

Efecto del tiempo de grabado del titanio en su topografía, química, humectabilidad y adhesión celular.

**Tesis doctoral
Ramez Zahran**

El doctorando Ramez Zahran y los directores de la tesis:

Juan Ignacio Rosales Leal y Miguel Cabrerizo Vílchez

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 21/12/2016

Director/es de la Tesis



Fdo.: Juan Ignacio Rosales Leal



Fdo.: Miguel Cabrerizo Vílchez

Doctorando



Fdo.: Ramez Zahran

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Ramez Zahran
ISBN: 978-84-9163-172-9
URI: <http://hdl.handle.net/10481/45901>

I.Introducción	6
I.1. Osteointegración	7
I.1.1. Fisiología de la osteointegración	8
I.1.2. Osteogenesis peri-implante	9
I.1.3. La remodelacion osea peri-implante	10
I.1.4. Requisitos de osteointegracion	10
I.1.5. Formas de aumentar la osteointegración	11
I.1.6. Factores sistémicos condicionantes en la osteointegración	12
I.1.7. Factores locales condicionantes en la osteointegración	13
I.2. El material del implante	14
I.2.1.Requisitos	14
I.2.2. Clasificación de los materiales	14
I.2.3. El titanio	15
I.2.4. Diseño macroscópico, microscópico y nanoscópico	18
I.3. Tratamientos de superficie	20
I.3.1. Tratamientos mecánicos	20
I.3.2. Tratamientos químicos	21
I.3.3. Descarga luminica	22

I.3.4. Metodos de recubrimiento	22
I.4. Caracterización de superficies	22
I.4.1. Topografía	23
I.4.1. A. Rugosidad	23
I.4.1.B. Morfología	34
I.4.1.C. Dimensión fractal	35
1.4.2. Química de superficie	35
I.4.3. Humectabilidad	36
I.4.4. Adhesión, diferenciación y proliferación celular	39
I.5. Cultivo celular	39
I.5.1. Proteínas relacionadas con la adhesión celular	39
I.5.2. Proteínas del citoesqueleto	41
I.5.3. Moléculas de adhesión	41
I.5.4. Influencia del material sobre la adhesión celular	43
II. Justificación y objetivo	45
II.1. Justificación del trabajo	45
II.2. Objetivos.	45
III. Materiales y métodos	46
III.1. Materiales utilizados.	46
III. 2. Preparación de los especímenes	47

III.3. Rugosidad y dimension fractal	50
III.4. Morfología	51
III.4.1. Morfología con el microscopio confocal	52
III.4.2. Morfología con microscopio electrónico de barrido (MEB)	54
III.5. Química de la superficie	56
III.6. Medida del ángulo de contacto θ	59
III.6.1. Ángulo de contacto de avance	62
III.6.2. Ángulo de contacto de retroceso de la burbuja cautiva	63
III.7. La disolucion del Ti	65
III.8. Respuesta celular	65
III.8.1. El cultivo celular	66
III.8.2. Morfología celular	66
IV. Resultados	68
IV.1. Disolucion del Ti	68
IV.2. Topografía	68
IV.2. 1. Rugosidad	68
IV.2.2. Morfologia	79
<ul style="list-style-type: none"> • Morfología con la microscopio confocal de luz blanca 	79
<ul style="list-style-type: none"> • Morfología con microscopio electrónico de barrido (MEB) 	89
IV.2.3. Dimensión fractal y factor Wenzel	92

IV.3. Química de la superficie	94
IV.4. Humectabilidad.	94
IV.5. El cultivo celular	96
IV.6. Morfología celular	96
V. Discusion	98
VI. Conclusiones	108
Referencias	109

I. Introducción

El tratamiento implantológico logra una alta tasa de éxito en la clínica dental (> 90%) (Misch CE et al, 2008). Pero hay casos clínicos (carga inmediata, implante post extracción, elevación de seno, enfermedades generales, la mala calidad del hueso, o osteoporosis) que necesitan una osteointegración rápida para evitar el fracaso del tratamiento (Naujokat H et al, 2016).

Topografía superficial y mojabilidad de titanio juegan un papel importante en la formación inicial del hueso. La rugosidad de la superficie del implante se ha demostrado que influye en la calidad y la velocidad de osteointegración, que puede explicarse por el área de contacto mayor entre el hueso y los implantes, su efecto sobre las propiedades humectantes o el aumento de la capacidad de retener el coágulo de sangre inicial (Wennerbert et al, 1996; Abrahamsson et al, 2004; Hotchkiss KM et al, 2016). Las investigaciones in vitro a nivel celular y molecular y la interpretación histológica de las tesis eventos sugieren que las propiedades de superficie del implante influyen en la formación de hueso interfacial mediante la modulación del fenotipo de células adherentes (Guo et al, 2007).

Varios tratamientos se desarrollaron para lograr una osteointegración más rápida tales como mecánicos, químicos o ambos. El tratamiento ácido es uno de los más utilizados porque produce una superficie compleja irregular que mejora la adhesión y la proliferación celular. Ataque ácido se produce por ácidos fuertes como el ácido clorhídrico, ácido sulfúrico H_2SO_4 o ácido fluorhídrico HF.

El titanio tratado utilizando HF deja una superficie que mejora la adhesión celular osteoinductora, la expresión de ARNm específica del hueso (Guo et al, 2007) y mejorar la diferenciación osteoblástica por el aumento de la expresión de genes osteoblásticas (Cooper et al, 2006, Lawande et al, 2016). En otro estudio se encontró que el tipo de extracción, la osteocalcina, y collage I expresión de genes fueron más altos en los implantes de fluoruro (Monjo et al, 2008). Las ventajas del tratamiento con HF se basan en dos temas: las modificaciones topográficas y la posibilidad de flúor incorporan dentro del TiO_2 . Se demostró la incorporación de fluor en la película de óxido sólo a pH bajo (Guo et al, 2007; He et al 2010). Al contrario, la incorporación de flúor en la película de óxido no se determinó en otros estudios (Nakagawa et al, 2001; Rodríguez Rius et al, 2005; Korotin et al, 2012).

Sin embargo, varios aspectos están aún sin resolver. Es importante conocer el efecto de la cinética de grabado ácido sobre el comportamiento de las células con el fin de proponer un tiempo de ataque químico óptimo para asegurar la máxima adhesión

célular. Hay unas pocas obras en la literatura dedicada a determinar el efecto del tiempo de grabado de superficies de titanio sobre la topografía y la osteointegración.

