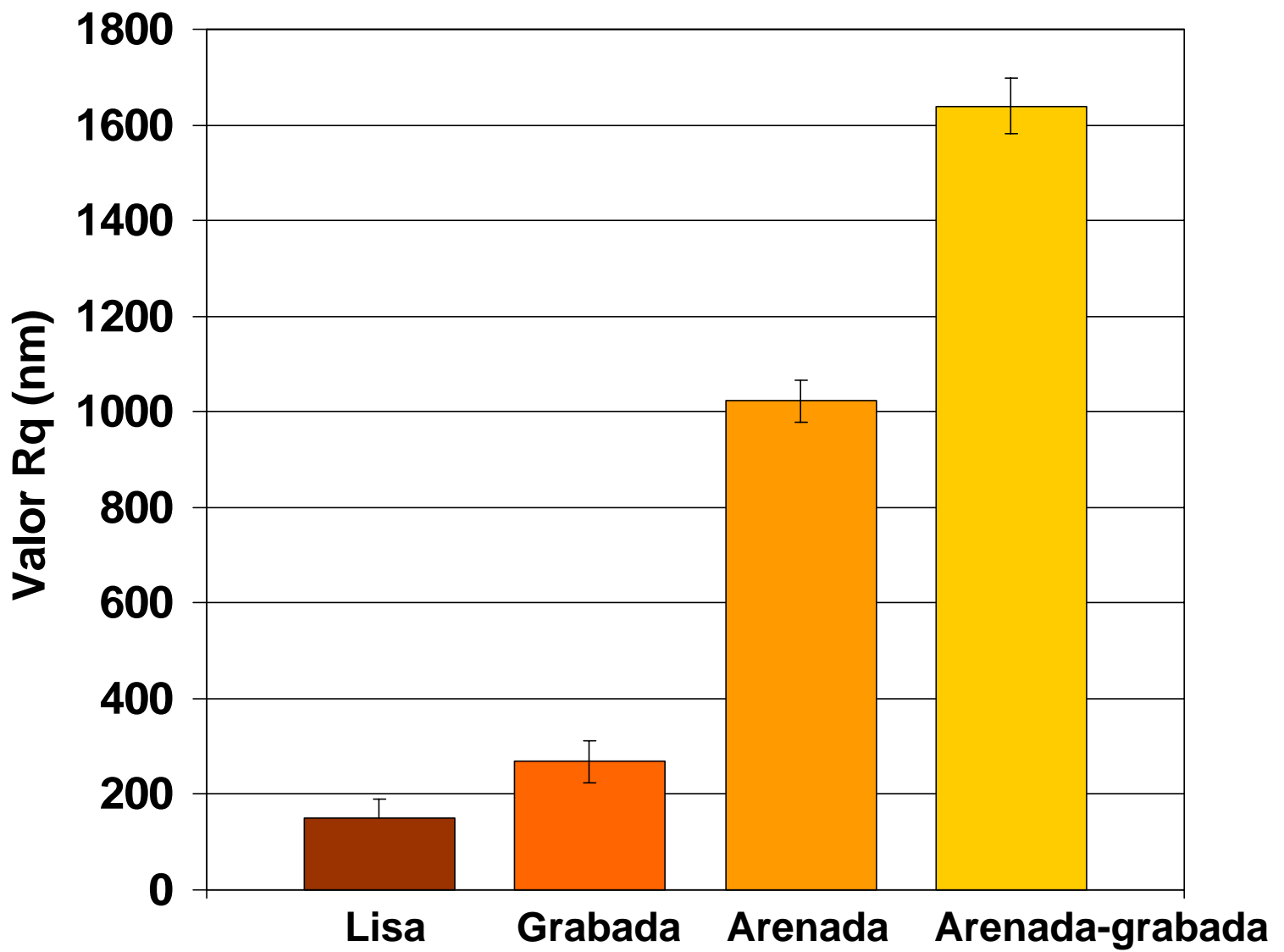


Figura 4.25.: Rugosidad Rq (Rms) medida con microscopio de fuerzas atomicas en las superficies estudiadas.

Tabla 4.15.: Resultados del análisis de la varianza previo a las comparaciones múltiples en cada grupo.

Variable dependiente: Microscopio de fuerzas atómicas parámetro Rmax.

MFA parámetro Rq en:	F	P
Superficies Titanio	1804,86	,000

Tabla 4.16.: Media (DE) del parámetro Rmax del MFA en los distintos grupos de estudio. Anova. Test de Tukey.

Variable dependiente: Microscopio de Fuerzas Atómicas parámetro Rmax.

Factor: Tratamiento de superficie.

Superficie	Media	Desv. estándar	P	Intervalo de confianza	
				Límite inferior	Límite superior
Lisa	1,8	0,1			
Arenada	2,8	0,1	,000	-1,12	-0,76
Grabada	4,8	0,3	,000	-3	-2,6
Arenada-grabada	8	0,5	,000	-6,22	-5,77

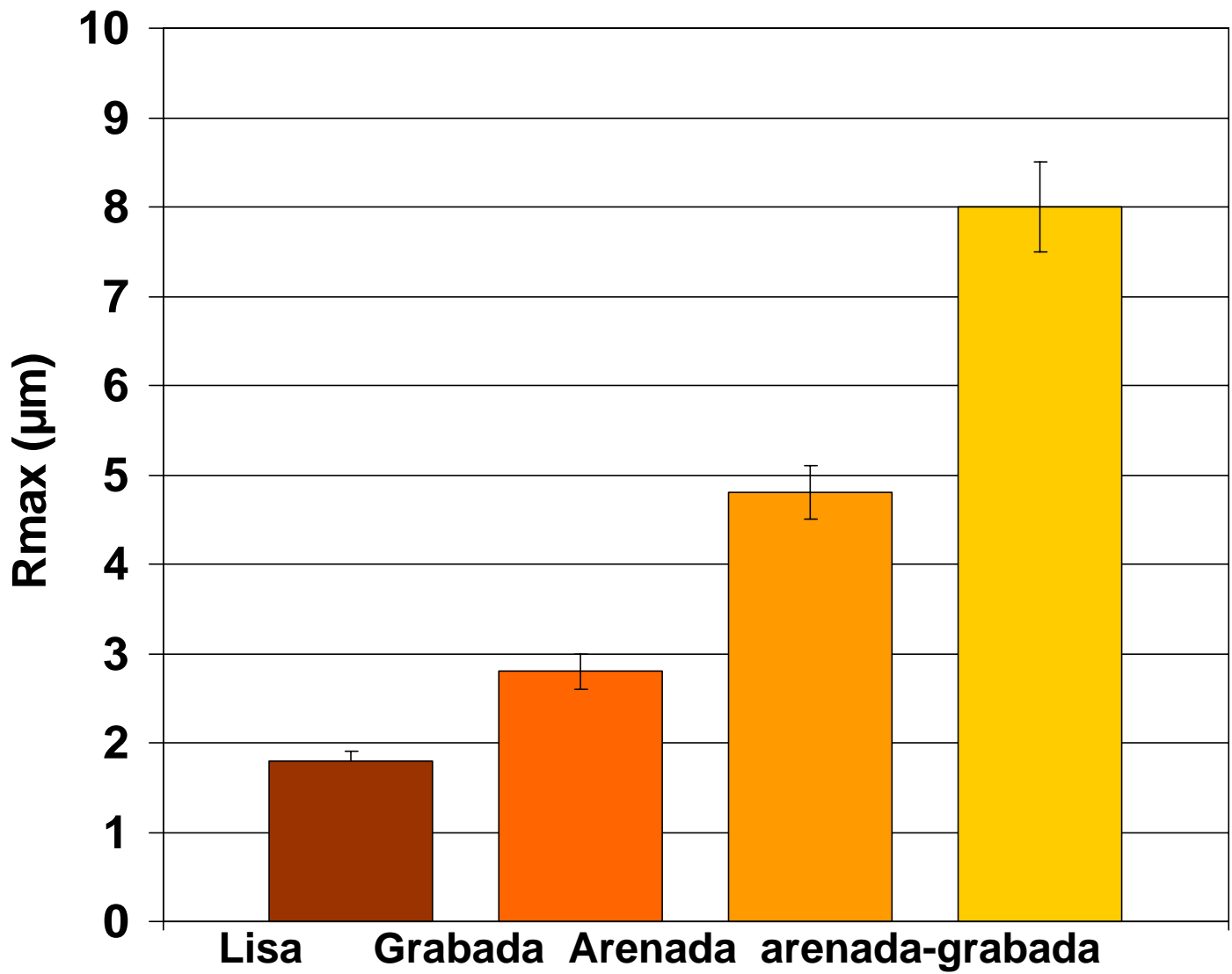


Figura 4.26.: Rugosidad Rmax medida con microscopio de fuerzas atomicas en las superficies estudiadas.

Tabla 4.17.: Resultados del análisis de la varianza previo a las comparaciones múltiples en cada grupo.

Variable dependiente: Microscopio de fuerzas atómicas parámetro Área de superficie.

MFA parámetro Área de sup. en:	F	P
Superficies Titanio	60677	,000

Tabla 4.18.: Media (DE) del parámetro Área de superficie del MFA en los distintos grupos de estudio. Anova. Test de Tukey.

Variable dependiente: Microscopio de Fuerzas Atómicas parámetro Área de superficie.

Factor: Tratamiento de superficie.

Superficie	Media	Desv. estándar	P	Intervalo de confianza	
				Límite inferior	Límite superior
Lisa	2539	99			
Arenada	2762	105	,000	-227	-219
Grabada	2892	110	,000	-357	-348
Arenada-grabada	3339	124	,000	-805	-795

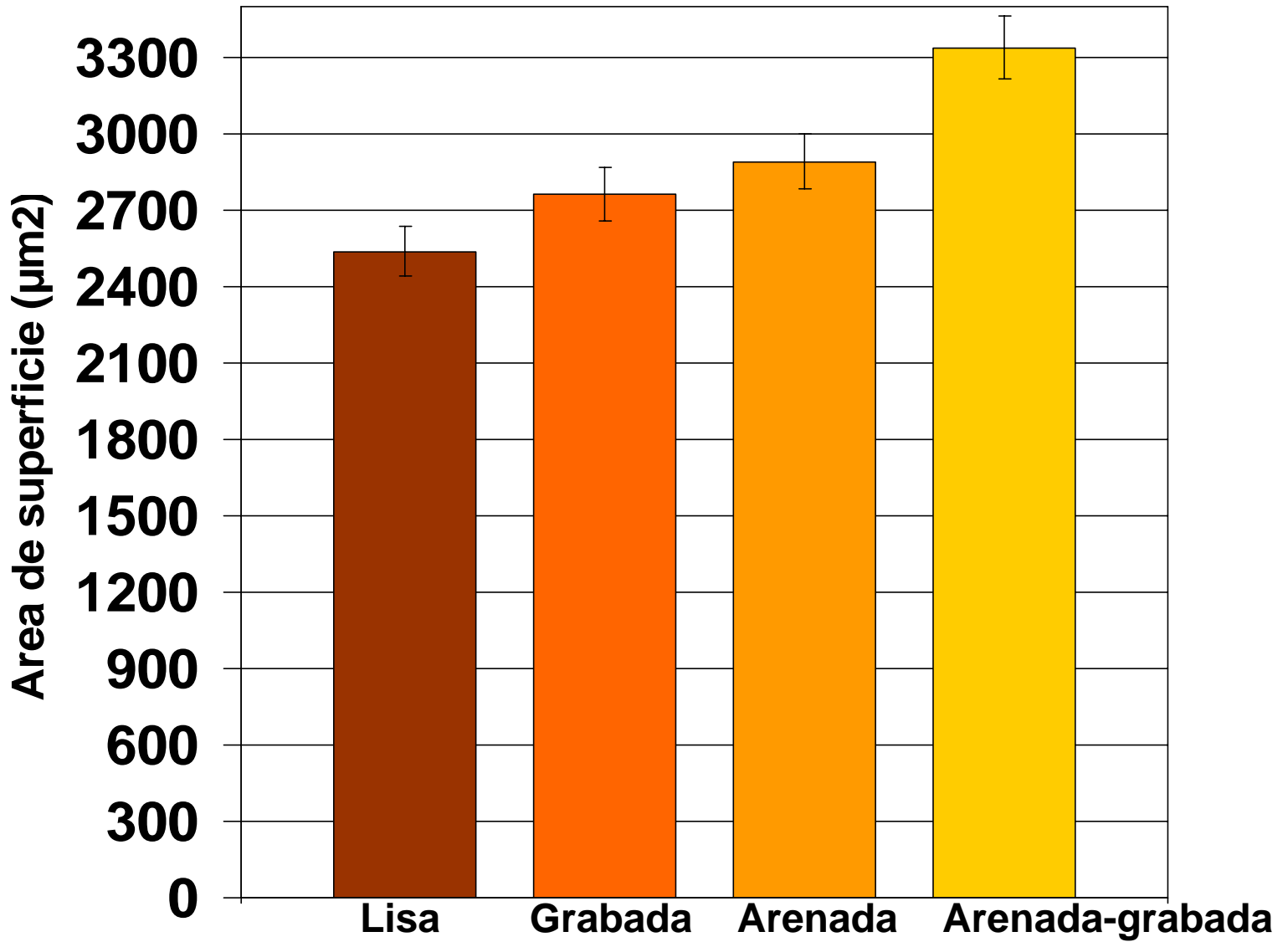


Figura 4.27.: Area de superficie medida con microscopio de fuerzas atómicas en las superficies estudiadas.



Tabla 4.16.: Valor medio (%) de la variación del area de superficie de la superficies rugosas.

Superficie	Media	Desv. estándar
Lisa	0	0
Arenada	8,77	1,5
Grabada	13,89	1,4
Arenada-grabada	31,5	1,5

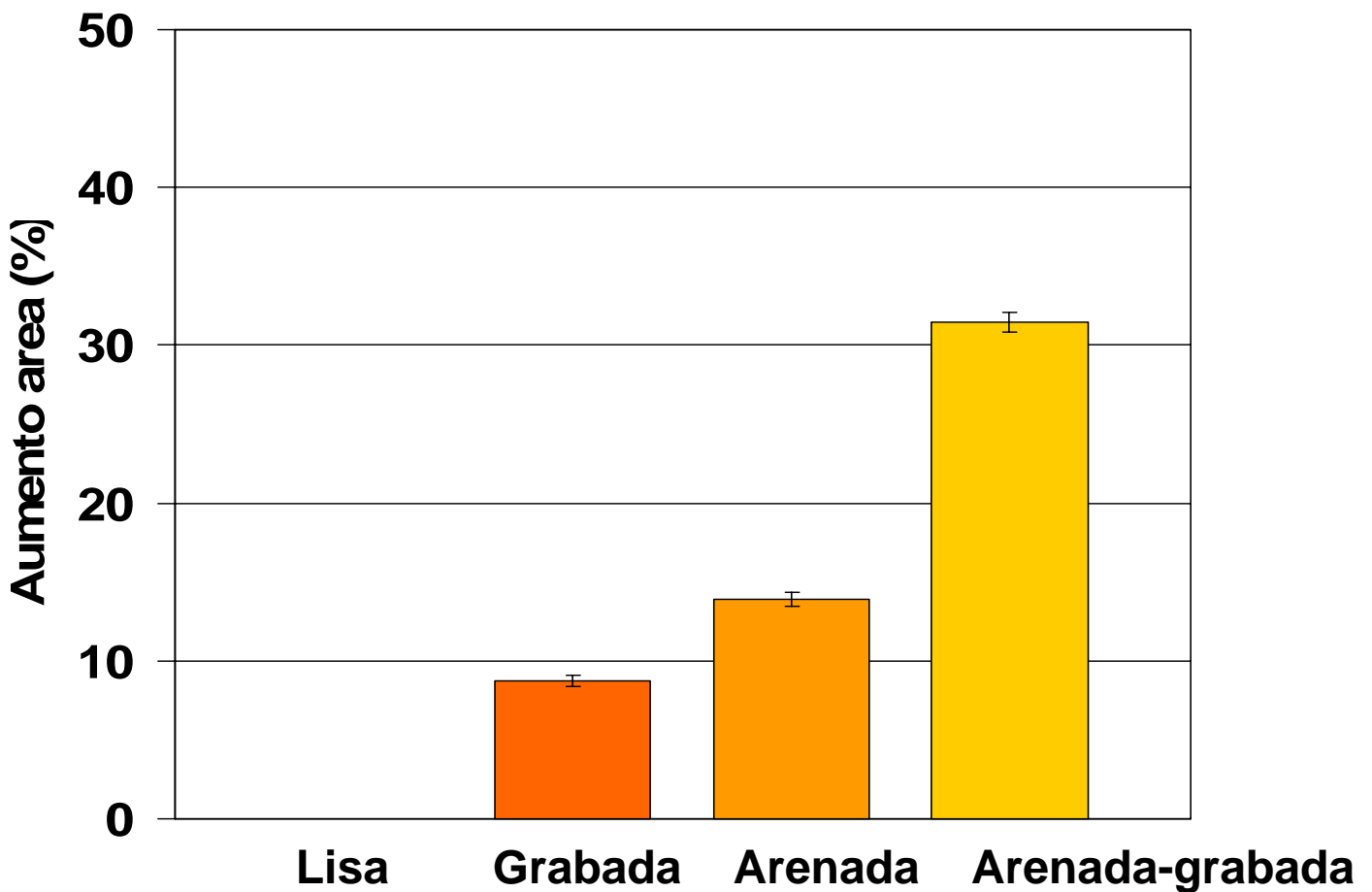


Figura 4.28.: Variación del area de superficie de las superficies rugosas respecto a la superficie lisa.

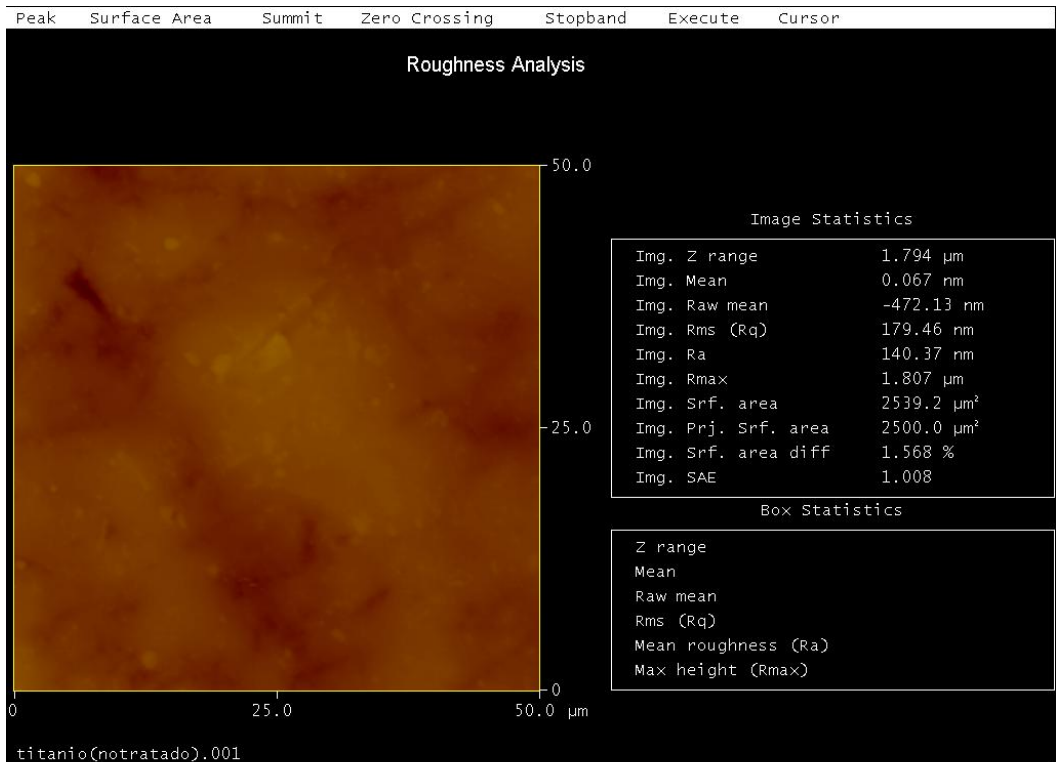


Figura 4.29.: Imagen bidimensional de MFA de la superficie lisa.

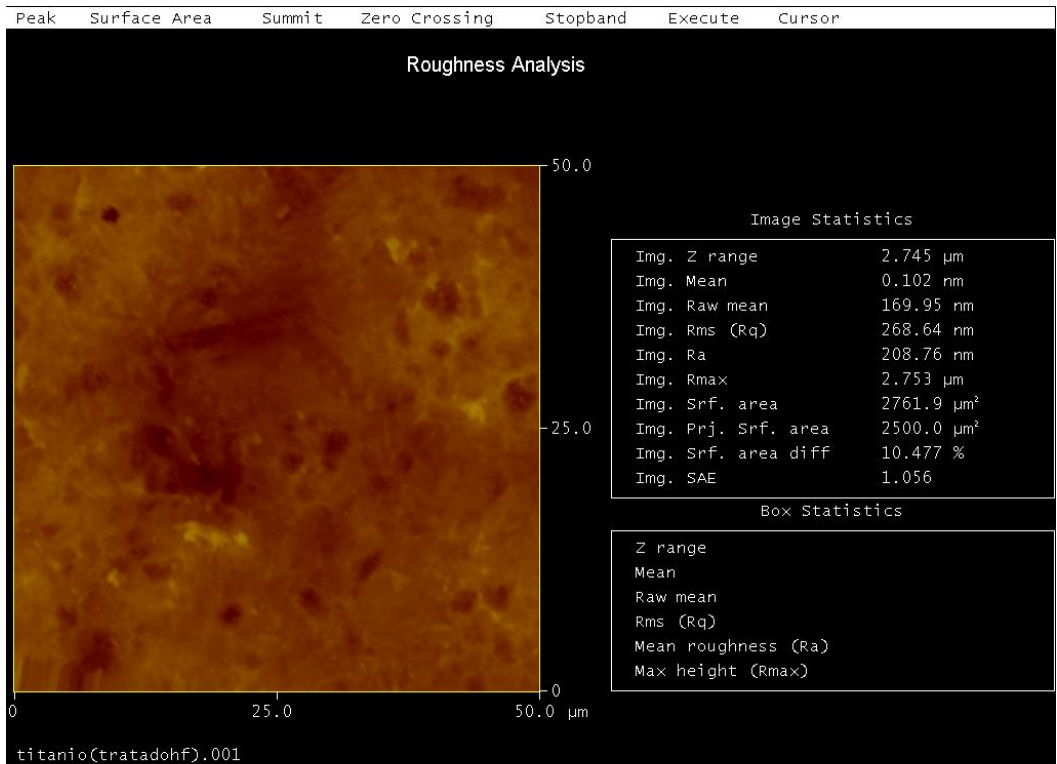


Figura 4.30.: Imagen bidimensional de MFA de la superficie grabada.