Lamolle et al. (2009b) encontraron que los implantes de Ti inmersos en una solución de HF débil (0,2% v / v) revelaron cambios superficiales específicas dependientes del tiempo correlacionados mejorando la biocompatibilidad. En este estudio, se evaluaron la topografía, la química, la humectabilidad y la biocompatibilidad. La topografía de la superficie se controló hasta 150s. Detectaron un aumento de rugosidad de 90s a 120s y un aumento más notable de 120s hasta 150s. No se han publicado datos para tiempos superiores a 150s. Además, no se estudiaron los efectos de los largos tiempos de grabado en la adhesión celular. En consecuencia, el tiempo de grabado óptimo para lograr la adhesión celular más alta es desconocido.

La hidrofobicidad de una superficie biomaterial es conocida por ser un factor importante para mitigar el contacto celular. Las superficies hidrófilas suelen ser necesarios para mejorar la adhesión celular. La medida de ángulo de contacto permite cuantificar la humectabilidad de una superficie sólida. Hay varios métodos para cuantificar ángulo de contacto a pesar de la formación de una sola gota sésil sobre el sustrato diana es ampliamente utilizado. Sin embargo, el ángulo de contacto de gotas estáticamente estables depositados con una micropipeta de mano proporciona información solo de los dominios de baja energía de la superficie debido a que el ángulo observado está más cerca del ángulo de contacto de avance [de Gennes P. G. 1985]. En lugar de ello, el ángulo de contacto de retroceso está relacionada con los dominios de alta energía de superficies tales como óxidos metálicos. La medición de avance y retroceso ángulos de contacto se lleva a cabo con métodos dinámicos basados en el movimiento impulsado de meniscos o gotas [Sorokin DV, et al. 2011]. El grado de hidrofiliidad de una superficie de biomaterial debe cuantificarse significativamente con retroceso de los ángulos de contacto en lugar de con ángulos de contacto utilizando gotas estáticas.

El objetivo de este estudio fue investigar aún más el efecto del tiempo de grabado de HF en la topografía de Ti, química de la superficie, la humectabilidad y la adhesión celular. Esto nos permitirá diseñar el mejor tratamiento ácido para mejorar la adhesión celular.

I.1. Osteointegración

Se puede definir la osteointegración como la unión directa entre el hueso vivo y la superficie del implante dental cargado funcionalmente (Branemark, 1985). Mientras no hay carga protética no existe una verdadera “integración”, sino simplemente una osteogénesis periimplantaria. se puede considera este fenómeno biológico entre los

descubrimientos más importante del tratamiento odontológico en el siglo pasado. Dicha unión es tan fuerte que si quisiéramos posteriormente separar el titanio del hueso sería imposible, tan sólo podríamos extraer el implante extrayendo al mismo tiempo el hueso que lo rodea.

I.1.1. Fisiología de osteointegración

La integración ósea del implante se basa en el proceso de formación de hueso por autoinducción, descrito por Urist (1965), que injertó matriz ósea desvitalizada y descalcificada en 300 animales. Los histiocitos (La célula inductora es un histiocito móvil; la célula inducida es un histiocito fijo), 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 sangre es el primer medio biológico que se contacta con el implante, esta acción empieza con la formación del coágulo para llevar el oxígeno a la zona, las plaquetas sufren unas modificaciones morfológicas y bioquímicas como respuesta a la superficie del implante, estos cambios tienen mucha importancia en el fenómeno de osteointegración; es que desde su activación y su degranulación liberados unos factores de crecimiento como el factor conductor de crecimiento (PDGF) y el factor beta de transformación del crecimiento (TGF- β), junto a otros factores vasculares como la histamina y la serotonina; estos factores juegan gran papel en la migración y la proliferación de varias células (Deuel et al, 1982; Gruber et al, 2002). Los factores de crecimiento (PDGF, TGF- β) son mitogénicos y quimotácticos de los fibroblastos, y osteogénicos (Seppa et al, 1982; Lucas et al, 1988; Pfeilschifter et al, 1990; Lind et al, 1998). Así los osteogénicos se transforman en osteoblastos y se pegan a la superficie del implante utilizando las fibras del coágulo desde el primer día y empieza producir el hueso creando una matriz pobre mineralizada y a continuación forma una capa de 0.5 mm rica en calcio, fósforo (Meyer et al 2004; Murai et al, 1996), los osteoblastos que se quedan dentro de este nuevo hueso serán osteocitos que se extienden a 100-500 μm . (Rigo et al, 2004; Fini et al, 2004; Soballe et al, 1993).

Pero las plaquetas no son el primer factor activo en este fenómeno sino la integrina pegada a la superficie adsorbiendo fibrinógeno (Broberg et al, 2002). Aquí se demuestra la importancia de la topografía de la superficie del implante, una superficie con mayor microtopografía ofrece mayor área y mayor adsorción de fibrinógeno lo que explica el

aumento de las plaquetas adheridas a la superficie (Park et al, 2000).

I.1.2. Osteogenesis peri-implante

La población celular osteogénica migra a través del andamio temporal criado 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.

- La osteoconducción: en esta fase se migra de las osteogénicas (potenciales células) a la superficie del implante donde se va a situar la matriz.
- La formación de hueso de novo en el implante empieza por la potencia de la osteogénesis en contacto con el implante.
- La remodelación ósea: es la renovación del hueso mediante la destrucción por los osteoclastos de pequeñas unidades microscópicas de tejido, dispersas por el esqueleto.

Existen dos tipos de osteogénesis: osteogénesis a distancia y osteogénesis de contacto (Davies et al, 2003). En la primera, el tejido óseo se forma desde la superficie del hueso circundante. En la segunda, la formación de tejido óseo se produce desde la superficie del implante. Es decir, la formación de hueso en la región periprotésica tiene dos direcciones: desde la superficie del hueso circundante hacia el implante y desde la superficie del implante hacia el hueso circundante (Puleo et al, 1999).

Tabla.I.1. mecanismos de control óseo en la interfase hueso-implante	
Mecanismo	Descripción
Osteoinducción	células precursoras se transforman en células osteogénicas
Osteogénesis	células osteogénicas forman sitio de deposición de nuevo hueso
osteoconducción	se forma hueso sobre la superficie del implante

En el 1996 y por la primera vez se ha detectado capa con 20-50 mm de osteoblasteos, fibrillas de colefeno calcificada, y area mineralizada en la interface implante-hueso.(Murai et al, 1996).

Unos dias despues la implantacion, incluso los osteoblastos que estan en contacto con la superficie del implante empieza echando maatriz de colageno directamente encima la linea cemental formada tempranamente .(Murai et al, 1996).

Despues la la deposicion de la matriz calcificada empieza la disposicion de hueso ondeado y huso trabecular (Franchi et al, 2005) para llenar la interface implante- hueso en tres dimensiones, ofrece alta resistencia a la carga primaria del implante, su arquitectura ofrece un andamio biologico de la adhesion celular y la deposicion del hueso, esto es la fijacion biologica.