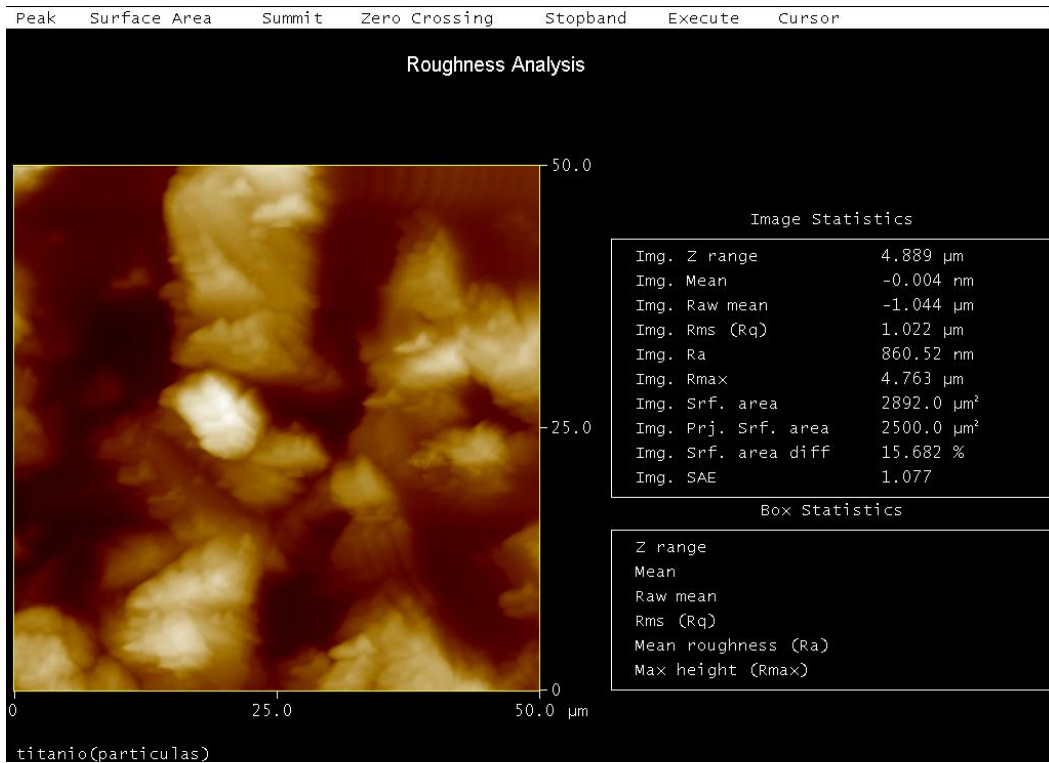


Figura 4.11.: Imagen bidimensional de MFA de la superficie arenada.

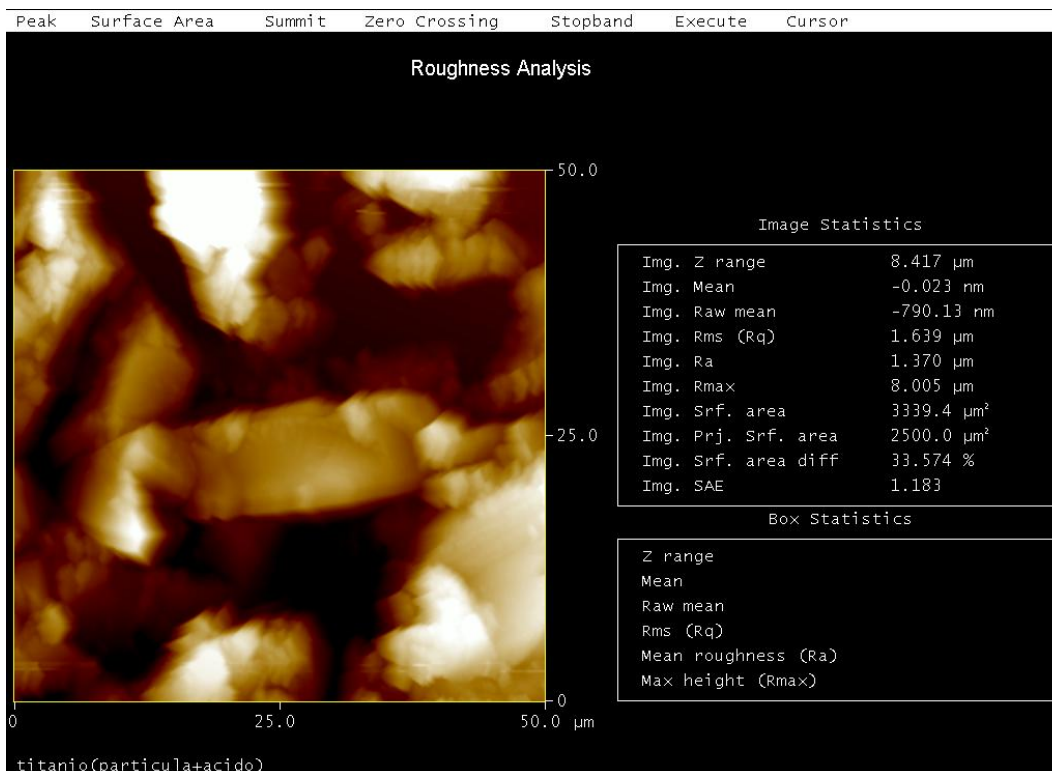


Figura 2.32.: Imagen bidimensional de MFA de la superficie arenada-grabada.

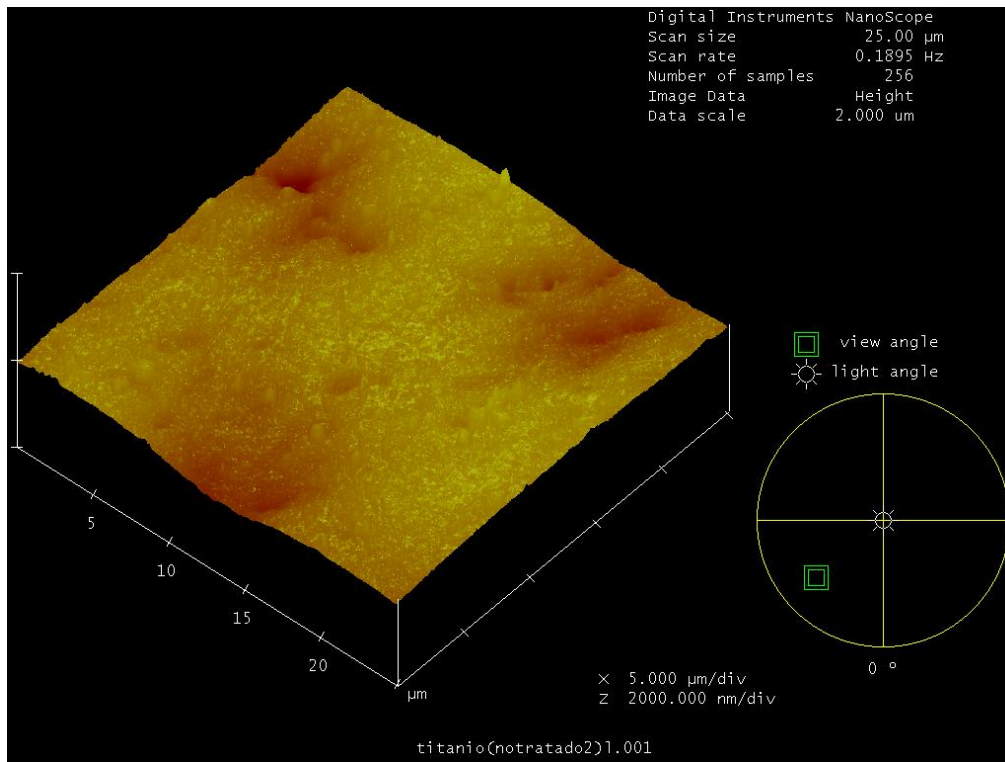


Figura 4.33.: Imagen tridimensional de MFA de la superficie lisa.

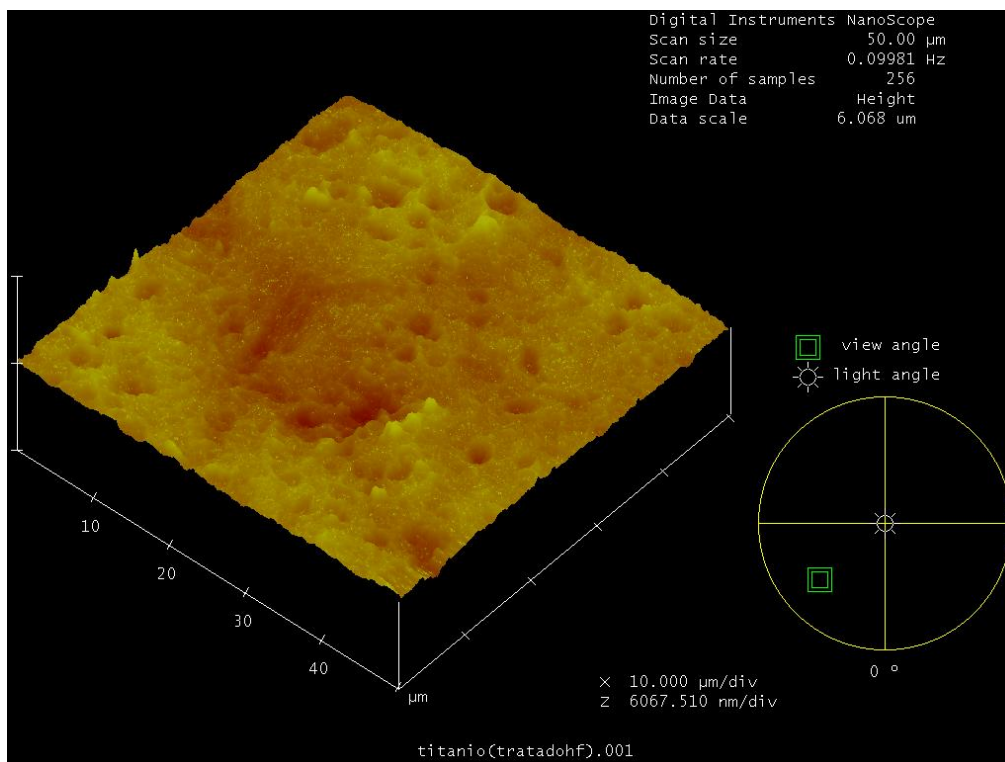


Figura 4.34.: Imagen tridimensional de MFA de la superficie grabada.

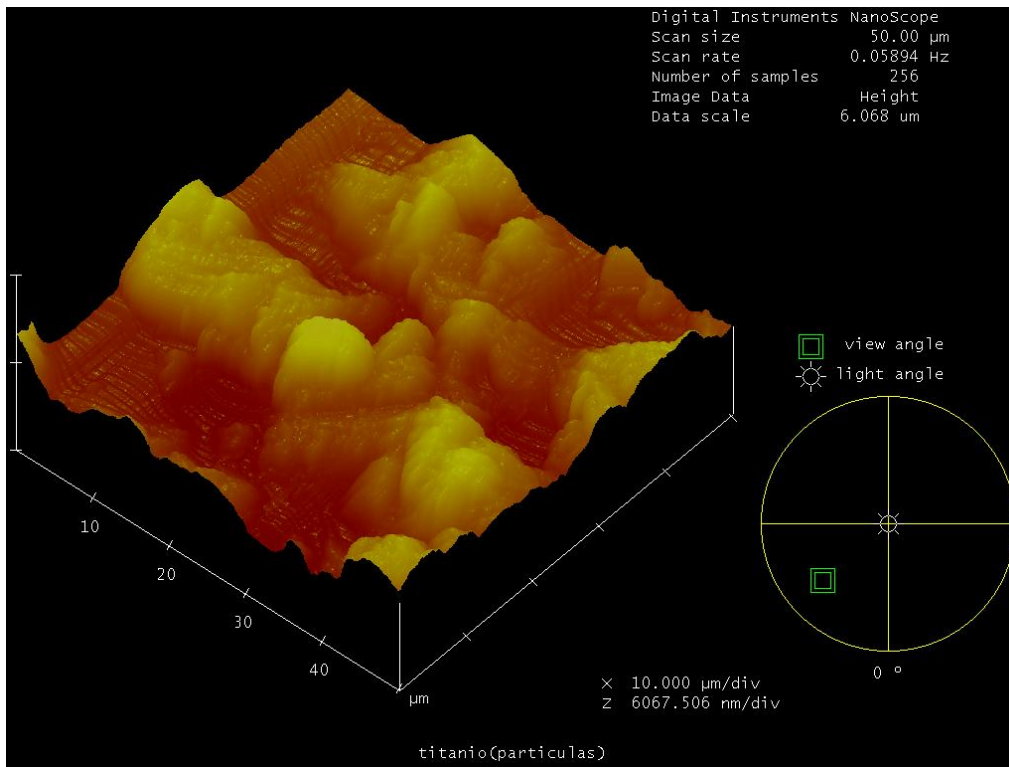


Figura 4.35.: Imagen tridimensional de MFA de la superficie arenada.

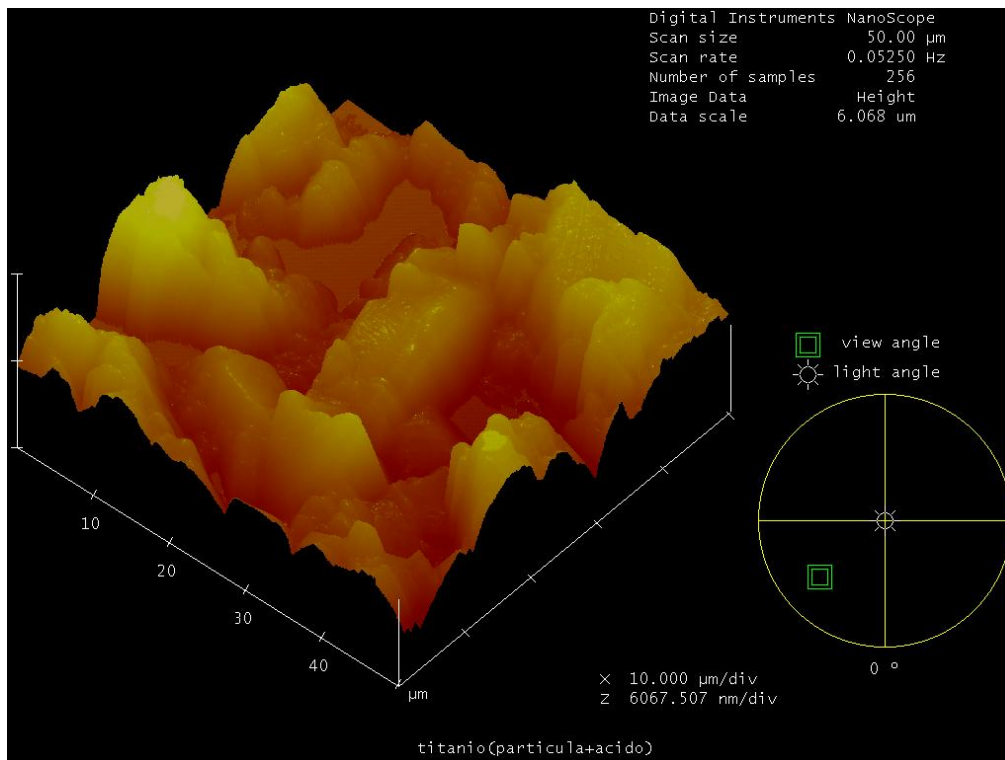


Figura 4.36: Imagen tridimensional de MFA de la superficie arenada-grabada.



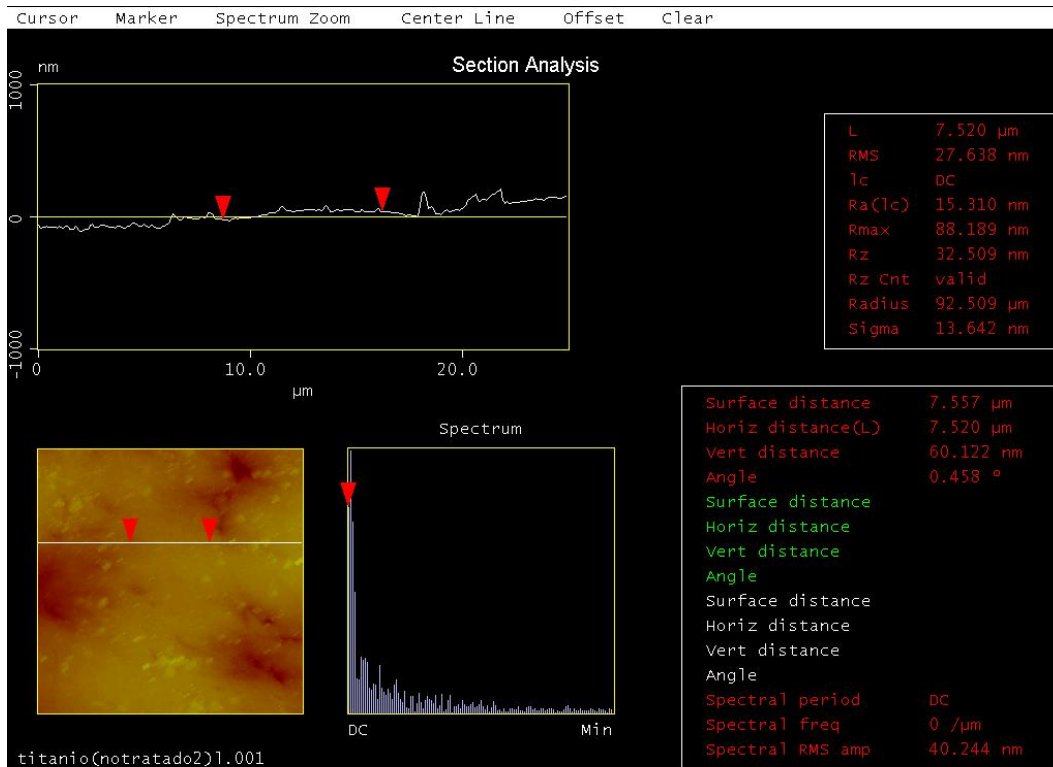


Figura 4.37.: Imagen del perfil de MFA de la superficie lisa.

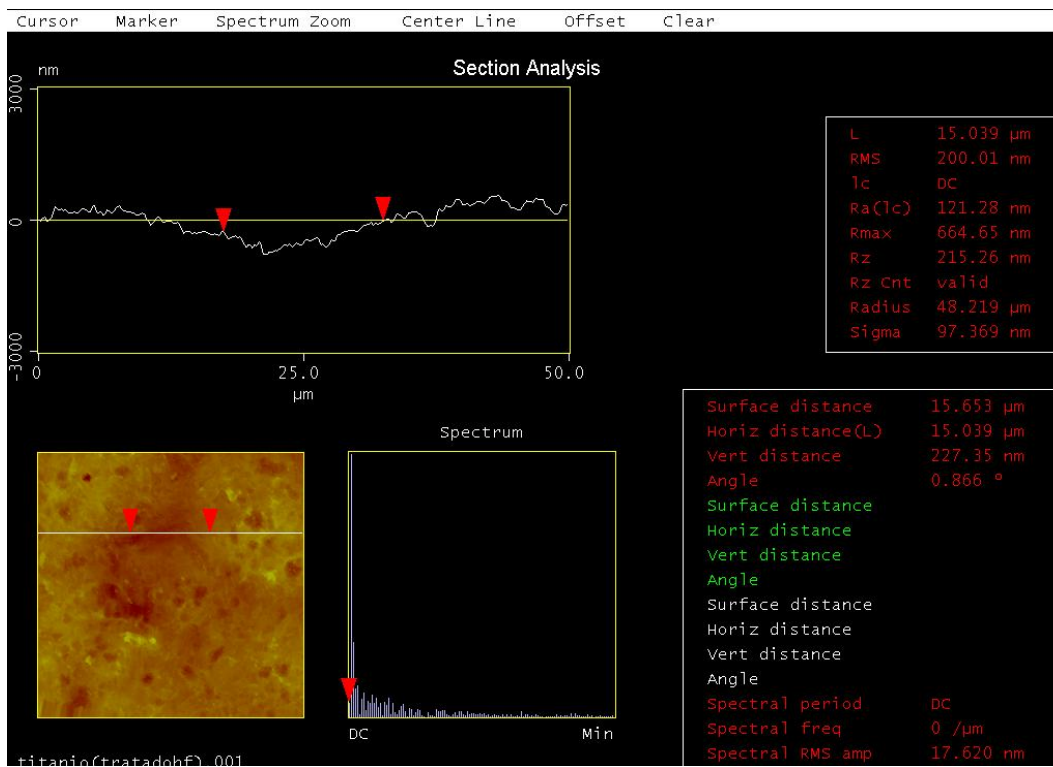


Figura 4.38.: Imagen del perfil de MFA de la superficie grabada.

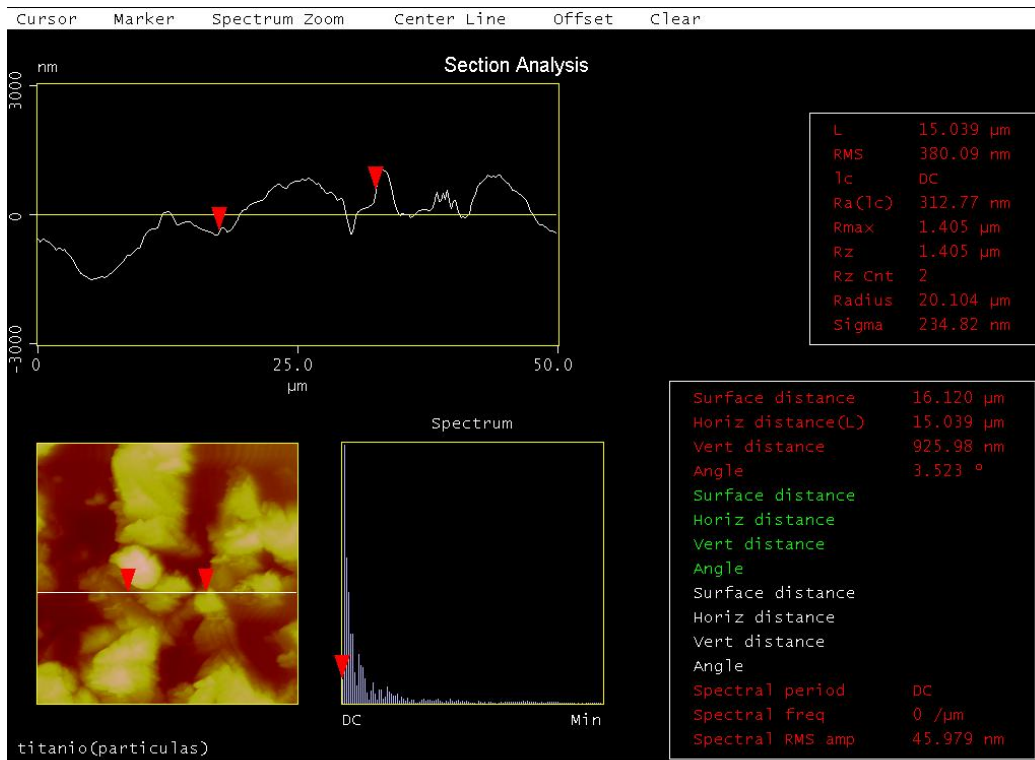


Figura 4.39.: Imagen del perfil de MFA de la superficie arenada.

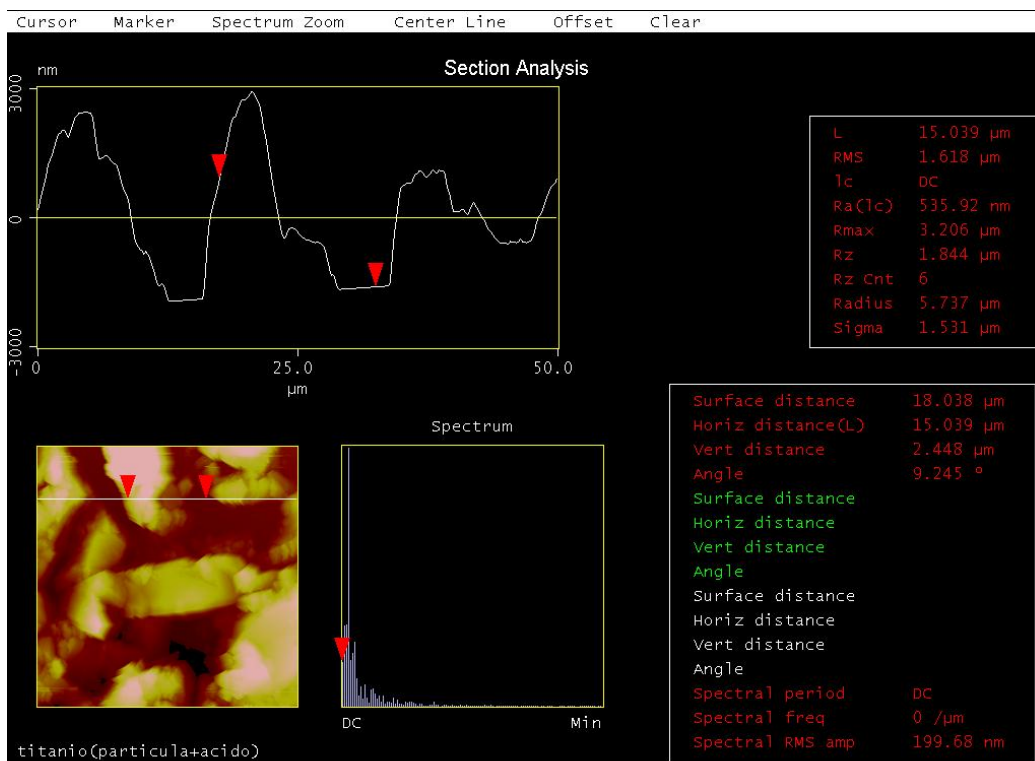


Figura 4.40.: Imagen del perfil de MFA de la superficie arenada-grabada.

#### 4.3 Microscopio electrónico de barrido (MEB)

Las diferencias topográficas entre las 4 superficies fueron cualitativamente analizadas por (MEB).

En la superficie lisa se vieron pequeñas irregularidades debidas a su estructura cristalina. La superficie arenada ha presentado un patrón disomogeneo e irregular, se han detectado restos de partículas de óxido de aluminio.

Las superficies grabadas han presentado un patrón de rugosidad homogéneo y ordenado, además se han detectado poros en estas dos superficies, no ha habido diferencias significativas entre el tamaño de los poros de las dos superficies.

El proceso de grabado produce áreas de depresión cercanas entre ellas, cubiertas uniformemente por microporos. Esta superficie presenta un aspecto suavemente ondulado respecto a la rugosidad más aspera de la superficie arenada.

##### Superficie arenada-grabada

La superficie arenada-grabada preparada con una combinación de grabado físico con partículas de aluminio y grabado ácido con HF muestra una estructura jerárquicamente organizada con valles de diámetro más ancho de 10- 30  $\mu\text{m}$  y poros más pequeños de 1- 2  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las cavidades más profundas y anchas están fundamentalmente producidas por el proceso de arenado, además que del grabado del contorno del valle producido por las partículas, y también por surcos producidos por partículas dañadas o fracturadas. Los microporos son únicamente producidos por el proceso de grabado ácido.



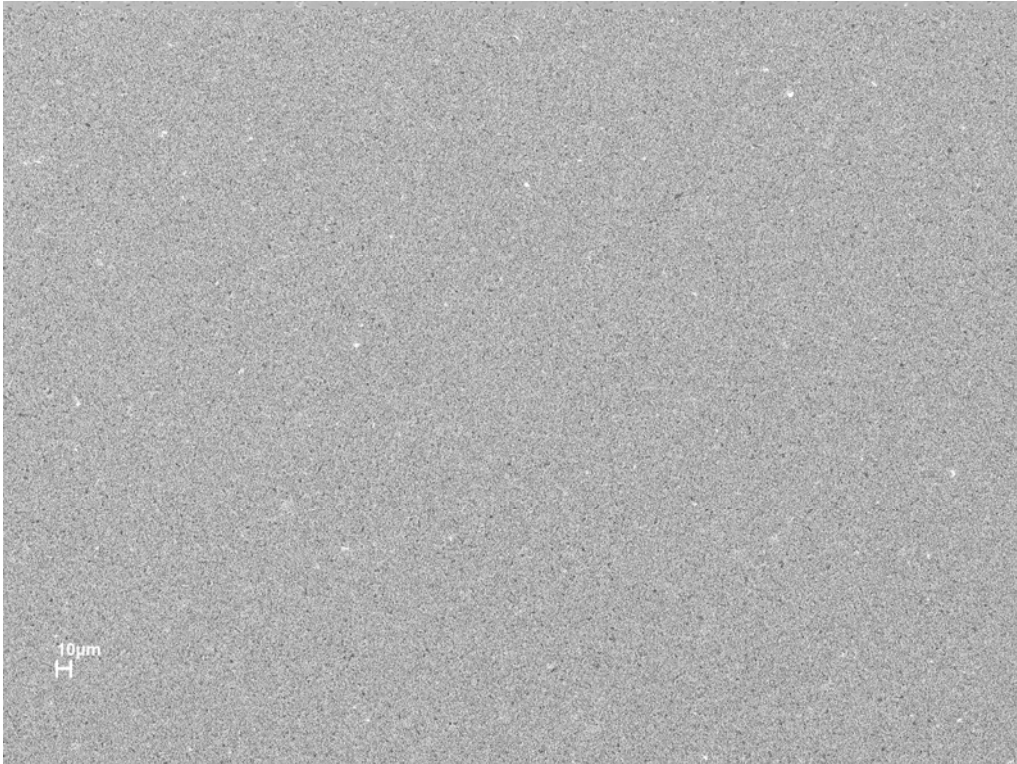


Figura 4.41.: Imagen de MEB de la superficie lisa

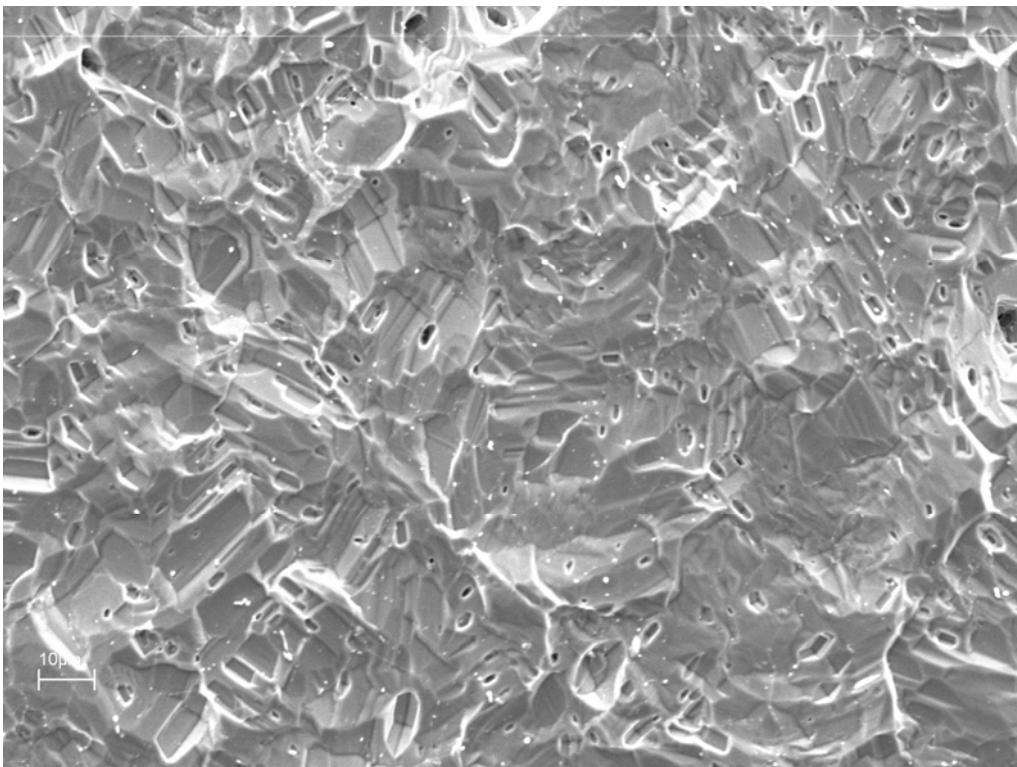


Figura 4.42.: Imagen de MEB de la superficie grabada.

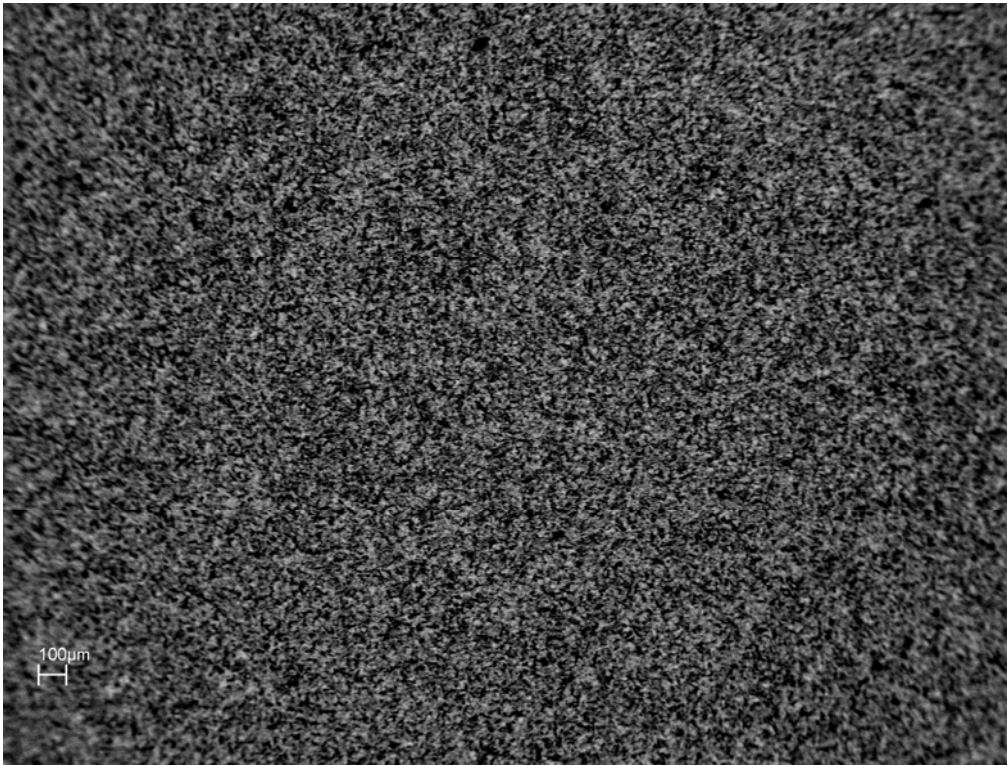


Figura 4.43.: Imagen de MEB de la superficie arenada.