La formacion del hueso trabecular entre los dias 10-14 despues de la cirugia asegura los tejidos anchorages que corresponden a la fijacion biologica. (Franchi et al, 2005; Probst et al, 1997). A los tres meses de la cirugia se puede encontrar una mezcla de hueso ondeado y matriz lamellar alrededor de varios tipos de implantes (Rigo et al, 2004; Chappard et al, 1999).

I.1.3. La remodelacion osea peri-implante

El hueso que contacta la superficie del implante sufre remodelaciones morfologicas como la adaptacion a la carga mecanica. El volumen del hueso maduro en implantes osteointegrados se confirma con la presencia de un espacio contiene a osteoclastos, osteoblastos, celulas mesenquimales, y vasculares limfaticos en contacto con la superficie del implante. El hueso remodelado se puede extender hasta 1 mm desde la superficie del implante (Franchi et al, 2005; Chappard et al, 1999)

Los hueso cortical y trabecular tienen diferentes maneras de curarse por la forma evolucionada y la función exquisita de este tejido. El hueso cortical depende a la remodelación osteonal, mientras el trabecular combina los fenómenos de osteoconducción y la formación de hueso *de novo* fruto del contacto osteogénesis. De hecho, se puede decir que el hueso trabecular, caracterizado previamente como el hueso "de mala calidad", es mucho mejor que el cortical para conseguir la osteointegración (Davies et al, 2003).

I.1.4. Requisitos de osteointegración

Para lograr la osteointegración el material del implante tiene que ser

biocompatible (Williams D.F, 1987) que no libere productos corrosivos dando una reacción inflamatoria, en este caso se recomienda el Ti y las aleaciones biocompatible; la temperatura del hueso no debe superar los 47 grados durante un minuto porque la reparación ósea debe realizar con la menor necrosis ósea posible, aquí la experiencia del cirujano juega un papel importante; el diseño macroscópico del implante tiene que lograr una estabilidad inmediata en el hueso, y debe distribuir la carga funcional de una forma uniforme; la calidad del hueso receptor controla el contacto superficial a corto plazo, y la cantidad garantiza el tratamiento a largo plazo; siempre es recomendable tener una mucosa alrededor del cuello del implante para lograr sellar los tejidos periimplantario y higiene bucal fácil, además que la calidad de los tejidos blandos se considera de gran importancia para medir la estética de la restauración posterior; y lo último se recomienda que la carga funcional del implante tiene que ser dentro de una margen de 150µm (Ericsson et al, 2001).

I.1.5. Formas de aumentar la osteointegración

Existen muchas formas para incrementar el hueso alrededor del implante. Algunas, como la utilización de la hormona del crecimiento y el sistema adhesivo a la fibrina marcaron un gran éxito.

Un estudio se probó una inducción acelerada de la osteogénesis junto con proteínas precipitadas por etanol procedentes de polvo de hueso de rata desmineralizado. Se demostraron los análisis histológicos y bioquímicos una secuencia temporal de diferenciación condrogenica, 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 (Davies et al, 2003).

En la exclusión del epitelio y el tejido conjuntivo de la región de la herida consiste la regeneración tisular guiada (RTG), interponiendo una membrana no reabsorbibles o reabsorbible entre el colgajo y la superficie de la herida o la apófisis alveolar. Permitiendo 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 funciona le insertadas en el cemento radicular y hueso alveolar (Pontoriero et al, 1988).

Cuando se usa la RTG para reparar defectos óseos creados durante la inserción del implante se llama regeneración ósea guiada (ROG), esta técnica ha logrado muy buenos resultados para producir nuevo hueso en áreas edentulas con deficiente o irregular hueso alveolar previamente o durante la inserción del implante, es una rutina en la clínica dental.

Un estudio piloto para evaluar el modelo del minipig adulto en implantes endoóseos intraorales, y determinar los efectos del factor de crecimiento fibroblástico ácido (FGF-a, FGF-1) sobre la osteointegración (Gallo et al, 2001). Se encontró que el minipig es un modelo experimental válido para el estudio de los implantes dentales comercializados para uso en humanos y el FGF-1 ayuda en aumentar el porcentaje de osteointegración en las primeras fases (de 1-3 semanas).

I.1.6. Factores sistémicos condicionantes 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 precursora son osteoblastos, maduración de estos, formación de la matriz, y finalmente, mineralización.

En el proceso de osificación endocondral hay unos 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).

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.

Factores de crecimiento secretados localmente y hormonas sistémicas controlan los ciclos secuenciales de formación y resorción del hueso, como (BMP, PDGF, IGF-I, IGF-II, PTH, GH, GH)

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

(BMP) Las proteínas morfogenéticas del hueso son factores reguladores del crecimiento en la extensa familia TGF- β se ha demostrado en algunos estudios que intervienen en la diferenciación osteoblástica. (PDGF) El factor de crecimiento derivado de plaquetas 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 et al 1989).

Junto con estos factores hay una gran cantidad de hormonas sistémicas intervienen en la formación de hueso, como la PTH, $1,25(\text{OH})_2$, calcitonina, glucocorticoides, insulina, tiroxina, hormona del crecimiento (HGH) y esteroides gonadales (GH).

También no se puede negar el afecto de los factores sistémicos del paciente como el sexo, la edad, condiciones médicas, y los hábitos del paciente.

I.1.7. Factores locales condicionantes en la osteointegración

Las respuestas biológicas tras la implantación (contacto con la sangre, adsorción de proteínas y otras moléculas biológicas, adhesión celular, etc.) son debidas a la interacción entre el ambiente biológico y la superficie del material del implante.

Asimismo, las propiedades superficiales del implante determinan 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, dichas propiedades se controlan con una serie de medida.

Las modificaciones de las características superficiales físicas aumentan la habilidad de los materiales de soportar la formación de hueso (Cochran et al, 1998; Cochran et al, 1996), químicas (Ibnabddjalil et al, 1994; Hench et al, 1998), y biológicas (Yukna et al, 1998).

El motivo de cambiar las características superficiales es dirigir 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 por el efecto de su composición química, carga de superficie, y energía de superficie (Schwartz Z et al, 1993).

La ausencia de la osteointegración tras años de servicio causa la movilidad y después la caída del implante. Todavía no se sabe exactamente las causas del fracaso, pero en general, el fracaso se produce cuando el hueso receptor tiene baja densidad o poco volumen.