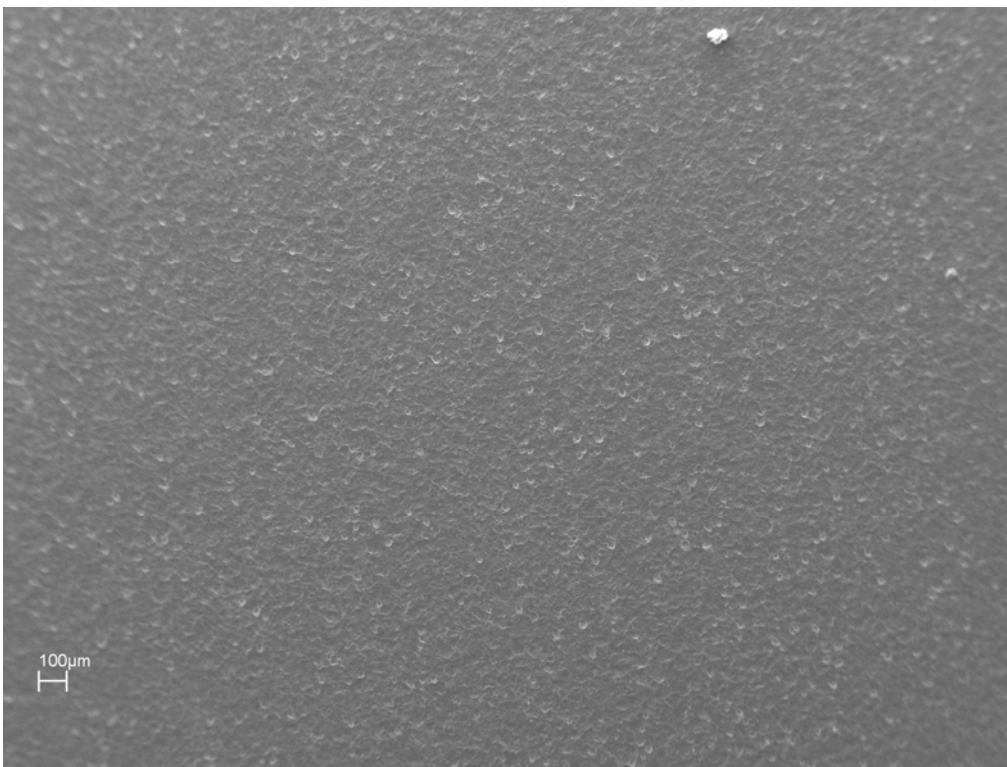


Figura 4.44.: Imagen de MEB de la superficie arenada-grabada

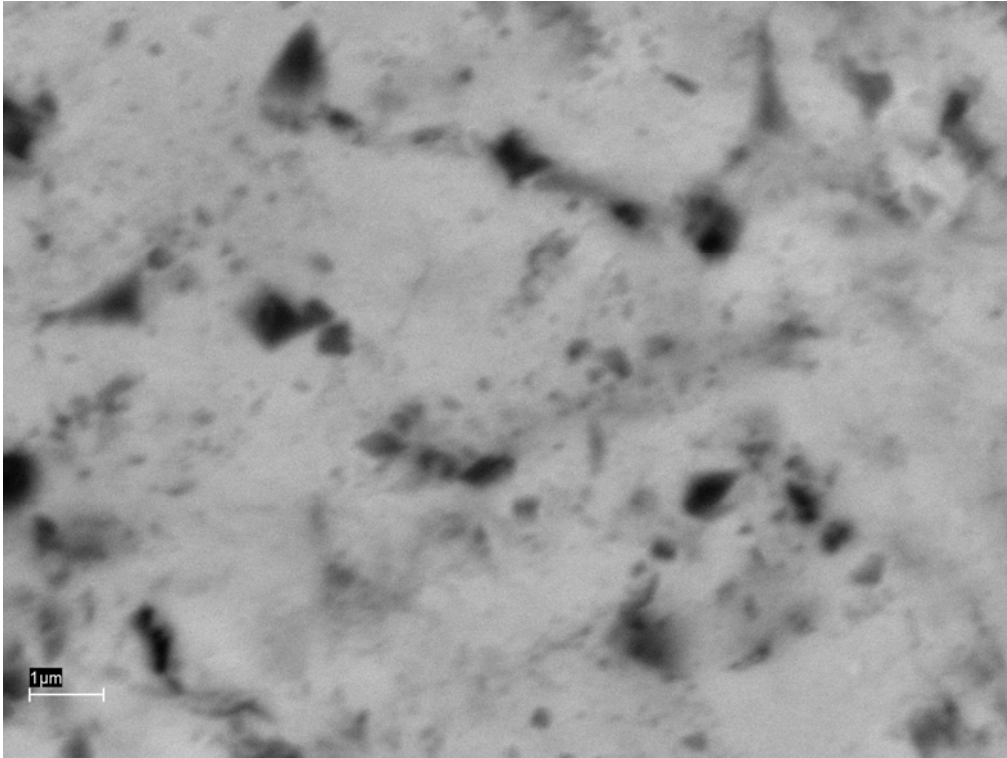


Figura 4.45.: Imagen de MEB de la superficie lisa

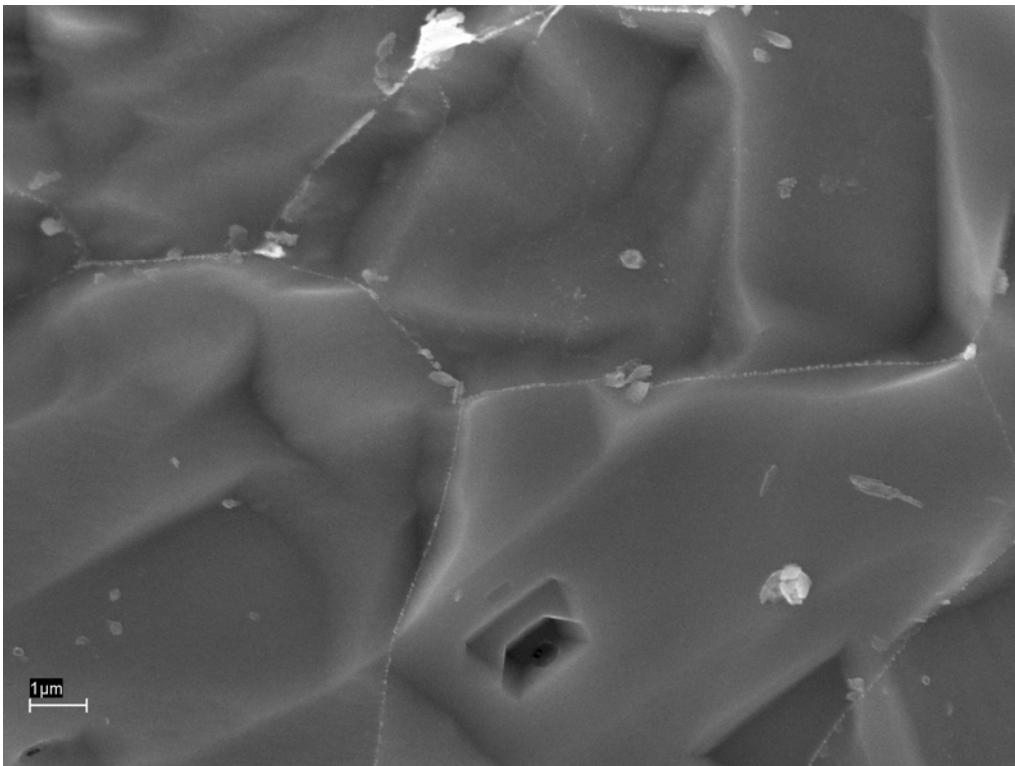


Figura 4.46.: Imagen de MEB de la superficie grabada

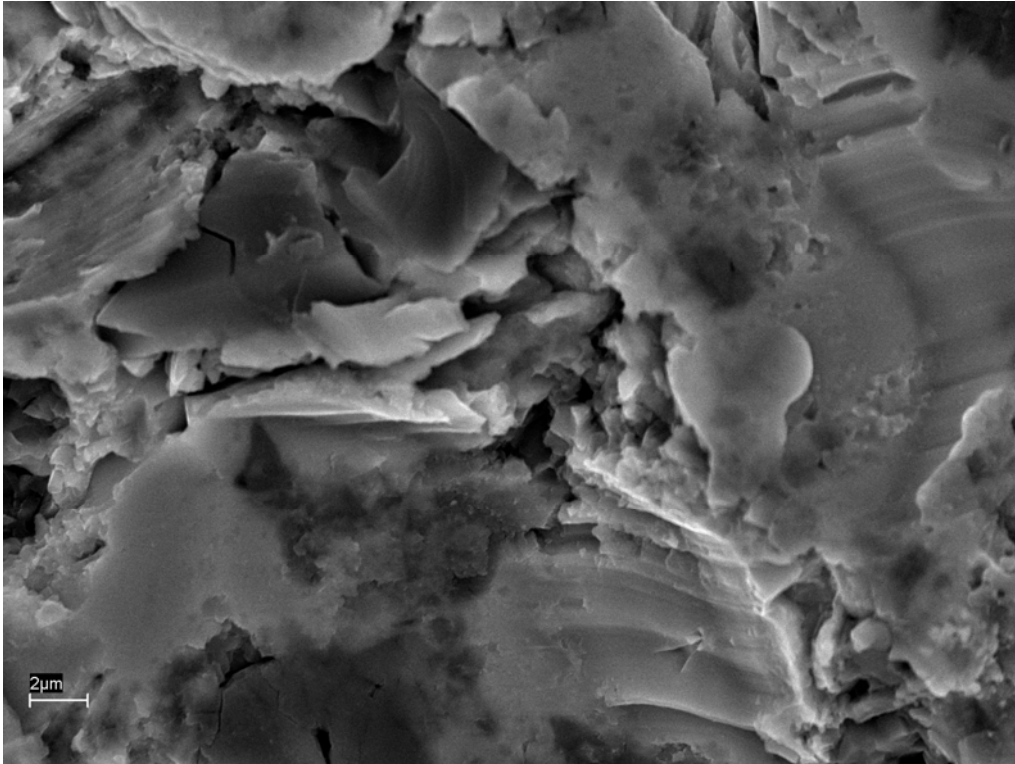


Figura 4.47.: Imagen de MEB de la superficie arenada

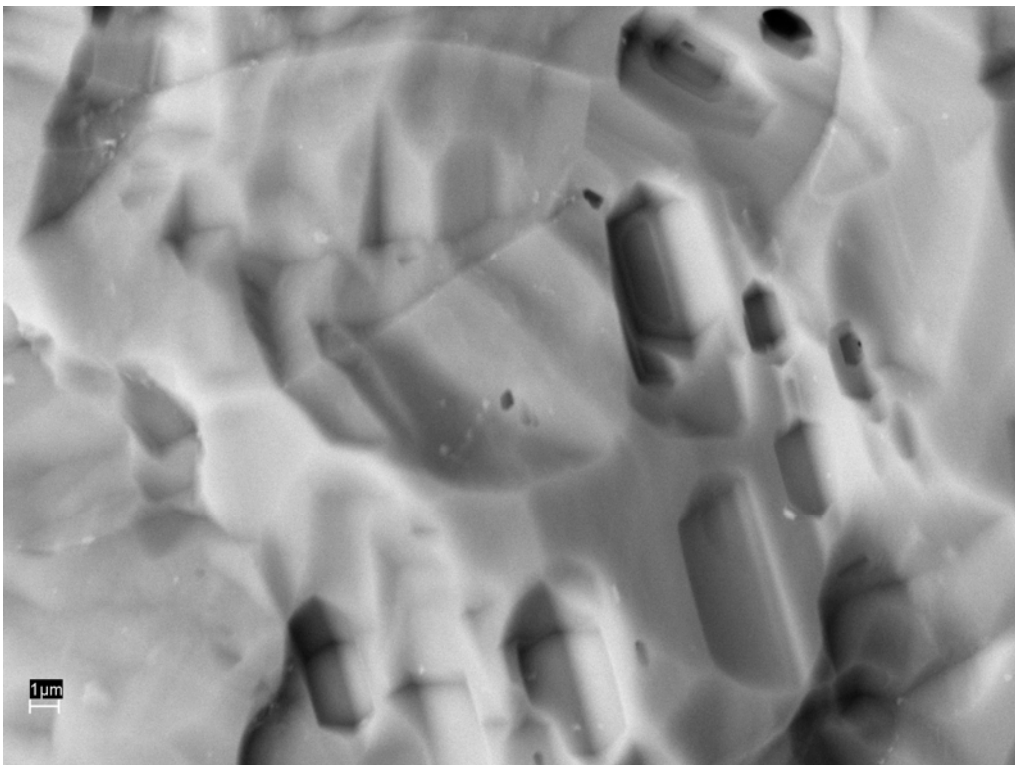


Figura 4.48.: Imagen de MEB de la superficie arenada-grabada

#### 4.4 Análisis de electrones retrodispersados

En nuestra análisis se utilizaron tres muestras por cada superficie. Después de ser preparadas como se ha descrito en el capítulo anterior se analizaron.

En la superficie lisa se encontraron los siguientes elementos: Titanio (Ti) en alto porcentaje, sílice (Si) y carbono (c) en cantidad media, aluminio (Al) en pequeñas cantidades.

En la superficie grabada: Titanio (Ti), carbono (ca), y en bajos porcentajes hierro (Fe).

En la superficie arenada: La cantidad de titanio (Ti) es alta y mas baja la de elementos como aluminio (Al), bromo (Br), oxígeno (O).

En correspondencia de un residuo de óxido de aluminio el aluminio (Al) y el titanio (Ti) son los elementos con mas alto porcentaje, se registran además elementos de carbono (C), fósforo (P), oxígeno (O) y bromo (Br) en baja cantidad.

En la superficie arenada y grabada: Se detectaron elementos de titanio (Ti) y aluminio (Al), y bajas cantidades de carbono (C).

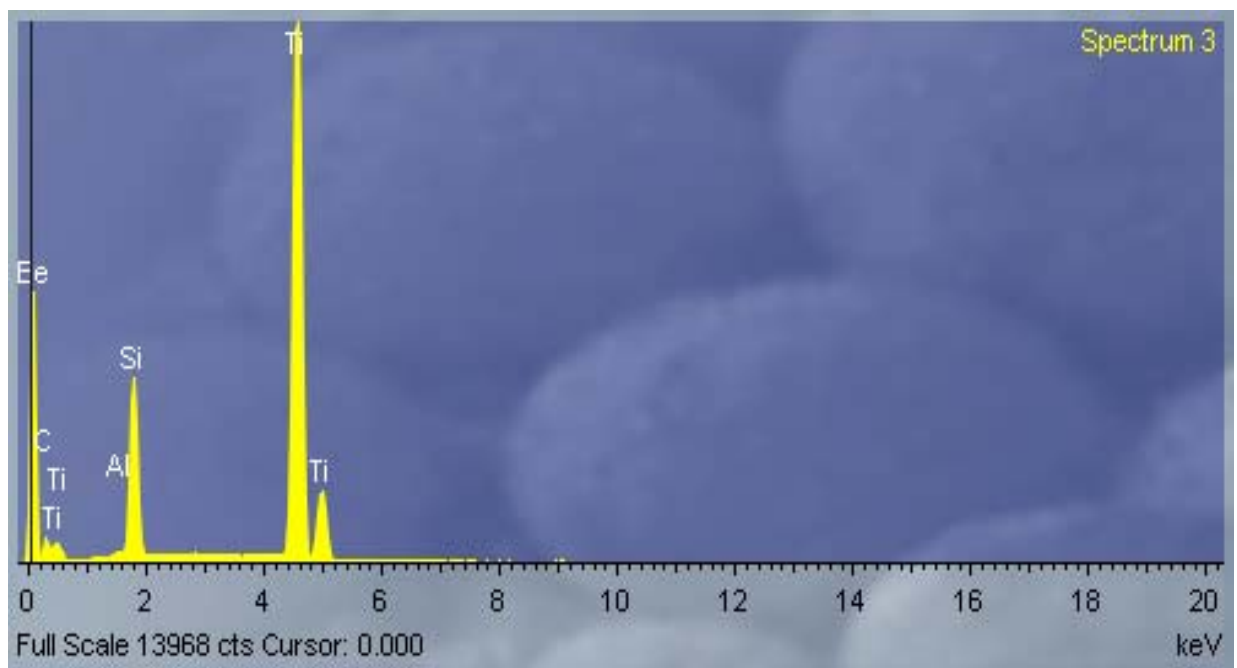
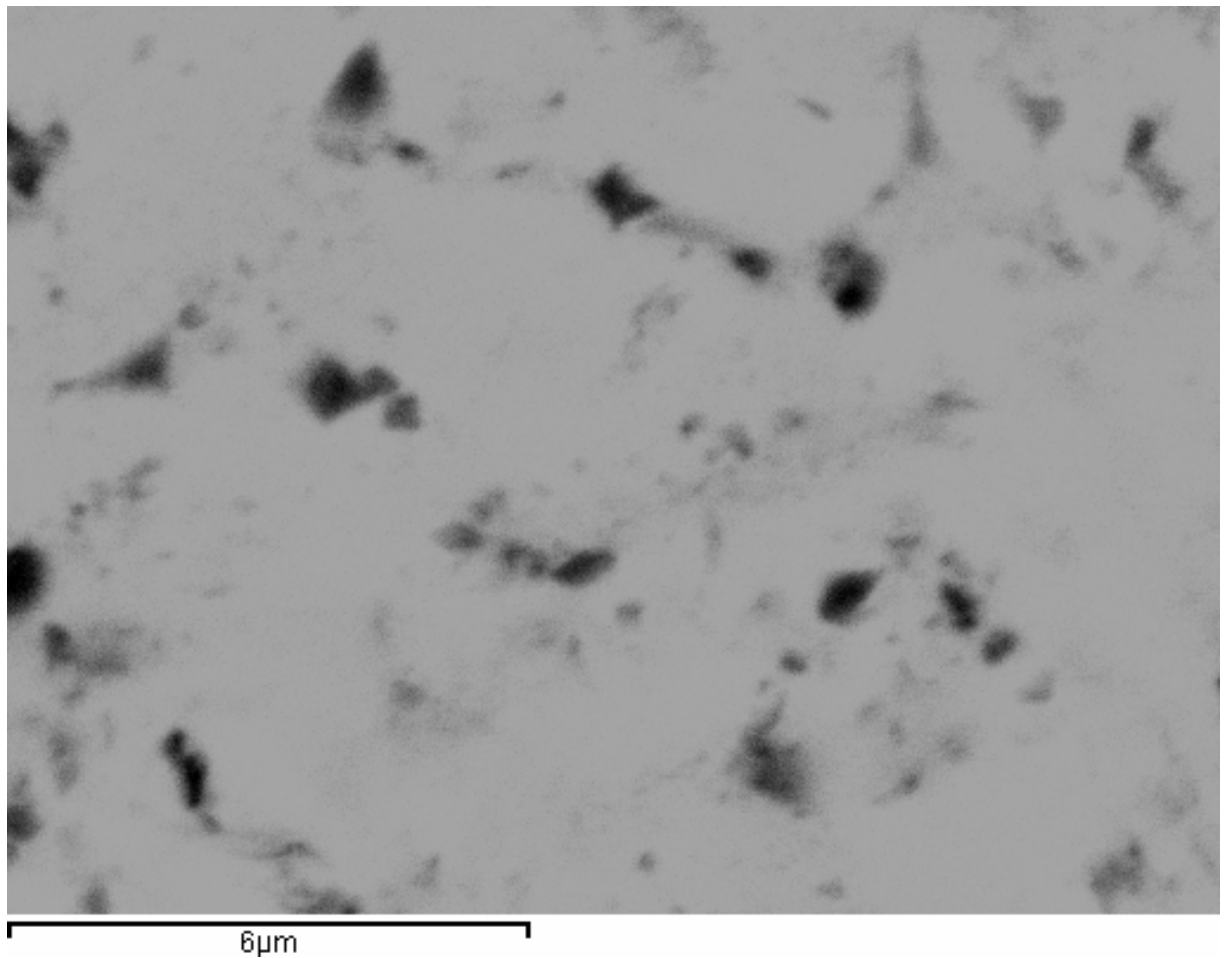


Figura 4.49.: Imagen bidimensional y composición química superficial de la superficie lisa.



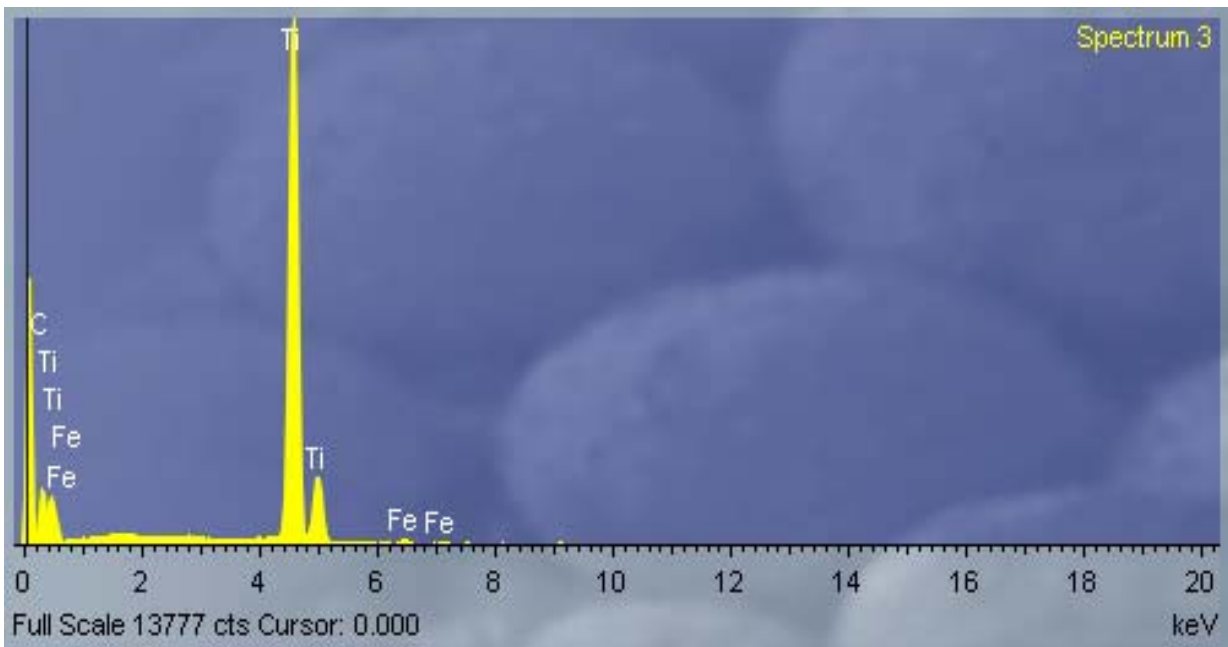
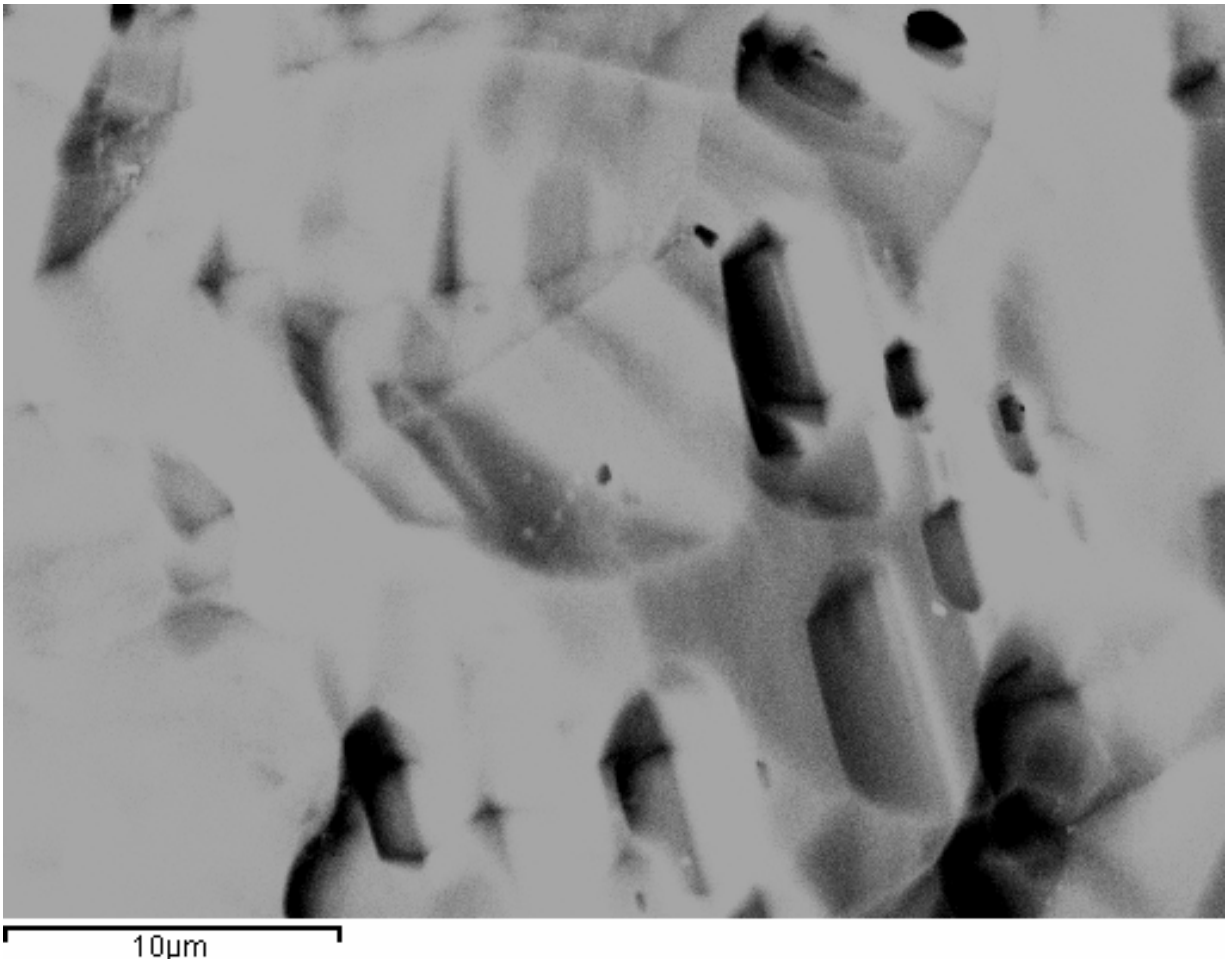


Figura 3.50.: Imagen bidimensional y composición química superficial de la superficie grabada.

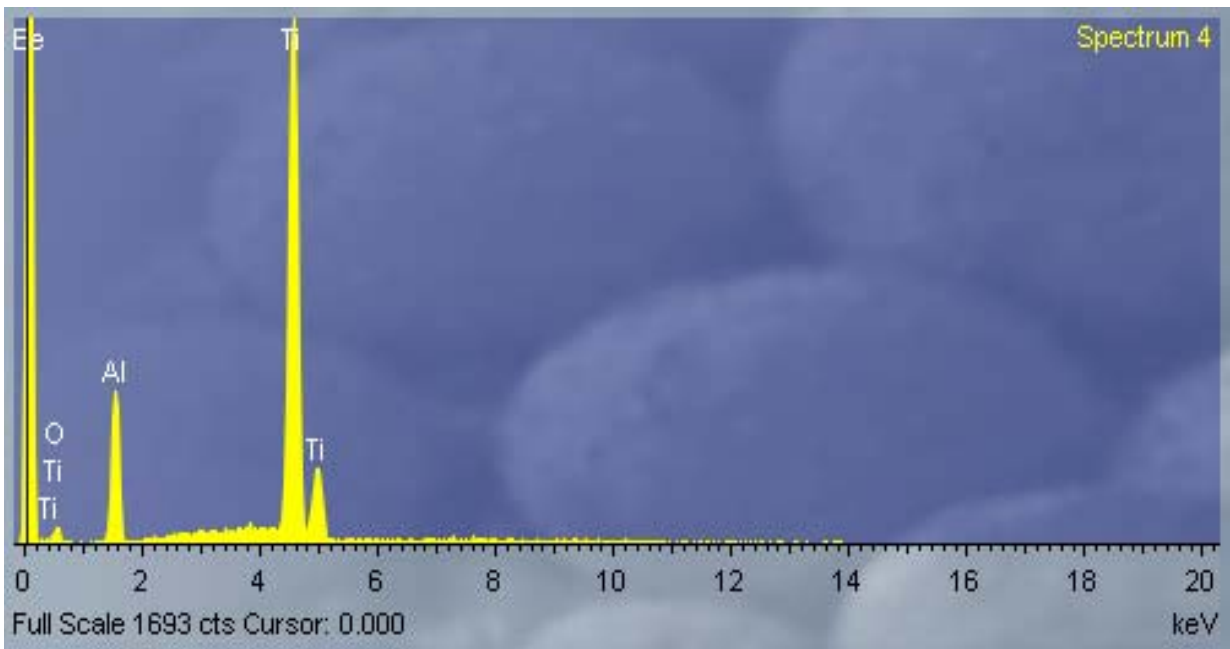
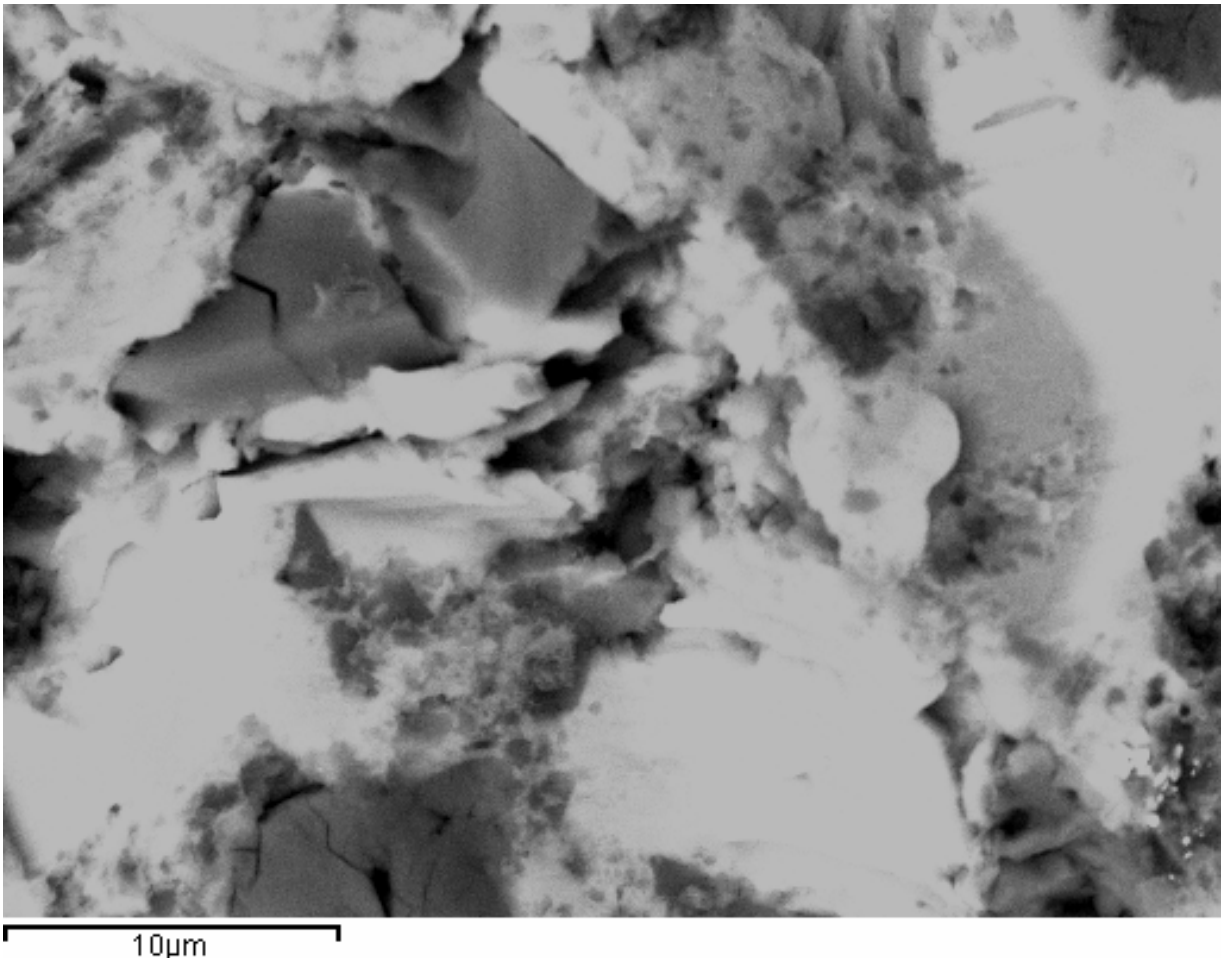


Figura 4.51.: Imagen bidimensional y composición química superficial de la superficie lisa.



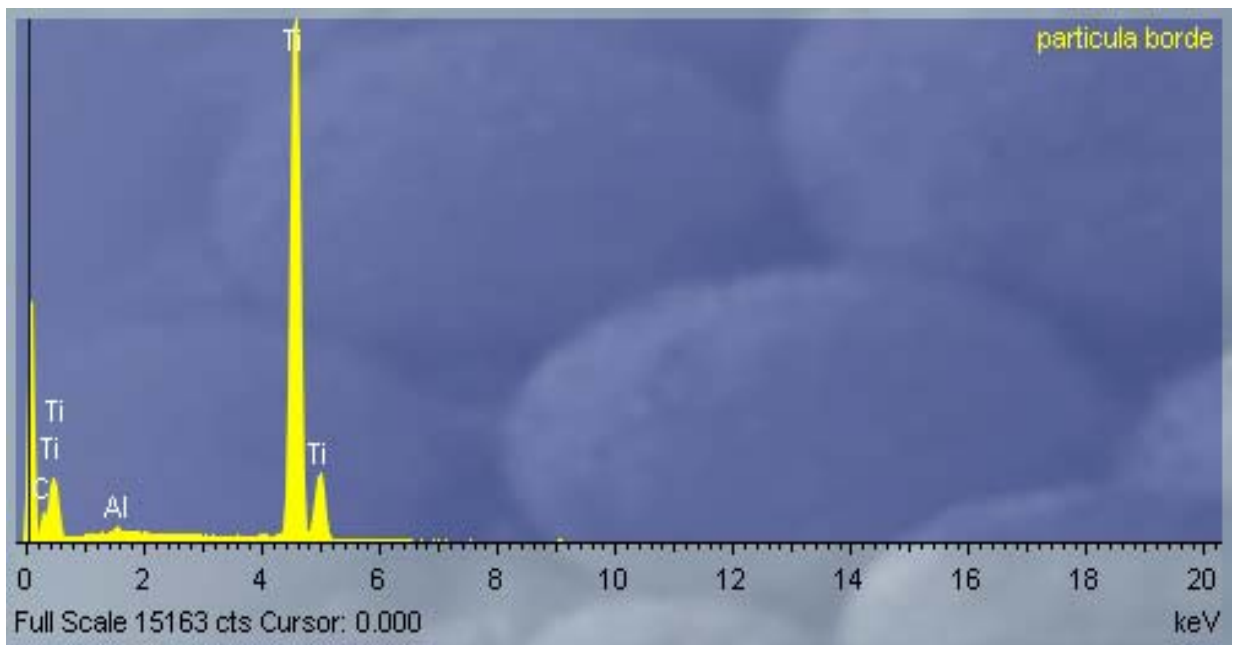
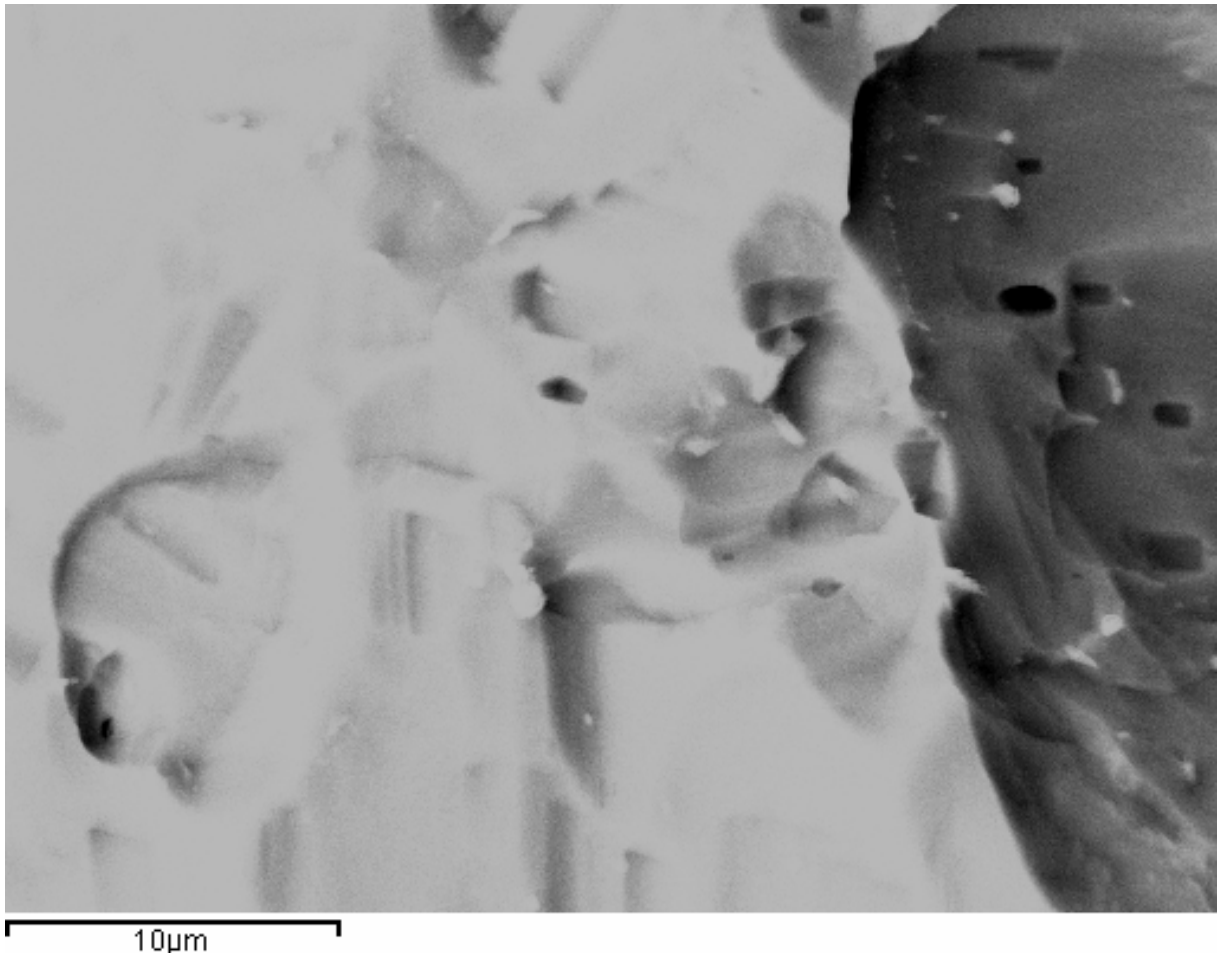


Figura 4.52.: Imagen bidimensional y composición química superficial de la superficie lisa.

#### 4.5 Adhesión celular

Tabla 4.19.: Resultados del análisis de la varianza previo a las comparaciones múltiples en cada grupo.

Variable dependiente: Adhesión celular.

Casos seleccionados: 180 minutos

Adhesión celular en:	F	P
Superficies Titanio	100,4	,000

Tabla 4.20.: Media (DE) del parámetro adhesión celular en los distintos grupos de estudio. Anova. Test de Tukey.

Variable dependiente: adhesión celular.

Factor: Tratamiento de superficie.

Superficie	Media	Desv. estándar	P	Intervalo de confianza	
				Límite inferior	Límite superior
Lisa	20,8	2,2			
Arenada	45	1,9	,000	-30,21	-18,28
Grabada	21	1,5	,999	-6,21	5,71
Arenada-grabada	46	2,8	,000	-31,21	-19,28
Superficie	Media	Desv. estándar	P	Intervalo de confianza	
				Límite inferior	Límite superior
Arenada	45	3,4			
Lisa	20,8	2,8	,000	18,29	30,21
Grabada	21	3,3	,000	18	30
Arenada-grabada	46	3,8	,958	-6,96	4,96

Tabla 4.21.: Resultados del análisis de la varianza previo a las comparaciones múltiples en cada grupo.  
 Variable dependiente: Adhesión celular.  
 Casos seleccionados: 24 horas

Adhesión celular en:	F	P
Superficies Titanio	20,47	,000

Tabla 4.22.: Media (DE) del parámetro adhesión celular en los distintos grupos de estudio. Anova. Test de Tukey.  
 Variable dependiente: adhesión celular.  
 Factor: Tratamiento de superficie.

Superficie	Media	Desv. estándar	P	Intervalo de confianza	
				Límite inferior	Límite superior
Lisa	36,8	3,8			
Arenada	47	4,3	,000	-15,48	-5
Grabada	39	2,7	,595	-7,48	2,98
Arenada-grabada	48	4,6	,000	-16,48	-6
Superficie	Media	Desv. estándar	P	Intervalo de confianza	
				Límite inferior	Límite superior
Arenada	47	4,3			
Lisa	36,8	3,8	,000	-5	15,5
Grabada	39	2,7	,003	2,8	13,2
Arenada-grabada	48	4,6	,940	-6,2	4,23

Tabla 4.23.: Resultados del análisis de la varianza previo a las comparaciones múltiples en cada grupo.  
 Variable dependiente: Adhesión celular.  
 Casos seleccionados: 48 horas

Adhesión celular en:	F	P
Superficies Titanio	1203	,000

Tabla 4.24.: Media (DE) del parámetro adhesión celular en los distintos grupos de estudio. Anova. Test de Tukey.  
 Variable dependiente: adhesión celular.  
 Factor: Tratamiento de superficie.

Superficie	Media	Desv. estándar	P	Intervalo de confianza	
				Límite inferior	Límite superior
Lisa	44	3,4			
Arenada	59	4,5	,000	-21,4	-8,6
Grabada	162	5,8	,000	-124,4	-111,6
Arenada-grabada	83	4,7	,000	-45,4	-32,6

Tabla 4.25.: Resultados del análisis de la varianza previo a las comparaciones múltiples en cada grupo.

Variable dependiente: Adhesión celular.

Casos seleccionados: 72 horas

Adhesión celular en:	F	P
Superficies Titanio	223	,000

Tabla 4.26.: Media (DE) del parámetro adhesión celular en los distintos grupos de estudio. Anova. Test de Tukey.

Variable dependiente: adhesión celular.

Factor: Tratamiento de superficie.

Superficie	Media	Desv. estándar	P	Intervalo de confianza	
				Límite inferior	Límite superior
Lisa	47	3,7			
Arenada	68	4,2	,007	-36,8	-5,7
Grabada	170	6,4	,000	-138,8	107,7
Arenada-grabada	120	5,4	,000	-88,8	-57,7

Tabla 4.27.: Resultados del análisis de la varianza previo a las comparaciones múltiples en cada grupo.  
 Variable dependiente: Adhesión celular.  
 Casos seleccionados: superficie lisa

Adhesión celular en:	F	P
Superficies Titanio	98,57	,000

Tabla 4.28.: Media (DE) del parámetro adhesión celular en los distintos grupos de estudio. Anova. Test de Tukey.  
 Variable dependiente: Adhesión celular.  
 Factor: Tiempo adhesión.

Tiempo	Media	Desv. estándar	P	Intervalo de confianza	
				Límite inferior	Límite superior
180 minutos	20,8	3,6			
24 horas	36,8	2,8	,000	-20,93	-11
48 horas	44	4,2	,000	-28,18	18,31
72 horas	47	3,7	,000	-30,9	-21
Tiempo	Media	Desv. estándar	P	Intervalo de confianza	
				Límite inferior	Límite superior
48 horas	44	4,2			
180 minutos	20,8	3,6	,000	18,31	28,18
24 horas	36,8	2,8	,004	2,31	12,1
72 horas	47	3,7	,387	-7,68	2,18

Tabla 4.29.: Resultados del análisis de la varianza previo a las comparaciones múltiples en cada grupo.  
 Variable dependiente: Adhesión celular.  
 Casos seleccionados: superficie arenada

Adhesión celular en:	F	P
Superficies Titanio	29,68	,000

Tabla 4.30.: Media (DE) del parámetro adhesión celular en los distintos grupos de estudio. Anova. Test de Tukey.  
 Variable dependiente: Adhesión celular.  
 Factor: Tiempo adhesión.

Tiempo	Media	Desv. estándar	P	Intervalo de confianza	
				Límite inferior	Límite superior
180 minutos	45	4,3			
24 horas	47	4,7	,889	-10,30	6,30
48 horas	59	3,3	,002	-22,30	-5,69
72 horas	68	4,2	,000	-31,30	-14,7
Tiempo	Media	Desv. estándar	P	Intervalo de confianza	
				Límite inferior	Límite superior
48 horas	59	3,3			
180 minutos	45	4,3	,002	5,7	22,3
24 horas	47	4,9	,005	3,7	20,3
72 horas	68	4,2	,033	-17,3	-,69

Tabla 4.31.: Resultados del análisis de la varianza previo a las comparaciones múltiples en cada grupo.  
 Variable dependiente: Adhesión celular.  
 Casos seleccionados: superficie grabada

Adhesión celular en:	F	P
Superficies Titanio	906,2	,000

Tabla 4.32.: Media (DE) del parámetro adhesión celular en los distintos grupos de estudio. Anova. Test de Tukey.  
 Variable dependiente: Adhesión celular.  
 Factor: Tiempo adhesión.

Tiempo	Media	Desv. estándar	P	Intervalo de confianza	
				Límite inferior	Límite superior
180 minutos	21	2,7			
24 horas	39	1,8	,002	-29	-7
48 horas	162	4,2	,000	-152	-130
72 horas	170	3,4	,000	-160	-138
Tiempo	Media	Desv. estándar	P	Intervalo de confianza	
				Límite inferior	Límite superior
48 horas	162	4,2			
180 minutos	21	2,7	,000	-130	152
24 horas	39	1,8	,000	111,9	134
72 horas	170	3,4	,190	-19	3



Tabla 4.33.: Resultados del análisis de la varianza previo a las comparaciones múltiples en cada grupo.

Variable dependiente: Adhesión celular.

Casos seleccionados: superficie arenada-grabada

Adhesión celular en:	F	P
Superficies Titanio	165,27	,000

Tabla 4.34.: Media (DE) del parámetro adhesión celular en los distintos grupos de estudio. Anova. Test de Tukey.

Variable dependiente: Adhesión celular.

Factor: Tiempo adhesión.

Tiempo	Media	Desv. estándar	P	Intervalo de confianza	
				Límite inferior	Límite superior
180 minutos	46	2,1			
24 horas	48	3,1	,952	-13,4	9,4
48 horas	83	4,3	,000	-48,4	-25,60
72 horas	120	2,5	,000	-85,4	-62,6

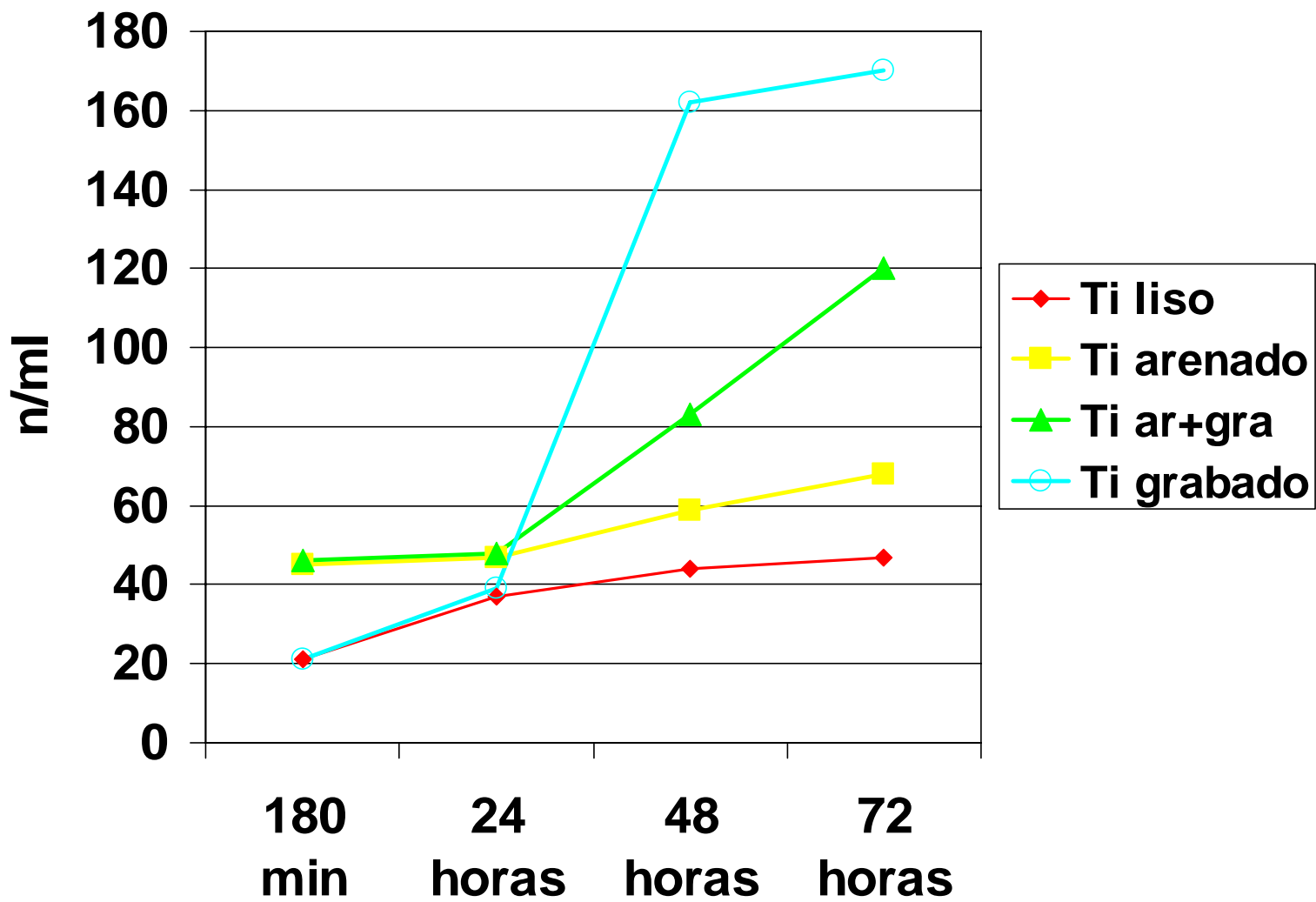
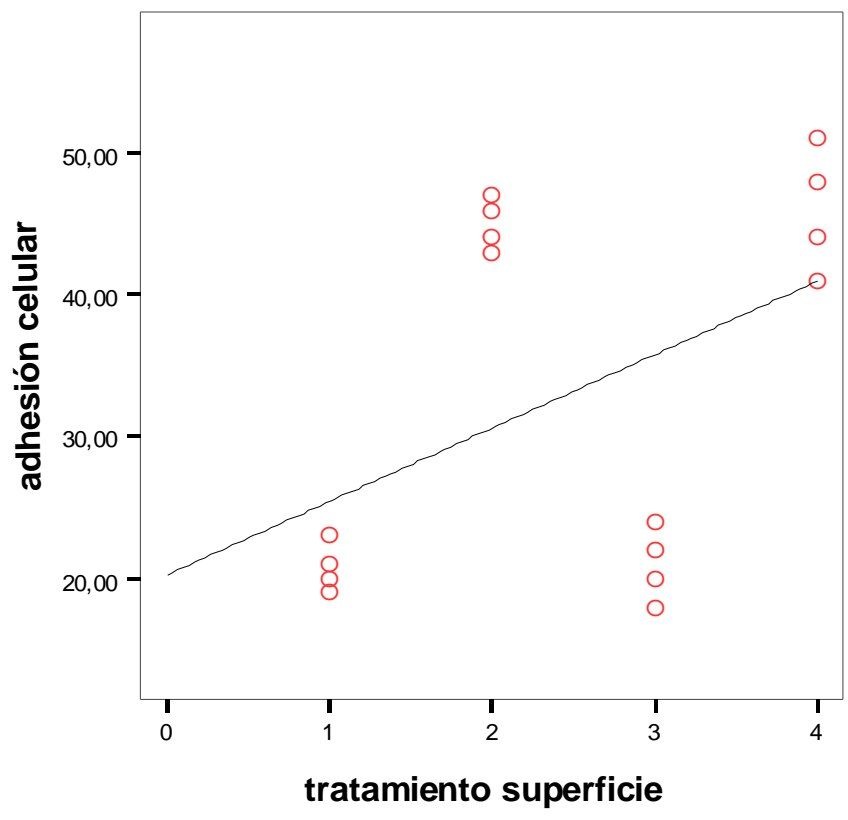


Figura 4.53.: Adhesividad celular con linead e cultivo MG-63 en las superficies de titanio.