La calidad del hueso es determinante en implantología dental representando un indicador de fiabilidad para un buen tratamiento y inserción determinada (Leckholm, 2003). En la siguiente figura, las calidades de hueso 1 y 2 presentan mayor estabilidad y mayor anclaje tras la inserción del implante dental debido a la mayor densidad y menor porosidad del hueso cortical, (Gapski, 2003)

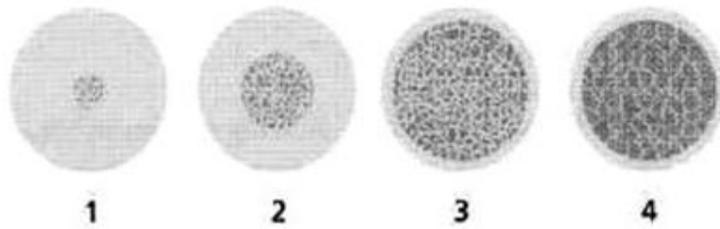


Fig.I.2. La calidad del hueso, tomada de (Leckholm, 2003).

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

I.2. El material del implante

I.2.1. Requisitos

El material utilizado en el implante dental debe ser un biomaterial (un material no vivo reutiliza en un aparato medico y interactuar con un sistema biológico) según (Williams D.F, 1987). Lo cual deberá ofrecer la biocompatibilidad, la resistencia mecánica, la resistencia a la degradación, la conformabilidad, la disponibilidad para asegurar buen comportamiento a corto y largo plazo. Entonces este biomaterial debe ser un biocompatible.

Se puede definir la biocomptabilidad es la respuesta adecuada que el biomaterial provoca en el tejido receptor (Williams D.F, 1987), esta respuesta puede tener diferente carácter. Se puede definir un material bioinerte como un material que ni es tóxico ni biológicamente activo; mientras que un material bioactivo es un material que no es tóxico pero sí es biológicamente activo (Williams D.F, 1987).

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

I.2.2. Clasificación de los materiales

Lemons (1990) dividió los materiales sintéticos para implantes dentales en tres tipos básicos; metales y aleaciones, ceramica y carbòn, y polimeros. Los materiales de

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

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

a) Metales y aleaciones metálicas, que representan el grupo más usado comercialmente, con el titanio y sus aleaciones titanio-aluminio-vanadio (Ti6Al4V) como el material más recomendado para la utilización en implantología.

b) Cerámicos, también con amplia aplicación;

c) Polímeros sintéticos, representados por los derivados de los compuestos de poliuretano, politetrafluoroetilenos, polimetilmetacrilatos; 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.

d) Materiales naturales.

I.2.3. El titanio

El Titanio se considera el material estrella para los implantes por sus propiedades físicas, químicas, biológicas y biomecánicas, es que es un metal biocompatible, donde los tejidos vivos toleran su presencia sin observar reacciones alérgicas del sistema inmunitario. Esta biocompatibilidad junto a sus propiedades mecánicas (dureza, ligereza y resistencia) le hicieron ideal para muchas aplicaciones médicas y odontológicas (implantes dentales, válvulas cardíacas, marcapasos, aros de anteojos, etc), con su autoridad de la (American Standard for Testing Materials – ASTM), da las especificaciones para el Titanio quirúrgico.

Por ser inerte, la formación de capa del óxido cuando se pone en contacto con tejidos vivos, no se liberan iones que causan reaccionar con los tejidos vivos, este óxido lo protege de la corrosión y favorecen la osteointegración. La superficie del titanio permite la adhesión ósea a través de un anclaje de anquilosis (osteointegración). Por lo cual se considera como bioactivo y es la mejor base para los implantes dentales funcionales.

I.2.3.A. Composición química

El elemento químico titanio con número atómico 22 en la tabla periódica de los elementos (figura 1.3). El titanio se considera como un metal puro con diferentes grados según la American Society for Testing and Materials (ASTM), las especificaciones F67 están relacionadas con el titanio comercialmente puro (c.p) (ASTM F67-00, 2002) las que determinan cuatro grados de Ti c.p. para la aplicación médica.

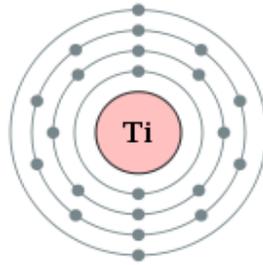


Fig.I.3. Electrones del titanio

Los distintos grados se clasifican en función de la composición química la aleación de Ti c.p. (Tabla 1.1). en función del aumento del grado (desde el I hasta el IV) aumenta la cantidad de elementos intersticiales, lo que aumenta la resistencia mecánica y disminuyen la ductilidad y la resistencia a la corrosión (Tabla 1.2).(Gil et al,1999)

Tabla 1.1 Lla composicion quimica de los grados del titanio						
Grado de Ti c.p	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

1.2.3.B. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánica del los cuatro grados del titanio según la norma ASTM F67-00 son muy buena para la industria de los implantes. Estas propiedades permiten el fresado químico, tiene buena resistencia a la tracción, y permite muchas formas en la fabricación de piezas.

Permite varias clases de tratamientos tanto termoquímicos como superficiales, además de que es soldable, y tiene buena memoria de forma. Las propiedades mecánicas de titanio se demuestran en la tabla I.2

Tabla I.2 Propiedades mecánicas requeridas, según norma ASTM F67-00, para los cuatro grados comerciales de titanio para aplicaciones biomédicas.				
Grado	Resistencia máxima de tracción (MPa)	Límite elástico al 0.2% (MPa)	Alargamiento (%)	Reducción área (%)
I	240	170	24	30
II	345	275	20	30
III	450	380	18	30
IV	550	483	15	25

1.2.3.C. Biocompatibilidad del Ti cp

El Ti c.p., es bioinerte por su alta resistencia a la corrosión y este factor provoca su alta biocompatibilidad y su capacidad de llevar a cabo su función de anclaje protésico, a largo plazo, de manera óptima, y conseguir la osteointegración.

La presencia de una capa de oxido químicamente estable (capa pasiva) evita la reactividad del Ti c.p. esta capa 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 para el oxido de titanio que es próxima a la del agua.

Es clave el tipo de interacción 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. Se resulta que la superficie de titanio no interactúa excesivamente con las proteínas de la matriz extracelular, pero interactúa con las cadenas externas de las moléculas proteicas. Después se relacionan los neutrófilos y los macrófagos con el implante, se interaccionan los macrófagos con la superficie y segregan un cierto tipo y número de citoquinas (mensajeros biológicos moleculares) que atraen a los fibroblastos para producir la encapsulación del biomaterial con el tejido fibroso en última instancia (Kasemo, 2002).

La superficie del material determina la respuesta biológica y la calidad de la osteointegración.