Regresión lineal

Figura 4.54.: Regresión lineal en el primer periodo (180 minutos).

# Capítulo 5: Discusión

## Discusión

Si se hace un resumen general de todos los resultados de los múltiples estudios analizados (Buser D. et al, 1991; Marinho V.C. et al, 2003; Cochran D.L. et al, 1999) ) se puede concluir que hay una clara evidencia de que los implantes microrugosos alcanzan más rápido la osteointegración. Adicionalmente, este tipo de implante proporciona, comparado frente a implantes lisos con superficies pulidas o mecanizadas, mayores porcentajes de hueso en contacto con el implante, y una mayor resistencia de la interfase del implante frente a posteriores fuerzas sometidas durante la masticación (Buser D. et al, 1991).

Un aspecto importante en dichos implantes es la determinación del valor y tipo de rugosidad óptimo para favorecer la calidad de la fijación. El tipo de rugosidad de la superficie vendrá condicionado por el tratamiento superficial realizado (arenado, ataque ácido, titanio proyectado por plasma, y/o combinaciones de los anteriores). La osteointegración depende, aparte de las cualidades intrínsecas del propio tejido óseo, de la rugosidad del implante. Sin embargo, a pesar de la evidencia de la influencia de la rugosidad sobre la respuesta de osteointegración, los efectos biológicos de las variaciones en las propiedades topográficas de la superficie del implante no son completamente conocidos.

Por lo menos tres importantes efectos han sido atribuidos (Buser D. et al, 1991) al incremento de la rugosidad de la superficie: el aumento del área de superficie que se adhiere al hueso, la mejoría de la adhesividad celular a la superficie, y el incremento en contacto con la superficie del implante. En esta Tesis se han utilizado superficies rugosas muy diferentes entre ellas (lisa, arenada, grabada, y arenada-grabada). Los tratamientos para crear dichas superficies rugosas han sido todos substractivos, debido a que los tratamientos de adición producen un desprendimiento de partículas en el organismo empezando del momento en que se coloca el implante en el lecho óseo, como se ha afirmado en un estudio llevado a cabo con análisis de retrodispersion de electrones (Franchi M. et al, 2004).

Las superficies rugosas muestran que producen mejor fijación ósea que las superficies lisas (Wilke y cols, 1990; Wennerberg y cols, 1996). Esto puede suceder debido a que la superficie rugosa ejerce un efecto directo en la unión de los osteoblastos y su subsecuente proliferación y diferenciación (Boyan y cols, 1998). De Sanctis y cols, 1996; Hatano y cols, 1999; en un estudio *en vitro* encontraron también gran proliferación celular y gran actividad de la fosfatasa alcalina en células cultivadas en superficie rugosa.

Así mismo, se ha demostrado que los métodos de modificación de la superficie de implantes, afectan significativamente las propiedades resultantes de la superficie y las subsecuentes respuestas biológicas y tasas de adhesión celular que ocurren en la superficie (Keller J.C y cols, 1990). La respuesta celular a la interfase del implante puede estar afectada por la topografía de la superficie a nivel macroscópico (Buser D y cols, 1991), así como por la morfología y la rugosidad de la superficie a nivel microscópico (Rich A y cols 1981; Murray D.W y cols, 1989).

Las superficies empleadas han sido:

- De tipo lisa pulida. Esta superficie ha sido la empleada como referencia frente a los otros tipos de superficie.
- De tipo arenada. Las partículas empleadas han sido de óxido de aluminio de 110  $\mu\text{m}$ . Este tamaño se ha elegido por ser una medida intermedia frente a la gran variedad de tamaños (de 25 a 250  $\mu\text{m}$ ) de partículas ensayadas en estudios científicos previos (Boyan D.B. et al, 1995; Boyan D.B. et al, 1997; Mueller W. et al, 2003).
- De tipo grabada con ácido fluorhídrico (HF), con una concentración del 10%.
- De tipo arenada y grabada. Los tratamientos de arenado con partículas grandes de 250-500  $\mu\text{m}$ , y grabado ácido presentan altos valores de torque de desinserción (Buser D. et al, 1998).

Para los tratamientos de grabado, solo unos pocos ácidos son capaces de reaccionar con el óxido (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HF). El HF es extremadamente reactivo, y por este motivo se recomienda su uso (Bagno A, Di Bello C, 2004). Son varios los autores

que utilizan en su protocolo el grabado ácido para obtener una superficie rugosa en el implante: ácido fluorídrico HF al 2%, y ácido nítrico HNO<sub>3</sub> al 10% (Buser D. et al, 1991; Boyan B.D. et al, 1997).

Respecto a la pasivación de la superficie, es necesario su empleo para reducir la emisión de iones con efecto tóxico, que podrían provocar efectos adversos en el proceso local de osteointegración y a nivel sistémico en el cuerpo del paciente (Boyan B.D. et al, 1997). Se ha propuesto que la pasivación produce superficies de titanio c.p. más estables y menos capaces de emitir iones respecto a superficies no pasivadas (Callen B.W. et al, 1995). Además, estos cambios en la superficie de titanio producidos por la pasivación se conservan durante el proceso de autoclavado (Callen B.W. et al, 1995).

La superficie de óxido está afectada por los tratamientos químicos que modifican la superficie, que la pasivan, o que esterilizan la superficie del implante (Keller et al, 1994). Estos tratamientos afectan la respuesta celular *in vitro* y *in vivo* (Bowers et al, 1992; Chehroudi et al, 1992).

Es posible producir pasivación química con HNO<sub>3</sub>, o exponiendo la superficie a aire o agua caliente (Bagno A, DiBello C, 2004). Estos tratamientos pueden introducir en la superficie grupos OH, que modificarían las propiedades químicas de la superficie. Por otro lado, ninguno de los tratamientos de pasivación pueden modificar la topografía superficial. En el presente trabajo se ha utilizado para la pasivación de la superficie ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) con una concentración del 30%, según las indicaciones de las normas ASTM-F86 que limita la concentración para utilizar desde el 20% al 40%. El nivel de la rugosidad de las superficies se ha medido con los microscopios confocal de barrido (MCB) y de fuerzas atómicas (MFA).

En cuanto a los resultados obtenidos, es de destacar la dificultad de establecer una comparativa con otros estudios similares llevados a cabo con diferentes superficies, debido a las diferentes condiciones experimentales relacionadas con la evaluación de los parámetros utilizados para medir la rugosidad y la adhesión celular.

La medición de la rugosidad con MFA y MCB es necesaria para medir el valor de la rugosidad antes de las pruebas de adhesión celular. Wennenberg y otros autores (Wennenberg A. et al, 1998) han observado que el arenado con medidas controladas de las partículas no produce necesariamente idénticas rugosidades de superficie en diferentes experimentos. Adicionalmente, han sugerido que existen otros factores que pueden influenciar la rugosidad de una superficie, siendo por este motivo importante medir la rugosidad en cada estudio, de forma previa a las pruebas *in vivo* o *in vitro*.

En esta Tesis se ha medido de la rugosidad de las superficies con MCB y MFA, utilizando, entre otros parámetros, la media aritmética de las desviaciones del perfil ( $R_a$ ), que corresponde al valor absoluto de las distancias desde la línea media al perfil  $R$ , dentro del intervalo de muestras. Dicho parámetro es el habitualmente elegido para cuantificar de forma general la rugosidad de una superficie. Valores altos de  $R_a$  están relacionados con un alto nivel de anclaje del implante al hueso, medido mediante un método de push-out o mediante la medición del torque de desinserción del implante (Goffresen K. et al, 2000).

En (Kohles S.S. et al, 2004) se han analizado cuatro superficies empleando un perfilómetro tipo stylus, un interferómetro, y un microscopio electrónico. Las superficies más rugosas fueron, por orden de mayor a menor, la TPS, la recubierta de hidroxiapatita, la grabada, y la lisa. Así mismo, Mueller y otros (Mueller W. et al, 2003) han analizado tres superficies registrando los valores de  $R_{max}$ ,  $R_a$  y  $R_z$ . Los tres parámetros se han mostrado mayores en la superficie arenada con  $Al_2O_3$ , respecto de la superficie arenada por biopartículas cerámicas, y la superficie mecanizada (que constituía el grupo control del experimento).

London y otros (London R.M. et al, 2002) han medido con un perfilómetro los parámetros  $R_a$ ,  $R_q$ , RMS,  $R_t$ , de implantes con superficie tratada con doble grabado ácido, maquinada, TPS y HA. Las superficies TPS y HA tuvieron además de los valores más altos de rugosidad, un incremento de área de superficie de treinta veces respecto a la superficie de control.

Se ha llevado a cabo un estudio utilizando con un microscopio confocal el parámetro  $S_a$  de altura media. El implante con superficie lisa ha tenido un valor de  $S_a$  de

0,53  $\mu\text{m}$  y el de superficies rugosa de 0.94  $\mu\text{m}$ . El aumento de área de superficie fue de 15,38 % y 19,89 % respectivamente (Abrahamsson I. et al, 2001).

Wennenberg y colaboradores (Wennenberg A. et al, 2004) han demostrado que el valor de la rugosidad de una superficie aumenta al aumentar del tamaño de las partículas usadas en el proceso de arenado. La superficie lisa ha obtenido una altura media 0,76  $\mu\text{m}$ , la superficie arenada con partículas de 25  $\mu\text{m}$  ha tenido un valor de 1,27  $\mu\text{m}$  con aumento del área de superficie de 47%, la superficie arenada con partículas de 75  $\mu\text{m}$  ha tenido un valor de altura de 1,43  $\mu\text{m}$  con aumento del area del 49%, y la superficie arenada con partículas de 250  $\mu\text{m}$  ha tenido un valor de altura media de 2,21  $\mu\text{m}$  con aumento del área del 83%.

Tal y como ya se ha comentado, la rugosidad se cuantifica con una serie de parámetros verticales y horizontales. Los parámetros verticales aumentan al aumentar el aspecto rugoso de la superficie debido a que el impacto de las partículas deforma plásticamente una área superior, desplazando el metal a lado y lado de su periferia, dejando huellas de tamaño superior con picos más altos y valles más profundos. Contrariamente, los parámetros horizontales aumentan al disminuir los tamaños de las partículas y, por lo tanto, al disminuir el aspecto rugoso de la superficie. Esto es así porque los parámetros horizontales evalúan el número de picos y/o valles que hay por unidad de longitud de perfil. Consecuentemente, el impacto de partículas menores permite para una misma área tratada un mayor número de partículas impactando sobre ella y, por lo tanto, una menor distancia entre valles y picos.

En esta Tesis se calcularon con el MFA valores para 4 parámetros de descripción vertical (o en altura) del perfil:  $R_a$ ,  $R_q$ ,  $R_{\text{max}}$ , Srf Area.

En esta Tesis los valores de  $R_a$  y de incremento de área de superficie calculada con la formula:

area real / area real superficie lisa X 100 – 100 = incremento percentil área de superficie

Según estos resultados parece evidente que la rugosidad de la superficie proporciona un incremento de la área de superficie que confirma los resultados de otros



estudios. Las superficies rugosas tienen un incremento del área de superficie que determina un contacto con el hueso mayor respecto a las superficies lisas (Lampin M. y cols, 1997; por otra parte se ha afirmado que el incremento de superficie corresponde a un incremento de contacto hueso-implante (Buser et al, 2001)

Además de aumentar el área de superficie, la rugosidad afecta la humectabilidad (Kilpadi D.V. et al, 1994). La medición de la humectabilidad de una superficie representa un índice predictivo de la citocompatibilidad (Lampin M. y cols, 1997; Mekayarajjananonth T. y cols, 1999).

La humectabilidad de la superficie es conocida por influenciar las interacciones entre la superficie del implante y el medio circundante. Las moléculas inorgánicas como iones de calcio y fosfato son absorbidas desde la sangre en la superficie hidratadas de TiO<sub>2</sub>. Igualmente importantes son las interacciones que culminan con la absorción de moléculas orgánicas como son las proteínas, lipoproteínas, y peptidos, a la superficie de TiO<sub>2</sub>. Estas interacciones pueden ocurrir electroestáticamente entre superficie de TiO<sub>2</sub> cargada negativamente y grupos aminoácidos cargados positivamente (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), o entre grupos aminoácidos cargados negativamente (COO<sup>-</sup>) y puentes (Ca<sup>++</sup>) que han sido previamente absorbidos por la superficie TiO<sub>2</sub> cargada negativamente. Además, un directo enlace de COO<sup>-</sup> en la superficie de cationes de Ti pueden tomar sitio por reemplazo de grupos hidroxilados (OH<sup>-</sup>) (Textor M. et al, 2001).

El ángulo de contacto puede caracterizar la humectabilidad de la superficie de un sólido por un líquido, y la interacción entre una superficie sólida y una líquida en la interfase, y se representa la relación termodinámica de Young:  $y_{sv} = y_{sl} + y_{lv} \cos \theta$ .

El aumento de la humectabilidad potencia la interacción entre superficie del implante y el ambiente externo. Se ha hipotizado que el aumento de la humectabilidad y de la retención del coágulo a las superficies tratadas producen un aumento de la osseointegración probablemente por mecanismos que promueven la osteointegración en la superficie del implante (Davies J.E, 1998).

La relación de Wenzel (Wenzel R.N, 1936)  $\cos \theta_w = r \cos \theta_y$  describe ángulos de contacto aparentes formados en un régimen de humectabilidad ideal, donde r es el factor de rugosidad definido como actual superficie geométrica, y  $\theta_y$  es el ángulo de contacto

de Young. Sobre una superficie lisa ideal el factor  $r$  de rugosidad equivale a 1, y el ángulo de contacto de Wenzel equivale al ángulo de contacto de Young.

Generalmente siguiendo la relación de Wenzel, el aumento de la rugosidad se acompaña con una disminución del ángulo de contacto si  $\theta_y < 90^\circ$  y incremento del ángulo de contacto si  $\theta_y > 90^\circ$ . En nuestros experimentos esta tendencia se ha confirmado.

Se han descrito en la literatura científica varios protocolos para la medición del ángulo de contacto. El agua destilada o desionizada ha sido normalmente empleada para las medidas del ángulo de contacto (Lampin M. et al, 1997; Keller J.C. et al, 1994; Mekayarajjananonth T. et al, 1999; Kilpadi D.V. et al, 1994), también se ha utilizado el glicerol (Lampin M. et al, 1997; Mekayarajjananonth T. et al, 1999), una solución de cloruro de sodio (NaCl) al 1.0% (Oshida Y. et al, 1993), neutrófilos (Lim Y.J. et al, 2001), NaCl y dimetilsulfoxide (Bathomarco R.V. et al, 2004).

En esta Tesis se utilizó agua destilada desionizada por ser un medio de fácil requerimiento y manipulación. Además el medio líquido utilizado en la medición del ángulo de contacto no produce diferencias significativas. En un estudio de Lim y otros (Lim Y.J. et al, 2001) a pesar de haberse utilizado 4 diferentes medios de contacto hubo pequeñas diferencias no significativas con tendencias similares de los valores del ángulo de contacto en las superficies analizadas.

Los valores de ángulo de contacto obtenidos en nuestros experimentos son todos  $< 90^\circ$  como en otros estudios (Lim Y.J. et al, 2001; Zhu X. et al, 2004), concretamente todas las superficies son hidrofílicas.

Nuestros valores del ángulo de contacto disminuyen progresivamente al aumentar de la rugosidad, de acuerdo con otro estudio (Bathomarco R.V. et al, 2004). La rugosidad incrementa el ángulo de contacto si su valor en la superficie no rugosa del mismo material es  $> 90^\circ$  y lo disminuye si el ángulo es  $< 90^\circ$  (Bico J. et al, 1999).

Según los valores de ángulo de contacto obtenidos en esta Tesis todas las superficies estudiadas en el presente estudio favorecen la adhesión celular en cuanto las células de mamíferos pueden adherirse a superficies hidrofílicas con más afinidad respecto a las superficies hidrofóbicas (Vogler E.A, 1998).

La adhesividad celular en su estadio precoz está afectada por propiedades físicas y químicas, incluso la humectabilidad (Shakenraad J.M, et al, 1986), otros autores

(Lincks L. et al, 1998) subrayan el role fundamental de la rugosidad en la determinación de la adhesión celular.

Las superficies rugosas alcanzan un tipo de anclaje micromecanico fuerte, el proceso de cicatrización está caracterizado por el osteogénesis de contacto (Davies J.E, 1998) y por una mas rápida trabeculizacion ósea y crecimiento óseo (Buser D, 1991).

Los estudios con cultivos celulares son cada vez mas atractivos a efectos de entender, controlar y dirigir las interacciones interfaciales a las superficies de los implantes. En particular los cultivos de osteoblastos (primarios o obtenidos a través de tumores) son frecuentemente utilizados para evaluar el efecto de la rugosidad de la superficie en el medio celular y el metabolismo. Cooper L.F y cols, 1999; utilizaron osteoblastos en la superficie de titanio con diferentes tipos de rugosidad para evaluar el efecto de la topografía en la mineralización.

Michaels y colaboradores (Michaels et al, 1989) han determinado que había un mas alto porcentaje de MG63 adheridas a titanio (cpTi) rugoso producido por arenado con macroparticulas respecto a superficie lisa pulida con pasta de diamante de 1- $\mu$ m. Estos resultados han sido confirmados por (Keller et al, 1994).

No hay evidencia absoluta del hecho que la adhesión celular *in vitro* aumente al aumentar de la rugosidad. Los resultados de algunos estudios ponen en evidencia un incremento en el numero de osteoblastos primarios o células de osteosarcoma adheridas a la superficie coincidente con el incremento de los parámetros de rugosidad superficial (Bowers K.T. et al, 1992; Stanford C.M. et al, 1994, Degasne I. et al, 1999).

Sin embargo otros estudios afirman que al aumentar de la rugosidad superficial disminuye la proliferacion celular usando celulas MG63 (Martín J.Y. et al, 1995;) y cultivos primarios de celulas osteoblasticas humanas (Anselme K. et al, 2000).

Bowers y col. [BKR92] y Martin y col. [MSH95] han demostrado que la adhesión de osteoblastos de la línea MG63 ha sido superior en las superficies de titanio arenado que en las que no lo estaban. 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.

En nuestra Tesis los valores de adhesividad celular confirman las mismas tendencias de los valores de rugosidad obtenidos con MFA y MCB. En cada superficie tratada la adhesión celular es significativamente mas alta que en la superficie control. Esta diferencia de valores es significativa para las superficies arenada y arenada-grabada ya en el intervalo de 180 minutos. A las 24 horas los osteoblastos se adhieren significativamente mas en la tres superficies rugosas respecto a la superficie lisa. Esta diferencia se hace mas evidente todavía a las 72 horas.

La superficie grabada ha sido la que mas células adheridas tuvo a las 72 horas. La superficie arenada ha mostrado mas alto valor de rugosidad en el MFA y MCB, ha mostrado mas bajo valor de ángulo de contacto que la grabada, así que demuestra ser menos favorable para la promoción de la adhesión celular. Este hecho puede ser debido al patrón de la alteración de dicha superficie, un patrón de rugosidad irregular y heterogéneo. Realmente existe una relación directa entre humectabilidad, rugosidad y adhesión celular. Las dos superficies que mayor humectabilidad y rugosidad han tenido son las mismas que en el primer intervalo de tiempo muestran la mas alta adhesión celular. Sin embargo esta tendencia cambia resultando las superficies grabada y arenada-grabada en los intervalos finales las que mas celulas adheridas tienen. Los factores de humectabilidad y rugosidad son determinantes en la adhesión celular en los primeros estadios, sin embargo con el tiempo el patrón de rugosidad homogéneo, ondulado, la presencia y el tamaño de los poros presentes en la superficie, y la menor heterogeneidad química de la misma determina un mejor resultado en las superficies sometidas a grabado ácido.

El proceso de grabado crea una rugosidad mas uniforme en la superficie, suavizando la rugosidad y creando una superficie mas “ondulada” con una característica porosidad dispersa respecto a la superficie arenada, así que la superficie grabada resulta claramente mas compatible con las células MG-63.

El role de la geometría y la homogeneidad de los picos y valles que forman la rugosidad ha sido subrayado en un estudio donde a pesar de los valores de rugosidad la

superficie que mejor resultados ha obtenido en el test de desinserción de los implantes es la superficie arenada (Ronold H.J. et al, 2002).

Otro estudio que confirma la importancia del patrón de la rugosidad es uno de Bigerelle y Anselme (Bigerelle M, Anselme K, 2004), en el cual los autores no consiguen demostrar ningún efecto de la composición del material o la amplitud de la rugosidad en la proliferación celular, sin embargo han observado que el factor realmente influyente ha sido la morfología de la superficie.

Las superficies tratada con grabado ácido pueden incrementar la cantidad de contacto hueso-implante (Buser D. et al, 1991) sin producir por eso efectos adversos en la adhesión celular (Wennenberg A. et al, 1996; Boyan B.D. et al, 1997).

La superficie arenada-grabada que presenta macro depresiones circulares, y estructura porosa polidispersa ha presentado un valor de adhesión osteoblastica mas bajo que la superficie grabada. En esto influiría la acción de las partículas de oxido de aluminio  $Al_2O_3$ , los restos de las partículas como se ve en la análisis de electrones retrodispersados se localizan mas en la superficie arenada, y menos en la arenada grabada por la acción del proceso de grabado. La presencia de estos restos inhibirían en grado diferente la adhesión celular.

Sin embargo Wennenberg y otros (Wennenberg A. et al, 1996; Wennenberg A. et al, 1995), no han detectado efectos adversos producidos por iones aluminio presentes en la superficie del implante, además de confirmar como en nuestros experimentos que los procesos de grabado y pasivado de la superficie proporcionan una eliminación casi completa de las partículas de aluminio.

Durante análisis con microscopio electrónico se pudo observar en la superficie lisa los característicos surcos producidos durante el pulido de la superficie. A mayor magnificación se pueden observar poros debidos a la estructura cristalina de titanio y provocados por ningún procedimiento de preparación.

La superficie arenada presenta una rugosidad irregular y heterogénea con hoyos agudos, presenta muchos restos de partículas de aluminio. La superficie arenada y

grabada no presentó partículas de aluminio debido al proceso de grabado y pasivado siguientes al arenado. Presenta macrocráteres producidos por el proceso de arenado y microporos con un tamaño medio de 1,31  $\mu\text{m}$  debidos al grabado ácido con HF. La superficie grabada ha presentado una rugosidad “ondulada” con porosidad dispersa el tamaño medio de los poros ha sido de 1,95  $\mu\text{m}$ .

La porosidad es otra característica importante de la superficie de titanio c.p. Una superficie porosa se caracteriza por la medida de los poros, la forma, el volumen, la profundidad del poro, que es afectada por la medida de la partículas esféricas, las condiciones de temperatura y de presión de la cámara de modificación de la superficie (Pilliar R.M, 1998). La profundidad del poro depende de la medida de la partícula y su concentración por unidad de área. Una profundidad del poro de 150 a 300  $\mu\text{m}$  parece ser la medida optimal por el crecimiento y máximo contacto entre hueso y la superficie porosa (Osaka N, Nagata T, 1987).

En un estudio de se mide la anchura de los poros de distintas superficies, midiendo el torque de remoción las superficies en función de la anchura de los poros, con el aumento de la porosidad hasta un 23,7% aumenta el valor del torque y continuando el aumento de la porosidad disminuye el torque de desinserción. El torque medio de desinserción aumenta directamente al aumentar de la medida del poro de 0,5 y 1,5  $\mu\text{m}$ , y disminuye con el aumento de la medida 2,5 y 3,0  $\mu\text{m}$ . Una conclusión de este estudio afirma que la medida optimal de los poros es  $\leq 2,0 \mu\text{m}$  (Sul Y. et al, 2005). El implante TiUnite tiene una porosidad que va desde 1 a 5  $\mu\text{m}$  (Hall J. y Lausmaa J, 2001). Otros autores afirman que en diferentes superficies con porosidad similar el patrón y la velocidad de formación de hueso dependen de la química de la superficie (Ducheyne P. y Qiu Q, 1999).

La composición química de un implante determina una serie de características superficiales entre otras: la energía superficial. En esta Tesis se han analizado las características químicas de las diferentes superficies mediante análisis de retrodispersión de electrones.

Se ha registrado la presencia del oxígeno en las superficies tratadas, la presencia de este elemento se puede atribuir a la capa de óxido de titanio, otro posible motivo

podría ser la presencia de grupos hydroxilados/hidratos que rinden la superficie mas hidrofílica (Textor M. et al, 2001). En nuestro estudio las superficies tratadas presentan mas porcentaje de oxígeno respecto a la superficie lisa, este hecho demostraría una mayor hidrofílica de las superficies rugosas, resultado que se confirma en los valores de ángulo de contacto.

Se ha detectado la presencia de carbono (C) en todas las superficies, el mas bajo nivel de carbono se ha registrado en las superficies arenada-grabada y grabada, estos niveles reducidos de carbono son típicos de las superficies químicamente limpias (Textor M. et al, 2001) respecto a las superficies lisas y arenadas que han absorbido CO<sub>2</sub> y otras moléculas orgánicas desde el aire.

Esta misma contraposición en los niveles de oxígeno y carbono se hubo en un estudio de Buser y otros (Buser D. et al, 1991). En otro estudio de Morra (Morra M et al, 2003) se encontró que las superficies lisas contienen niveles de carbono significativamente mas altos que las superficies grabadas, y niveles de titanio mucho menores, el ataque ácido remueve muchas de las moléculas contaminantes de carbono introducidas en el proceso de pulido junto con la capa externa de titanio.

En un estudio se examinaron 3 superficies: en la superficie lisa se observó alta concentración de nitrógeno N<sub>2</sub>, en la superficie arenada con partículas de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> se encontraron elementos de aluminio. En la superficie arenada con biocerámica se encontraron calcio (Ca) y fósforo (P) (Mueller W. et al, 2003).

En la observación al microscopio electrónico se observa además de células adheridas un conjunto proteico amorfo circundante las células mismas que recubre la superficie de la muestra casi totalmente. Este conjunto de proteínas se dispone previamente a la adhesión celular actuando como medio de la siguiente adhesión y proliferación celular. Esta adsorción de proteínas 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).

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, 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) presente en la fibronectina y la vitronectina, entre otras.

La naturaleza química del sustrato sintético es 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.

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.

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; así como en la respuesta de las células a agentes reguladores locales y sistémicos.

En la observación al microscopio electrónico en esta Tesis se han observado células adheridas a la superficie con los característicos pseudópodos, el número de estos cambia en relación al tipo de superficie. La misma diferencia se observa en la conformación de las células. En las superficies grabadas las células adheridas demuestran unas más pronunciadas morfologías a eje bi- o tripolar comparadas con células de otras superficies.

No se notaron diferencias morfológicas importantes entre las superficies grabada y arenada-grabada. La extensión de la membrana plasmática hacia todas las direcciones se combina con una distribución en una área más ancha y un aspecto más aplanado de las células.

En la superficie arenada las células proliferan hacia uno o dos direcciones sin embargo las prolongaciones plasmáticas no son completamente confluentes.



En la superficie lisa los cambios morfológicos son poco evidentes, las células presentan forma esférica sin protrusiones evidentes, sin embargo en las superficies grabada y grabada-arenada se observa una adaptación marcada de la célula a los surcos y varias irregularidades de la superficie. El cuerpo celular en la superficie lisa tiene una dimensión de 10  $\mu\text{m}$  mientras en las superficies grabadas tienen este valor aumentado hasta a 15-20  $\mu\text{m}$  aplastando más a la superficie la célula, con prolongaciones que pueden alcanzar los 50  $\mu\text{m}$ . Esta diferencia en las dimensiones y en número de pseudópodos confirma las conclusiones de un estudio de Boyan y colaboradores: la rugosidad de la superficie mejora la adhesión de las células MG63 y parece tener un efecto en la configuración y conformación de los pseudópodos celulares, además se ha visto que las células en superficies rugosas relajan valores más altos de factores relacionados con la formación ósea (Boyan B.D. et al, 1997).

Otra teoría que justifica la diferencia en la forma de la célula se refiere a la medida del osteoblasto, 10  $\mu\text{m}$ , existe un cierto rango de rugosidad que puede ser percibido por las células, de manera que no consiguen aplanarse y proliferar hacia una morfología fibroblástica; asumen de forma diferente un morfotipo osteoblástico. El aumento de la adhesión celular se acompaña a un aumento de la rugosidad, número y tamaño de microporos.

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 (Degasne I. et al, 1999)

El sustrato de la superficie altera la forma de la célula y modula la fibronectina al nivel transcriptional y post transcriptional, así como la cantidad de fibronectina ensamblada en la matriz extracelular, la topografía de la superficie del titanio puede afectar la expresión de las integrinas receptoras de la fibronectina y vitronectina modificando su agregación y determinando variaciones en la forma y proliferación celular (Degasne I. et al, 1999).

Durante la proliferación celular, la forma de la célula se modifica y el citoesqueleto se va reorganizando. En nuestro estudio de análisis morfológica de la células adheridas a las superficies se notaron cambios significativos en la forma y en la área de superficie cubierta por las células resultando mas amplias las células en las dos superficies grabadas, en estas superficies la forma era poligonal e irregular. Esto se puede explicar por el hecho que la topografía y la micro-rugosidad de la superficie afecta la proliferación celular.

# Capítulo 6: Conclusiones

Los tratamientos de superficie utilizados afectan las propiedades superficiales.

La superficie lisa es la que peor humectabilidad tiene seguida por la superficie grabada, la superficie areanada, y la superficie areanada-grabada.

La superficie lisa es la que peor rugosidad tiene seguida por la superficie grabada, la superficie areanada, y la superficie areanada-grabada.

Morfológicamente la superficie areanada tiene un patrón de rugosidad irregular y disomogéneo.

Morfológicamente las superficies grabadas tienen un patrón de rugosidad homogéneo y ondulado.

En los estadios iniciales las superficie que mayor adhesión celular tuvieron fueron las superficies lisa y areanada.

A las 72 horas las superficie grabada y areanada-grabada son las superficies que mayor adhesión tienen.

Existe una clara relación entre humectabilidad y rugosidad en las diferentes superficies estudiadas.

Existe una relacion no tan clara entre rugosidad y humectabilidad y adhesión celular.

El grado de humectabilidad y rugosidad facilita la adhesión celular en las fases iniciales como es el caso de la superficie areanada y areanada-grabada.

La morfológica heterogénea no facilita la adhesión celular como es el caso de la superficie arenada.

El tratamiento de arenado grabado es el mejor tratamiento teniendo mas adhesividad celular y superficie porosa y un patron de rugosidad homogéneo.

# Summary

The quality of the implant surface is very important to osseointegration, healing time, and tissue regeneration. In oral surgery there are four different titanium surfaces that are usually used in dental implants: machined, acid etched, blasted and blasted and acid etched.

**OBJECTIVES:** The objectives of this study were to compare the morphology, chemical composition, roughness and wettability of these four titanium surfaces, and their relation with cell adhesion.

**MATERIAL AND METHOD:** Titanium disks were prepared from 2 mm thick sheets of grade 2 unalloyed titanium. The disks had a diameter of 12 mm. The samples were polished to obtain a mirror finish surface and were modified by either chemical etching or blasting. A Scanning Electron Microscopy was used to determine the surface morphology; the chemical analysis was performed by using Backscattered Electrons; for the study of roughness an Atomic Force Microscopy (AFM) and Confocal Microscopy were used; the wettability was determined by the contact angle measure. MG63 cell line in culture with the different titanium surfaces and a cell counter were used to determine cellular adhesion.

**RESULTS AND CONCLUSIONS:** The surface treatments had a strong influence in the physical properties of samples. Blasted surfaces had a non-homogeneous and irregular pattern. Acid etched surfaces had a homogeneous undulating and porous pattern. Acid etched surfaces were the cleanest. The surfaces that had undergone an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  blast and acid attack treatment presented a higher area compared to those that were machined and chemically etched. Machine surfaces presented the worst wettability. In cellular adhesion assay we observed a favourable effect in this cellular property with blasted and acid etched surfaces.

# Riassunto

Il tipo della superficie dell'impianto dentale è molto importante nella osteointegrazione, il tempo di cicatrizzazione, e la rigenerazione tissutale. Nella chirurgia orale esistono quattro differenti superfici di titanio che sono normalmente usate in implantologia: la superficie pulita, mordenzata, arenata e arenata- mordenzata.

## OBIETTIVI

Gli obiettivi di questo studio sono stati confrontare la morfologia, la composizione chimica, la rugosità e la umettabilità delle quattro superfici di titanio studiate, e la loro relazione con la adesione cellulare.

## MATERIALE E METODO

I dischi di titanio commercialmente puro (Grado 2) sono stati preparati in modo tale da misurare 12 mm di diametro e 2 mm di spessore. Le mostre sono state pulimentate fino ad ottenere una superficie "a specchio". Successivamente sono state trattate con arenato di polvere di ossido di alluminio  $Al_2O_3$ , con trattamento acido o con entrambi.

Si utilizzò un microscopio elettronico per determinare la morfologia superficiale; la analisi chimica è stata effettuata usando un apparecchio con retrodispersione di elettroni; per lo studio della rugosità si utilizzarono il Microscopio di forza atomica e un microscopio di luce confocale; la umettabilità è stata determinata misurando l'angolo di contatto delle quattro superfici. La linea cellulare MG-63 con le differenti superfici di titanio e un contatore cellulare sono stati utilizzati per determinare la adesione cellulare.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

I trattamenti di superficie hanno una importante influenza sulle proprietà fisiche delle mostre. La superficie arenata mostra un modello di rugosità non omogeneo e irregolare.

Le superfici trattate con acido presentano un modello di rugosità omogeneo, ondulato e una superficie porosa.

Le superfici trattate con acido sono state chimicamente le più pure.

Le superfici sottoposte a arenato con  $Al_2O_3$  e attacco acido presentano una area di superficie piú alta rispetto al gruppo controllo e al gruppo sottoposto a attacco con acido.

La superficie pulita presenta la peggiore umettabilitá.

Le superfici sottoposte a attacco acido presentano la piú alta adesione cellulare.

# Bibliografía

Abrahamsson I, Zitzmann N.U, Berglund T, Wennberg A, Lindhe J. Bone and soft tissue integration to titanium implants with different surface topography: an experimental study in the dog. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16:323-332.

Albrektsson T, Branemark P.I, Hanson H.A, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone anchorage in man. *Acta Orthop Scand* 1981;52:155-170.

Albrektsson T, Johansson C, Lundgren A.K, Sul Y.T, Gottlow J. Experimental studies on oxidized implant. A histomorphometrical and biomechanical analysis. *Appl Osseointegration Res* 2000; 1: 21-24.

Altankov G, Groth T. Reorganization of substratum-bound fibronectin on hydrophilic and hydrophobic materials is related to biocompatibility. *J Mater Sci Mater Med* 1994;5:732-7.

Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Dufresne E, Judas D, Lost A, et al. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *J Biomed Mater Res* 2000;49:155-66.

Ayuhawa Y, Takeshita F, Inoue T, Yoshinari M, Shimono M, Suetsugu T Tanaka T. An immunoelectron microscopic localization of noncollagenous bone proteins (osteocalcin and osteopontin) at the bone-titanium interface of rat tibiae. *J Biomater Res* 1998;41:111-9.

Bagno A, Di Bello C. Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials. *J Materials Science:Materials in Medicine* 2004;15:935-949.



Baier RE, Meyer AE, Akers CK, et al. Degradative effects of conventional steam sterilization on biomaterial surfaces. *Biomaterials* 1982;3:241-5.

Balshi TJ, Wolfinger GJ, Balshi II SF. Analysis of 356 pterygomaxillary implants in edentulous arches for fixed prosthesis anchorage. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:398-406.

Bathomarco R.V, Solorzano G, Elias C.N, Prioli R. Atomic force microscopy analysis of different surface treatments of Ti dental implant surfaces. *Applied Surface Science* 2004;233:29-34.

Beder O.E, Ploger W.J. Intraoral titanium implants. *Oral Surg Oral Med Oral Path* 12(7): 787-799, 1959.

Bernardi G, Kawasaki T. Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxyapatite columns. *Biochim Biophys Acta*. 1968;160:301-310.

Bernardi G, Giro M.G, Gaillard C. Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxyapatite columns: some new developments. *Biochim Biophys Acta*. 1972;278:409-420.

Bico J, Marzolin C, Quere D. Pearl drops. *Europhys Lett* 1999;47:220-6.

Bigerelle M, Anselme K. Statistical correlation between cell adhesion and proliferation on biocompatible metallic materials. *J Biomed Mater Res* 2005;72A:36-46.

Bowers K.T, Keller J.C, Michaels C.M, Randolph B, Wick D.G. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1992;7:302-310.

Boyan B.D, Hummert T.W, Kieswetter K, Schraub D, Dean D.D, Schwartz Z. Effect of titanium surface characteristics on chondrocytes and osteoblast in vitro. *Cell Mater* 1995; 5: 323-335.

Boyan B.D, Batzer R, Kiswetter K, Liu Y, Cochran DL, Szmuckler-Moncler, Dean D.D & Schwartz Z. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG 63 osteoblast-like cells to  $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ . *J Biomed Mater Res* 1997; 39:77-85.

Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* 1996;17:137-46.

Bothe T. R, Beaton L.E, Davenport H.A. Reaction of bone to multiple metallic implants. *Sur Gynecol Obst* 71(6): 598-602,1940.

Branemark P.I, Hansonn B.O, Adell R, Breine U, Lindstrom J, Hallen O, Ohman A. Osseointegrated titanium implants in the treatment of the edentulous jaw. *Scand J Plast Reconstr Surg* 11 (Suppl 16):1-175.

Butler W.T, Ritchie H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol* 1995;39:169-79.

Buser D, Schenk R.K, Steinemann S, Fiorellini J.P, Fox C.H, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 1991; 25: 889-902.

Buser D, Nydegger T, Hirt H.P, Cochran D.L, Nolte L.P. Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. *Int Oral Maxillofac Implants* 1998;13:611-619.

Callen B.W, Lowenberg B.F, Lugowski S, Sodhi R.N.S, Davies J.E. Nitric acid passivation of Ti6Al4V reduces thickness of surface oxide layer and increases trace element release. *J Biomed Mater Res* 1995;29:279-290.

Carlsson L, Rostlund T, Albrektsson B, Albrektsson T. Removal torque for polished and rough titanium implants. *Int J Oral Maxillofacial Implants* 1988; 3: 21-24.

Cheng P, Li D, Boruvka L, Rotenberg Y, Neumann A.W. Automatic for axisymmetric drop shape analysis for measurements of interfacial tensions and contact angles. *Colloids Surfaces* 1990; 43: 151-167.

Cheng P, Neumann A.W. Computational evaluation of axisymmetric drop shape analysis-profile (ADSA-P). *Colloids Surfaces* 1992;62:297-305.

Chehroudi B, Ratkay J, Brunette D.M. The role of implant surface geometry on mineralization in vitro and in vivo: a transmission and electronmicroscopic study. *Cells Mater* 1992;2:89-104.

Chiquet-Ehrismann R. Inhibition of cell adhesion by anti-adhesive molecules. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:715-9.

Civitelli R. Cell-cell communication in bone. *Calcif Tissue Int* 1995;56:S29-31.

Clarke E.G.C, Hickman J: An investigation into the correlation between the electric potential of metals and their behavior in biological fluids. *J Bone Jt Surg* 35B(3): 467-473, 1953.

Clokic C.M.L, Warshawsky H. Morphologic and radioautographic studies of bone formation in relation to titanium implants using rat tibia as a model. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1995;10:155-65.

Cochran D.L. A comparison of endosseous dental implant surfaces. *J Periodontol.* 1999;70:1523-39.

Cochran D.L, Schenk R.K, Lussi A, Higginbottom F.L, Buser D. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: A histomorphometric study in the canine mandible. *J Biomed Mater Res* 1998; 40: 1-11.

Cochran D.L, Nummikosky P.V, Higginbottom F.L, Hermann J.S, Makins S.R, 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.* 1996;7(3):240-252.

Cooper L.F, Masuda T, Whitson S.W, Yliheikkila P, Felton D.A. Formation of mineralizing osteoblast cultures on machined, titanium oxide grit-blasted, and plasma-sprayed titanium surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14: 37-47.

Craig SW, Johnson RP. Assembly of focal adhesions: progress, paradigms, and portents. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:74-85.

Damsky C.H. Extracellular matrix-integrin interactions in osteoblast function and tissue remodeling. *Bone.* 1999;25(1):95-96.

Darvell BW, Samman N, Luk WK, Clark RK, Tideman H. Contamination of titanium castings by aluminium oxide blasting. *J Dent* 23 1995;23:319-322.

Davies J.E. In vitro modeling of the bone/implant interface. *Anat. Rec.* 1996;245:426-445.

Davies J.E. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont.* 1998;11:391-401.

Davies J.E, Chernecky R, Lowenberg B, Shiga A. Deposition and resorption of calcified matrix in vitro by rat bone marrow cells. *Cells Mater* 1991,1:3-15.

Decker E.L, Frank B, Suo Y, Garoff S. Physics of contact angle measurement. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects* 156, 177-189 (1999).

Degasne I, Basle M.F, Demais V, Hure G, Lesourd M, Grolleau B, et al. Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces. *Calcif Tissue Int* 1999;64:499-507.

De Gennes P.G. Wetting:statics and dynamics. *Review of modern physics* Vol 57, N 3, 827-863 (1985).