1.2.3.D. Propiedades fisicoquímicas

La capa de óxido de titanio determina las propiedades fisicoquímicas del Ti c.p. Los agentes químicos y biológicos no interactúan directamente con el metal, sino con esta capa estable de óxido. Sobre la superficie del Ti c.p. se identifican varios óxidos de titanio son: (Ti_3O , Ti_2O , Ti_3O_2 , TiO , Ti_2O_3 , Ti_3O_5 y TiO_2), se considera el dióxido de titanio TiO_2 , el más estable entre ellos (cuando la oxidación del titanio es +IV).

El espesor de la capa de óxido tendrá de 2 a 10 nm después de 1 segundo de ser expuesto al aire, formando una barrera sobre la superficie del metal (Lautenschlager et al, 1993). Con el tiempo se vuelve la capa más espesa todavía, Mosser demostró que la capa de TiO_2 después de 5 años se puede llegar a 200 nm (Mosser A. et al, 1992). Se demostró que la mineralización en la interfase titanio-hueso es más favorecida cuando la capa de TiO_2 más espesa (Larsson C, 2000). Varios autores demuestran que Ca y P tienen la capacidad de hacer enlaces con la capa de TiO_2 , lo cual ayuda el proceso de mineralización y osteosíntesis. Las proteínas séricas son adsorbidas con el mismo tipo de mecanismo, presumiblemente a través del calcio adsorbido por la superficie, en TiO_2 y hidroxiapatita (Ellingsen J, 1990).

La carga negativa del oxígeno en el TiO tiene capacidad de cambio iónico, es clave para alcanzar los iones calcio de los líquidos biológicos, esta capacidad se considera como base de la biocompatibilidad del titanio.

La habilidad del 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 et al, 1968; Bernardi et al, 1972).

1.2.4. Diseño macroscópico, microscópico y nanoscópico

El diseño macroscópico de los implantes dentales y con el objetivo de adaptarse y mejorar nuevos procedimientos clínicos (carga inmediata o precoz, hueso de mala densidad) se modificó continuamente en los últimos años y por motivos comerciales de fabricar una marca diferenciadora.

Existen diversos tipos de implantes roscados de raíz roscados, cilíndricos, perforados, impactados, rugosos, o lisos.



Fig.I.2. Diseños de implantes roscados. Tomada de (Gonzalez, 2002)

El diseño macroscópico de los implantes se puede influir en aspectos clínico-biológicos como aumentar la estabilidad primaria y del torque de inserción, adaptar unos defectos anatómicos y alveolos postextracción, mantener o reabsorbar de la cresta ósea marginal.

El diseño del implante afecta en la transmisión de cargas en el proceso de remodelado y estabilización del hueso receptor. Con el objetivo de mantener la osteointegración a largo plazo, que se podrán alcanzar con éxito consiguiendo una repartición óptima de la cargas.

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 ofrecen dos ventajas principales comparando con los implantes impactados de tipo cilíndrico, por eso son las preferidas en la implantología:

1. las roscas evitan los micromovimientos indeseables del implante hasta conseguir la osteointegración. a través de mejorar la estabilidad primaria, la cual es fundamental para los implantes no sumergidos o en áreas donde la densidad ósea es baja.

2. Las roscas del implante afecta en la transferencia de cargas desde el implante hacia el hueso circundante (las trabéculas óseas se adhieren en los filos de las roscas.

El diámetro, su longitud, así como el paso y la altura de la rosca influyen también en la estabilidad primaria y la osteointegración.

I.3. Tratamientos de superficie de implantes dentales

Para mejorar la respuesta biológica (las interacciones material-biosistema) se aplican varios tratamientos modificando la topografía y las propiedades físicoquímicas de la superficie del implante. La mayoría de los tratamientos transforman el carácter bioinerte del titanio a un material bioactivo. La mayoría de los métodos tienen un efecto principal, pero también tienen influencia sobre otras propiedades de la superficie.

Se puede clasificar los tratamientos aplicados sobre el Ti c.p. para aplicaciones biomédicas según la propiedad superficial en tres grandes grupos:

- a) la limpieza de la superficie y la eliminación de la capa nativa de la superficie, preparándola para otro tratamiento.
- b) la modificación de la estructura y la topografía (lisa, rugosa, porosa), este objetivo se puede conseguir a través de varias técnicas (pulido, arenado, grabado ácido...)
- 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.

En otra clasificación se utiliza el carácter físicoquímico fundamental del tratamiento empleado para distinguir los siguientes métodos.

I.3.1. Tratamientos mecánicos

- *Desbaste y pulido*: ayudan a eliminar las capas nativas y los restos sólidos de contaminantes, y conseguir una superficie lisa y lista para recibir un segundo tratamiento.
- *Mecanizado y arenado*: se realiza con un chorro de partículas sobre la superficie del implante bajo presión, estas partículas tienen que ser más duras que el metal del implante, pueden ser de aluminio, sílice, óxido de titanio o hidroxiapatita, las partículas pueden tener varios tamaños, sirve para eliminar la capa nativa y los restos de contaminantes, incrementa la reactividad superficial del implante, y por otro lado aumenta la rugosidad de la superficie formando depresiones irregulares llamadas macrorretenciones (Sul YT, Byon E, Wennerberg A, 2008)., mejora la

adhesión celular, y introduce tensiones residuales; aunque es imposible conseguir una superficie homogénea, y deja inadecuada pasivación.

I.3.2. Tratamientos químicos

Se considera el ataque ácido “Fastite Acid Etch” la preparación más utilizada en implantología dental, se consiste en inmersión del implante en ácidos fuertes, como el ácido sulfúrico, el clorhídrico, el nítrico, y en particular se utiliza el fluorhídrico con el TiO_2 , se consiste en desprender de partículas de metal de la superficie entre 0.5 y 2 μm , elimina los contaminantes, las capas nativas, modifica la rugosidad superficial, puede cambiar la composición química y la morfología de la superficie (Elias CN, 2010) y proporciona mayor estabilidad a largo plazo, por el hecho de que las células se adhieren más fácilmente a la superficie grabada (195,208,209 Bauer). Esta técnica tiene la ventaja de conseguir una superficie uniforme, controlar el grado de porosidad de la superficie, y de permitir un adecuado método de limpieza de las impurezas superficiales generadas durante su manufactura. El grado de grabado ácido se puede controlar de varios métodos como el tiempo de grabado, la concentración del ácido, y el ácido utilizado. Otros autores prefieren aplicar el doble grabado con ácido clorhídrico y ácido sulfúrico (Bugea C et al, 2008). También se puede combinar el grabado ácido con otros tratamientos como el tratamiento arenado (Rosales et al, 2010).

Existen otros tipos de tratamientos químicos:

Limpieza con disolvente para eliminar los contaminantes de la superficie consiguiendo una superficie limpia y lista para recibir un segundo tratamiento; Descarga eléctrica sirve para modificar la topografía superficial a través de aumentar la rugosidad; Implantación iónica modifica la composición química superficial y mejora la resistencia a la corrosión y al desgaste; Ataque alcalino aumenta la rugosidad superficial, mejora la formación de apatita, y hidroxila la superficie; Pasivado en ácidos oxida la superficie y minimiza la liberación de iones; Anodizado: consiste en exponer el material del implante a voltaje anódico en una solución iónica (suele ser H_2SO_4 , H_3PO_4 , ácido acético), este tratamiento modifica la estructura y la composición del óxido, aumenta el tamaño de la capa de óxido y mejora la resistencia a la corrosión, disminuye la liberación de iones, aumenta la rugosidad superficial, y se obtiene una superficie porosa.

I.3.3. Descarga lumínica

existen varios tratamientos luminicos como utilizando la ultravioleta, o plasma spray. La ultravioleta consiste en exponer la superficie del implante un rayo ultravioleta, limpia la superficie, elimina las capas negativas, graba, esteriliza, oxida, y nitrura la superficie, y plasma spray consiste en recubrir la superficie con la plasma bajo alta temperatura, esto produce particulas a la superficie los que fusionan formando un deposito de micrometros a varios milímetros, y se puede producir de varios materiales (titania, zirconia, o alumina). Este tratamiento suele ser combinado con otros tratamientos como el ataque acido o el arenado (230,232 bauer)

I.3.4. Métodos de recubrimiento

En esta tecnica se utilizan materiales bioactivos son capaces a producir reacciones favorables en los tejidos biologicos, pero no se puede utilizarlos como implante por sus inconvenientes propiedades mecanicas.

Esta técnica consiste en adición de material producidas en el tiempo cuando las partículas esféricas del polvo del metal (titanio) o cerámico (hidroxiapatita o HA) forman una masa cohesiva con el núcleo metálico del cuerpo del implante, Piliar et al muestró en dos trabajos en los años 1983, 1998 que las superficies porosas aumentan no sólo el área total y funcional de la superficie oseointegrable, sino también la adhesión biomolecular.

Existen varias formas de este tratamiento:

- a) Tratamiento con plasma spray de titanio (TPS) o de hidroxiapatita (HA)
- b) Tratamiento con oxidación anódica
- c) Tratamiento con deposición asistida por haz iónico (Ion Beam Assisted Deposition)

Enlace de iones y/o moléculas activas por adsorción físicoquímica, por enlace covalente con o sin espaciador, y por inclusión en materiales que actúan de portadores interacciona selectivamente con las proteínas (Bagno A. y DiBello C, 2004; Lausmaa J, 2001).

I.4. Caracterización de la superficie

Cada una de las propiedades de la superficie da informaciones sobre la calidad del implante, esto hace necesario el conocimiento amplio de las propiedades físicoquímicas 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).

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. Tanto unas como otras son relevantes en el comportamiento biológico del Ti c.p.

1.4.1. Topografía

Cosiste en tres factores (la rugosidad, la dimensión fractal, Y la Morfología) la topografía superficial puede considerarse la más importante de las propiedades superficiales que influyen en la respuesta del organismo a la presencia del implante.

La morfología de la superficie del implante, incluyendo su microtopografía y su rugosidad, son factores clave para su osteointegración. Se ha demostrado que una mayor rugosidad de la superficie incrementa el potencial de anclaje biomecánico. Los diferentes estudios publicados muestran cómo las células osteoblásticas son capaces de diferenciar no sólo entre superficies de diferente rugosidad, sino también entre superficies que, con la misma rugosidad, tengan diferente topografía.

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.

1.4.1. A. Rugosidad

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.

- Parámetros estadísticos de rugosidad

La rugosidad de la superficie está creada por valles y picos de amplitud variable y espaciado superior a las dimensiones moleculares, estos picos y valles cambian la rugosidad según sus forma de ubicación, altura, tamaño, por eso era necesario usar varios parámetros para dar una visión explícita realmente la rugosidad de la superficie, aquí explicamos unos parámetros para facilitar una buena descripción de la superficie.

Se puede dividir los parámetros de rugosidad en tres grupos:

1. Parámetros de amplitud:

Ra (Media aritmética de las desviaciones del perfil): es la media aritmética del valor absoluto de las distancias desde la línea media al perfil. 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 (fig.I.1).

La unidad usada para medir Ra es micras (μm) y es el parámetro habitualmente elegido para cuantificar de forma general la rugosidad de una superficie, y se calcula de la siguiente fórmula:

$$R_a = \frac{1}{l} \int_0^l |y(x)| dx$$

$$R_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i|$$

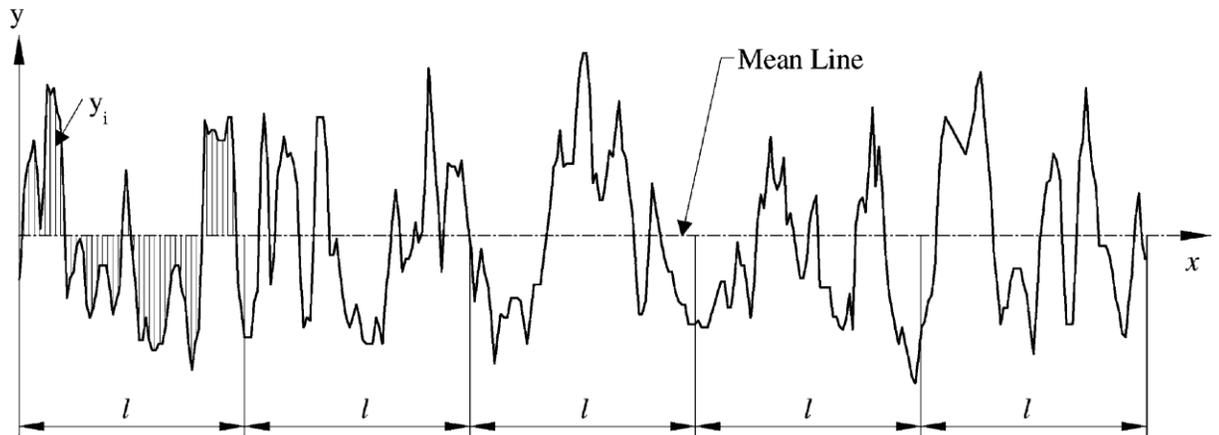


Fig. I.1. Media aritmética de las desviaciones del perfil (Ra). (Gadelmawla et al, 2002)

R_q (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. R_q tiene un significado estadístico ya que está asociado a la desviación estándar de la distribución de las alturas del perfil, y se calcula de la siguiente fórmula:

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{l} \int_0^l \{y(x)\}^2 dx}$$

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2}$$

R_t (Máxima altura del perfil): es un valor extremo, y describe la distancia entre la altura del máximo pico R_p y la mayor profundidad de los valles R_v , dentro de la longitud de muestra.