De Santis D, Guerrero C, Nocini PF, Ungersbock A, Richards G, Gotte, P & Amato U. Adult human cells from jaw bones cultured on plasma-sprayed or polished surfaces of titanium or hydroxyapatite discs. *Journal of Materials Science and Materials Medicine* 1996; 7: 21-26.

Drake S. Cause, experiment and science: A galilean dialogue incorporating a new translation of Galileo's bodies that stay a top water. Chicago, EE.UU.: University of Chicago Press, 1981.

Drelich J. Static contact angles for liquids at heterogenous rigid solid surfaces. *Polish Journal of chemistry* 71, 525-549 (1997).

Ducheyne P, Qiu Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* 1999;20:2287-2303.

Duncan-Hewitt W.C, Policova Z, Cheng P, Vargha-Butler E.L, Neumann A.W. Semiautomatic measurement of contact angle on cell layers by a modified axisymmetric drop shape analysis. *Colloids Surfaces* 1989;42:391-403.

Edwards J.T, Brunski J.B, Higuchi H.W. Mechanical and morphologic investigation of the tensile strength of a bone-hydroxyapatite interface. *J Biomed Mater Res* 1997;36:454-68.

Ellingsen J.E. A study on the mechanism of protein adsorption to TiO<sub>2</sub>. *Biomaterials* 1990;593-596.

Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II) Etio-pathogenesis. *Eur J Oral Sci* 1998;106:721-764.

Franchi M, Bacchelli B, Martini D, De Pasquale V, Orsini E, Ottani V, Fini M, Giavaresi G, Giardino R, Ruggeri A. Early detachment of titanium particles from

various different surfaces of endosseous dental implants. *Biomaterials* 2004;25:2239-2246.

Ganss B, Kim R.H, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10:78-98.

Goffresen K, Berglundh T, Lindhe J. Anchorage of titanium implants with different surface characteristics: An experimental study in rabbits. *Clin Implant Dent Relat Res* 2000;2:120-128.

Good R.J. Contact angle, wetting, and adhesion: a critical review. En: Good R.J. Contact angle, wettability and adhesion. Utrecht, Bélgica: VSP BV, 1993: 3-36.

Gorski JP. Is all bone the same? Distinctive distributions and properties of non-collagenous matrix proteins in lamellar vs. woven bone imply the existence of different underlying osteogenic mechanisms. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9:201-23.

Gronowicz G, Mc Carthy M.B. Response of human osteoblasts to implant materials: integrin-mediated adhesion. *J Orthop Res*. 1996;14(6):878-887.

Hall J, Lausmaa J. Properties of a new porous oxide surface on titanium implants. *Appl Osseointegration Res* 2001;1:5-8.

Hansson S. Surface roughness parameters as predictors of anchorage strength in bone: a critical analysis. *J Biomech* 2000; 33: 1297-1303.

Hench L.L. Bioactive materials: the potential for tissue regeneration. *J Biomed Mater Res*. 1998;41(4):511-518.

Hatano K, Inoue H, Kojo T, Matsunaga T, Tsujisawa T, Uchiyama C & Uchida Y. Effect of surface roughness on proliferation and alkaline phosphatase expression of rat calvarial cells cultured on polystyrene. *Bone* 1999; 25: 439-445.

Holgado Terriza JA. Analisis digital de interfases curvas. Memoria de licenciatura. Granada: Universidad de Granada, 1996.

Ibnabddjalil M, Loh I.H, Chu C.C, Blumenthal N, Alexander H., Turner D. Effect of surface plasma treatment on the chemical, physical, morphological, and mechanical properties of totally absorbable bone internal fixation devices. *J Biomed Mater Res*. 1994;28(3):289-301.

Johansson C.B, Han C.H, Wennenberg A, Albrektsson T. A quantitative comparison of machined commercially pure titanium and titanium-aluminum-vanadium implants in rabbit bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998; 13: 315-321.

Jones FH. Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials. *Surf Sci Reports* 2001;42:75-205.

Keller J.C, Draughn R.A, Wightmann J.P, Dougherty W.J, Meletiou S.D. Characterization of sterilized CP titanium implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1990; 5: 360-367.

Kieswetter K, Schwartz Z, Dean DD, Boyan B.D. The role of implant surface characteristics in the healing of bone. *Rev Oral Biol Med* 1996; 7: 329-345.

Kilpadi D.V, Lemons J.E. Surface energy characterization of unalloyed titanium implants. *J Biomed Mater Res* 1994;28(12):1419-1425.

Kohles S.S, Clark M.B, Brown C.A, Kenealy J.N. Direct assessment of profilometric roughness variability from typical implant surface types. *Int J Oral Maxillofacial Implants* 2004;19:510-516.

Keller J.C, Stanford CM, Wrightman J.P, Draughn R.A, Zaharias R. Characterization of titanium implant surface. *J Biomed Material surface* 1994; 28(8): 939-946.

Larsson C. The interface between bone and implants with different surface oxide properties. *Appl Osseointegr Res* 2000;1:9-14.

Linder L, Obrant K, Boivin G. Osseointegration of metallic implants II. Transmission electron microscopy in the rabbit. *Acta Orthop Scand* 1989;60:135-9.

London R.M, Roberts F.A, Baker D.A, Rohrer M.D, O'Neal R.B. Histologic comparison of a thermal dual-etched implant surface to machined, TPS, and HA surfaces: bone contact in vivo in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17:369-376.

Linkow L.I. *Implant Dentistry Today: A multidisciplinary Approach*. Vol. 1, Piccin, Padova, 1990. pp. 1-80.

Michaels C.M, Keller J.C, Stanford C.M, Solursh M. In vitro cell attachment of osteoblast-like cells to titanium. *J Dent Res* 1989;68:276.

Murray D.W, Rae T, Rushton N. The influence of the surface energy and roughness of implants on bone resorption. *J Bone Joint Surg (BR)* 1989; 71: 632-637.

Neumann A.W. y Spelt J.K. *Applied surface thermodynamics*. Marcel Dekker Inc. (1996).

Miller C. y Neogi P. *Interfacial phenomena equilibrium and dynamic effects*. Surfactant science series. Vol. 17, pag. 54-90. Marcel-Dekker Inc. (1985).

Johnson R.E, Dettre R.H. Wettability and contact angles. *Surface and colloid science I*, 85-151 (1969).

Schwartz L, Garoff S. Contact angle hysteresis and the shape of the three-phase line. *Journal of colloid and interface science* 2, 422-437 (1985).

De Coninck. Contact angle for a sessile drop: a statistical mechanical approach. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects* 89, 109-115 (1994).



Lincks J, Boyan B.D, Blanchard C.R, Lohmann C.H, Liu Y, Cochran D.L, Dean D.D, Schwartz Z. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials* 1998;19:2219-32.

Marmur A. Contact angle hysteresis on heterogeneous smooth surfaces. *Journal of colloid and interface science* 168, 40-46 (1994).

Mosser A, Speisser C, Muster D. Surface physics method for biomaterials characterisation. *Biomaterials: Hard tissue repair and replacement*. Amsterdam: Elsevier science publishing, 1992;143.

Mueller W, Gross U, Fritz T, Voigt C, Fischer P, Berger G, Rogaschewski S, Lange K. Evaluation of the interface between bone and titanium surfaces being blasted by aluminium oxide or bioceramic particles. *Clin Oral Impl Res* 2003;14:349-356.

Neumann A.W, Spent J.K. *Applied surface thermodynamics*. Marcel Dekker Inc. (1996).

Collet P, De Coninck J, Dunlop E, Regnant A. Dynamics of the contact line: Contact angle hysteresis. *Physical review letters* Vol 79, 10, 3704-3707 (1997).

Neumann A.W. and Good R.J. Techniques of measuring contact angles. *Surface and colloid science* 11, 31-91. (1979).

Noordmans J, Busscher H.J. The influence of droplet volume and contact angle on liquid surface tension measurements by axisymmetric drop shape analysis-profile (ADSA-P). *Colloids and surfaces* 58, 239-243 (1991).

Miller R, Joos P, Fainerman B. Dynamic surface and interfacial tension of surfactant and polymer solutions. *Advances in colloid and interface science* 49, 249-302 (1994).

Nahringbauer I. Dynamic surface tension of aqueous polymer solution, I: Ethyl(hydroxyethyl)cellulose (Bermocoll cst- 103). *Journal of colloid and interphase science* 176, 318-328 (1995).

Oshida Y, Sachdeva R, Miyazaki S, Daly J. Effects of shotpeening on surface contact angles of biomaterials. *J Mater Sci* 1993;4:443-447.

Sykaras N et al. Implant materials, designs and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *Int J Oral Maxillofac. Implants* 15;5:675-690 (2000).

Einhorn T.A, Majesca R.J, Bosch C.G, Rush E.B, Horowitz M.C. The production of cytokines by fractures. Paper presented at: ORS 37<sup>th</sup> annual meeting; 1991; Anaheim, Calif.

Thomsen P, Erikson L.E. Inflammatory cell response to bone implante surfaces. In: Davies J.E, ed. *The bone biomaterial interface*. Toronto, Ontario: University de Toronto Press; 1991: 153-164.

Arnold F, West D.C. Angiogenesis inwound healing. *Pharmacol Ther.* 1991;52:407-422.

Einhorn TA. Enhancement of fracture healing. *J Bone Joint Surg Am.* 1995;77:940-956.

Harris A.K, Wild P, Stopak D. Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science.* 1980;208:177-179.

Harris A.K, Stopak D, Wild P. Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature.* 1981;290:249-251.

Wennenberg A, Hallgren C, Johansson C, Danellis S. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clin Oral Implants Research* 1998;99:11-19.

Wennenberg A, Albrektsson T, Andersson B. Bone tissue response to commercially pure titanium implants blasted with fine and coarse particles aluminum oxide. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996; 11: 38-45.

Wennenberg A, Albrektsson T, Andersson B. Bone Tissue response to commercially pure titanium implants blasted with fine and coarse particles of aluminium oxide. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996; 11: 38-45.

Klokkevold P.R, Nishimura R.D, Adachi M, Caputo A. Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. *Clin Oral Implant Res.* 1997;8:442-447.

Davies J.E. Mechanisms of endosseus integration. *Int J Prosthodont.* 1998;11:391-401.

Standard Specification for Unalloyed Titanium for Surgical Implant Applications (2002).

Shen X, Roberts E, Peel S.A.F, et al. Organic extracellular matrix components at the bone cell/substratum interface. *Cells Mater.* 1993;3:257-272.

Strafford H.J, Roberts M.T, Oni O.O.A, Hay J, Gregg P. Localization of bone-forming cells during fracture healing by osteocalcin immunocytochemistry: an experimental study of the rabbit tibia. *J Orthop Res.* 1994;12:29-39.

Grzesik W.J, Robey P.G. Bone matrix RGD glycoproteins: immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro. *J Bone Miner Res* 1994;9:487-496.

Gronthos S, Stewart K, Graves S.E, Hay S, Simmons P.J. Integrin expression and function on human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 1997;12:1189-1197.

Puleo D.A, Bizios R. RGDS tetrapeptide binds to osteoclasts and inhibits fibronectin-mediated adhesion. *Bone* 1991;12:271-6.

Hosaka N, Nagata T. Evaluation of a new dense porous hydroxyapatite endosteal dental implant. *J Oral Maxillofac Surg* 1987;45:583-593.

Hughes DE, Salter DM, Dedhar S, Simpson R. Integrin expression in human bone. *J Bone Miner Res* 1993;8:527-33.

Yamada KM, Geiger B. Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:76-85.

Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:619-27.

Yamada KM, Geiger B. Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:76-85.

McKee M.D, Nanci A. Ultrastructural, cytochemical and immunocytochemical studies on bone at its interfaces. *Cells Mater.* 1993;3:219-243.

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* 1993;27:1103-13.

Lampin M, Warocquier-Clerout R, Legris C, Degrange M, Sigot-Luizard MF. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. *J Biomed Mater Res* 1997;36(1):99-108.

Lautenschlager E.P, Monaghan P. Titanium and titanium alloys as dental materials. *Int Dent J* 1993;43:245-253.

Norde W. Driving forces for protein adsorption at solid surfaces *Macromol Symp* 1996;103:5-18.

Hlady V, Buijs J. Protein adsorption on solid surfaces. *Curr Opin Biotechnol* 1996;7:72-77.

Lausmaa J, Kasemo B, Rolander U, Bjursten LM, Ericson LE, Rosander L, Thomsen P. Preparation, surface spectroscopic and electron microscopic characterization of titanium implant materials. In: Ratner BD, editor. *Surface characterization of biomaterials*. Amsterdam: Elsevier, 1988. p. 161-74.

Lim Y.J, Oshida Y, Andres C.J, Barco M.T. Surface characterizations of variously treated titanium materials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16:333-342.

Linder L. High-resolution microscopy of the implant-tissue interface. *Acta Orthop Scand* 1985;56:269-72.

Mekayarajjananonth T, Winkler S. Contact angle measurement of dental implant biomaterials. *J Dent Res* 1999;78:330.

Mish C.E. (ed.). *Implantología contemporánea*. Mosby/Doyma Libros, Madrid (1995).

Nanci A, McKee M.D, Zalzal S, Sakkal S. Ultrastructural and immunocytochemical analysis of the tissue response to metal implants in the rat tibia. In: Davidovitch Z, Mah J, editors.

*Biological mechanisms of tooth eruption, resorption and replacement by implants*. Boston: Harvard Society for the advancement of orthodontics, 1998. p. 487-500.

Okabe T, Hero H. The use of titanium in dentistry. *Cells and materials* 5(2): 211-230, 1995.

Pilliar R.M. Overview of surface variability of metallic endosseous dental implants: textures and porous surface structured designs. *Implant Dent* 1998;7(4):305-314.

Predecki P, Auslaender BA, Stephan JE, Mooney VL, Stanitski C. Attachment of bone to threaded implants by ingrowth and mechanical interlocking. *J Biomed Mater Res* 1972;6:401-412.

Rich A, Harris AK. Anomalous preferences of cultured macrophages for hydrophobic and roughened substrata. *J Cell. Sci* 1981; 50: 1-7.

Ronold H.J, Lyngstadaas S.P, Ellingsen J.E. A study of the effect of dual blasting with  $TiO_2$  on titanium implant surfaces on functional attachment. *J Biomed Mater Res* 2003;67A:524-530.

Shakenraad J.M, Busscher H.J, Windevuur C.R, Arends J. The influence of substratum surface free energy on growth and spreading of human fibroblasts in the presence and absence of serum proteins. *J Biomed Mater Res* 1986;20(6):773-784.

Schroeder A, Pohler O, Sutter F. Gewebereaktion auf ein Titan-hohlzylinderimplantat mit titan-spritzschichtoberfläche. *Schweizer Monatsschrift für Zahnheilkunde* 1976;86:713-727.

Schwartz Z, Braun G, Kohavi D et al. Effects of hydroxyapatite implants on primary mineralization during rat tibial healing: biochemical and morphometric analyses. *J Biomed Mater Res*. 1993;27(8):1029-1038.

Shelton RM, Rasmussen AC, Davies JE. Protein adsorption at the interface between charged polymer substrata and migrating osteoblasts. *Biomaterials* 1998;9:24-9.

Sundgren J.E, Bodo P, Lundstrom I, Berggren A, Hellem S. Auger electron spectroscopic studies of stainless-steel implants. *J Biomed Mater Res* 1985;19:663-71.

Stanford C.M, Keller J.C, Solursh M. Bone cell expression on titanium surfaces is altered by sterilization treatments. *J Dent Res* 1994;73:1061-71.

Steflik D.E, Corpe R.S, Lake F.T, et al. Ultrastructural analyses of the attachment (bonding) zone between bone and implanted biomaterials. *J Biomed Mater Res*. 1998;39:611-620.

Suba C, Velich N, Turi C, Szabó G. Surface analysis methods of biomaterials used in oral surgery: literature review. *J Craniofac Surg* 2005;16(1):31-36.

Sul Y, Johansson C, Wennerberg A, Cho L, Chang B, Arbrektsson T. Optimum surface properties of oxidized implants for reinforcement of osseointegration: surface chemistry, oxide thickness, porosity, roughness, and crystal structure. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:349-359.

Thomas CH, McFarland CD, Jenkins ML, Reznia A, Steele JG, Healy KE. The role of vitronectin in the attachment and spatial distribution of bone-derived cells on materials with patterned surface chemistry. *J Biomed Mater Res* 1997;37:81-93.

Textor M, Sitting C, Frauchiger V, Tosatti S, Brunette D.M. Properties and biological significance of natural oxide films on titanium and its alloys. In: *Titanium in medicine*. Brunette D.M, Tengvall P, Textor M, Thomsen P, editors. Berlin: Springer, pp. 171-230.

Tejera R. Trabajo de investigación: Caracterización interfacial de superficies reales. Ángulo de contacto dinámico o fenomenológico? Universidad de Granada 2004.

Testori T, Wiseman L, Woolfe S, Porter S.S. A prospective multicenter clinical study of the Osseotite implant: four year interim report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001; 16:193-200.

Thomas K.A, Kay J.F, Cook S.D, Jarcho M. The effect of surface macrotexture and hydroxylapatite coating on the mechanical strengths and histologic profiles of titanium implant materials. *J Biomed Mater Res* 1987;21(12):1395-1414.

Von Ebner V. Über den feineren Bau der Knochensubstanz. *S.B. Akad Wiss Math Nat Kl Abt III*. 1875;72:49-138.

Brighton C.T, Hunt R.M. Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg Am*. 1991;73:832-847.

Wennenberg A, Hallgren C, Johansson C, Danellis S. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. Clin Oral Implants Research 1998;99:11-19.

Wennenberg A, Albrektsson T, Andersson B. Bone tissue response to commercially pure titanium implants blasted with fine and coarse particles aluminum oxide. Int J Oral Maxillofac Implants 1996; 11: 38-45.

Wennenberg A, Albrektsson T, Andersson B. Bone Tissue response to commercially pure titanium implants blasted with fine and coarse particles of aluminium oxide. Int J Oral Maxillofac Implants 1996; 11: 38-45.

Wennenberg A, Albrektsson T, Andersson B, Kroll J.J. A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. Clin Oral Implants Res 1995;6:24-30.

Wenneberg A, Albrektsson T, Andersson B. An animal study of C.P. titanium screws with different surface topographies. J Mater Science: Mater Med 1995;6:302-309.

Wennenberg A, Albrektsson T, Andersson B. Bone Tissue response to commercially pure titanium implants blasted with fine and coarse particles of aluminium oxide. Int J Oral Maxillofac Implants 1996; 11: 38-45.

Wennenberg A, Albrektsson T, Lausmaa J. Torque and histomorphometric evaluation of c.p. titanium screws blasted with 25- and 75 µm-sized particles of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. J Biomed Mater Res 1996;30:251-260.

Wennenberg A, Ide-Ektessabi A, Hatkamata S, Sawase T, Johansson C, Albrektsson T, Martinelli A, Sodervall Ulf, Odelius H. Titanium release from implants prepared with different surface roughness. Clin Oral Impl Res 2004;15:505-512.

Wennenberg A, Hallgren C, Johansson C, Danellis S. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. Clin Oral Implants Research 1998;99:11-19.



Wennenberg A, Albrektsson T, Andersson B. Bone tissue response to commercially pure titanium implants blasted with fine and coarse particles aluminum oxide. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996; 11: 38-45.

Wennenberg A, Albrektsson T, Andersson B. Bone Tissue response to commercially pure titanium implants blasted with fine and coarse particles of aluminium oxide. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996; 11: 38-45.

Wenzel R.N. Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Ind Eng Chem* 1936;28(8):988-994.

Wilke H.J, Claes L, & Steineman S. The influence of various titanium surfaces on the interface shear strength between implants and bone. *Clinical Implant Materials: Advances in Biomaterials* 9: 309-314.

Winet H, Bao J.Y, Moffat R. Neo-osteogenesis of haversian trabeculae through a bone chamber implanted in a rabbit tibial cortex: a control model. *Calcif Tissue Int.* 1990;47:24-34.

Winet H, Albrektsson T. Wound healing in the bone chamber: I, neoosteogenesis during transition from the repair to the regenerative phase in the rabbit tibial cortex. *J Orthop Res.* 1988;6:531-539.

Weischer T, Schettler D, Mohr C. Titanium implants in the zygoma as retaining elements after hemimaxillectomy. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997;12:211-214.

Williams DF (ed.). *Definitions in biomaterials: Proceeding of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials*, Chester. *Progress in Biomedical Engineering*. Elsevier, Amsterdam (1987).

Wu CY, Fields AJ, Kapteijn BAE, McDonald JA. The role of a4b1 integrin in cell motility and "bronectin matrix assembly. *J Cell Sci* 1995;108:821-9.

Vezeau PJ, Koorbusch GF, Draughn RA, Keller JC. Effects of multiple sterilization on surface characteristics and in vitro biologic responses to titanium.

J Oral Maxillofac Surg 1996;54:738-46.

Venturelli A. A modified surgical protocol for placing implants in the maxillary tuberosity: clinical results at 36 months after loading with fixed partial dentures. Int J Oral Maxillofac Implants 1996;11:743-779.

Vogler EA. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. Adv Colloid Interf Sci 1998;74:69-117.

Yao K.L, Todescan R, Sodek J. Temporal changes in matrix protein synthesis and mRNA expression during mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in culture. J Bone Miner Res. 1994;9:231-240.

Yukna R.A, Callan D.P, Krauser J.T, et al. Multi-center clinical evaluation of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell binding peptide (P-15) as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects. 6-month results. J Periodontol. 1998;69(6):655-663.

Zarb G, Albrektsson T. Osseointegration- a requiem for the periodontal ligament? – An editorial. Int J Periodont Rest Dentistry 1991;11:88-91.

Zigmond S.H. Signal transduction and actin filament organization. Curr Opin Cell Biol 1996;8:66-73.

Zhu X, Chen J, Scheideler L, Reichl R, Geis-Gerstorfer J. Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses. Biomaterials 25;2004:4087-4103.