R_{pm} : es la media de los picos más altos en cada parte del perfil, y se calcula de la siguiente fórmula:

$$R_{pm} = \frac{1}{n} \left(\sum_{i=1}^n R_{pi} \right)$$

R_{vm} : es la media de los valles más profundos en cada parte del perfil (Fig.I.2), y se calcula de la siguiente fórmula:

$$R_{vm} = \frac{1}{n} \left(\sum_{i=1}^n v_i \right)$$

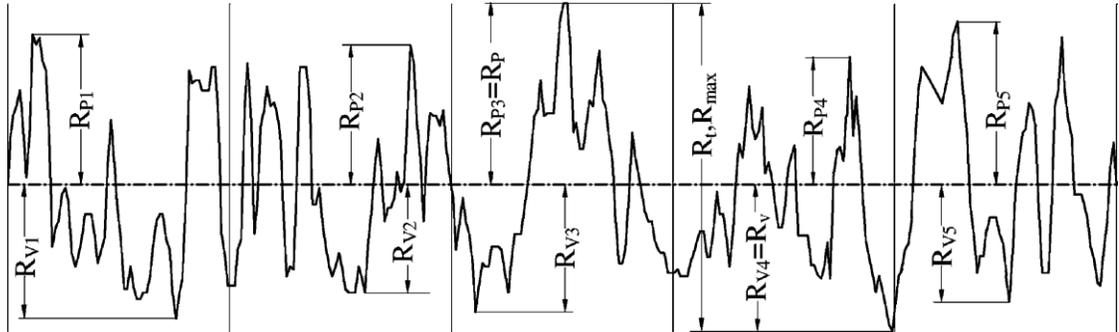


Fig.I.2. Los parámetros (Rp, Rv, Rpm, Rvm, Rt). (Gadelmawla et al, 2002)

Rz (altura de diez puntos): según DIN es la media de sumar los 5 picos más altos y los 5 valles más bajos a lo largo del perfil. Este parámetro más determinado que Ra en el caso de perfil con picos altos y valles profundos (Fig.I.3), y se calcula de la siguiente fórmula:

$$R_{z(DIN)} = \frac{1}{2n} \left(\sum_{i=1}^n p_i + \sum_{i=1}^n v_i \right)$$

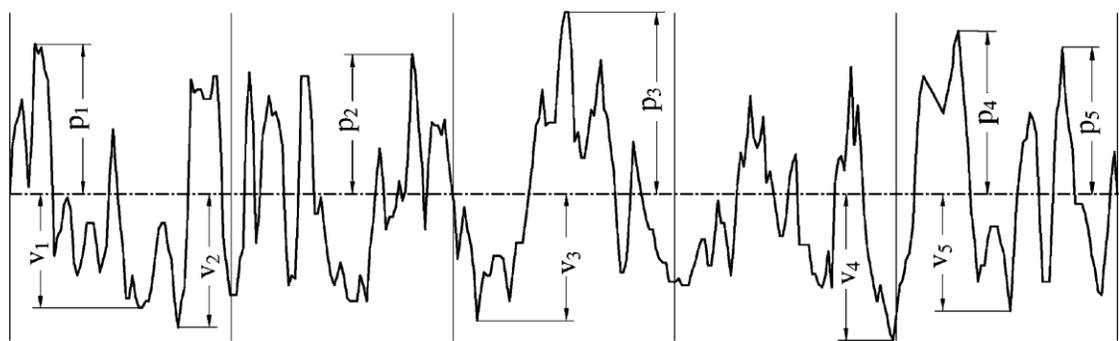


Fig.I.3. Altura de diez puntos (Rz). (Gadelmawla et al, 2002) Tomada de (Gadelmawla et al, 2002)

Rti la altura máxima pico-valle: es la distancia entre el pico más alto y el valle más profundo en cada parte del perfil (Fig.I.4).

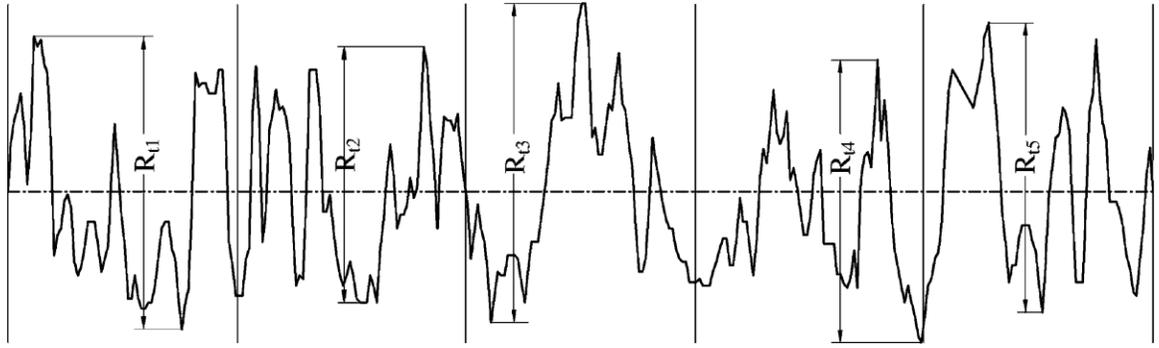


Fig.I.4. Altura máxima pico-valle (R_{ti}). (Gadelmawla et al, 2002)

R_{tm} : es la media de todas las distancias máxima entre los picos y valles en el perfil, y se calcula de la siguiente fórmula:

$$R_{tm} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n R_{ti}$$

R_y : es el valor más grande de la distancia entre el pico más alto y el valle más profundo (R_{ti}) a lo largo del perfil.

R_{3y} : es la distancia más larga entre las distancias calculadas entre los tres picos más altos y los tres valles más profundos en cada parte del perfil.

R_{3z} : es la media de los cinco (R_{3y}) en el perfil (Fig.I.5), y se calcula de la siguiente fórmula:

$$R_{3z} = \frac{1}{5} \left(\sum_{i=1}^5 R_{3yi} \right)$$

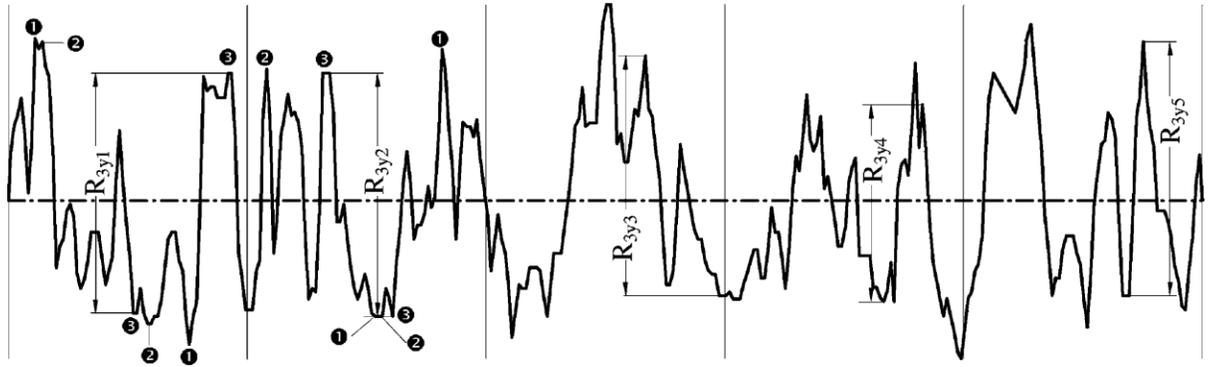


Fig. I.5. Altura del tercer punto (R_{3y} , R_{3z}). (Gadelmawla et al, 2002)

Skewness R_{sk} área: es un valor demuestra la oblicuidad del área de la superficie, se mide sobre la longitud de la evaluación, sirve para distinguir entre dos superficies tienen el mismo R_a o el mismo R_q pero con distintos bordes. Skewness es cero cuando el perfil tiene el mismo número de picos y valles, es positivo cuando el perfil tiene picos altos o valles planos, y es negativo cuando el perfil tiene picos planos o valles profundos, y se calcula de la siguiente fórmula:

$$R_{sk} = \frac{1}{R_q^3} \int_{-\infty}^{\infty} y^3 p(y) dy$$

$$R_{sk} = \frac{1}{NR_q^3} \left(\sum_{i=1}^N Y_i^3 \right)$$

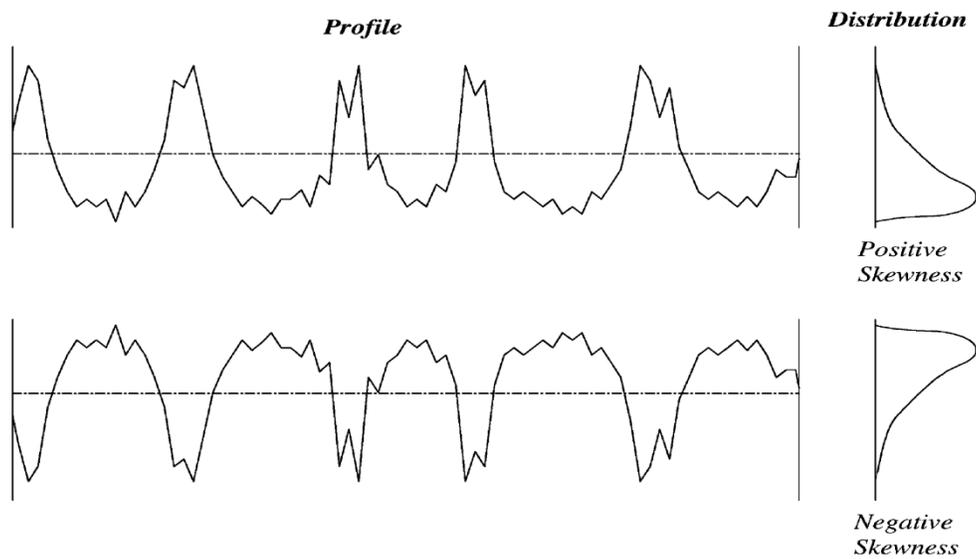


Fig.6. Skewness (R_{sk}). (Gadelmawla et al, 2002)

Kurtosis Rku área: es un valor demuestra la curtosis del área de la superficie. Describe la nitidez de un perfil, cuando $Rku < 3$ este significa que el perfil tiene pocos picos altos y valles profundos, y cuando $Rku > 3$ este quiere decir que el perfil tiene muchos picos altos y valles profundos (Fig.I.7), y se calcula de la siguiente fórmula:

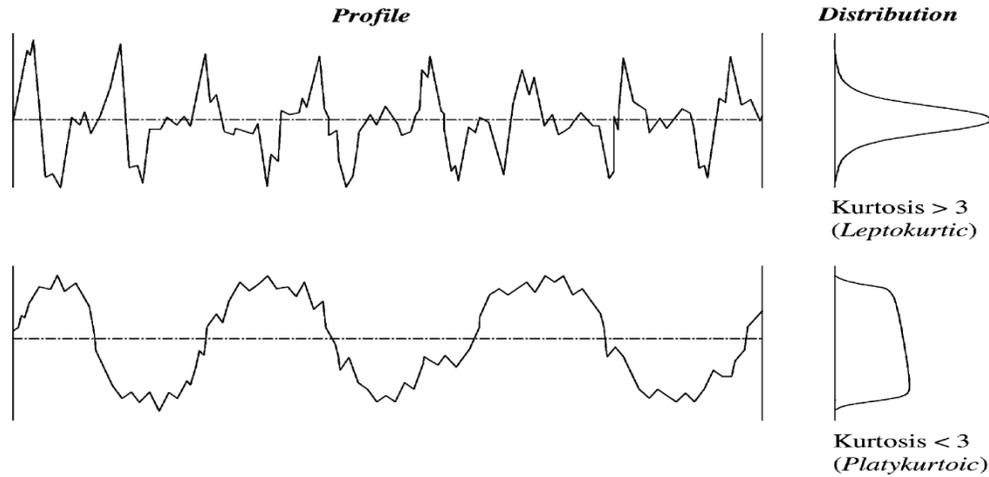


Fig.I.7. Kurtosis (Rku). (Gadelmawla et al, 2002)

$$R_{ku} = \frac{1}{R_q^4} \int_{-\infty}^{\infty} y^4 p(y) dy$$

El factor de solidez del perfil k : es la proporción entre la profundidad máxima de valles y la altura máxima del perfil, y se calcula de la siguiente fórmula:

$$k = \frac{R_v}{R_{max}}$$

La amplitud de la función de densidad (ADF): representa la distribución histograma de las alturas del perfil (Fig.I.8), y se calcula de la siguiente fórmula:

$$ADF(y) = \sqrt{2\pi R_q^2} \exp\left(\frac{-y^2}{2R_q^2}\right)$$

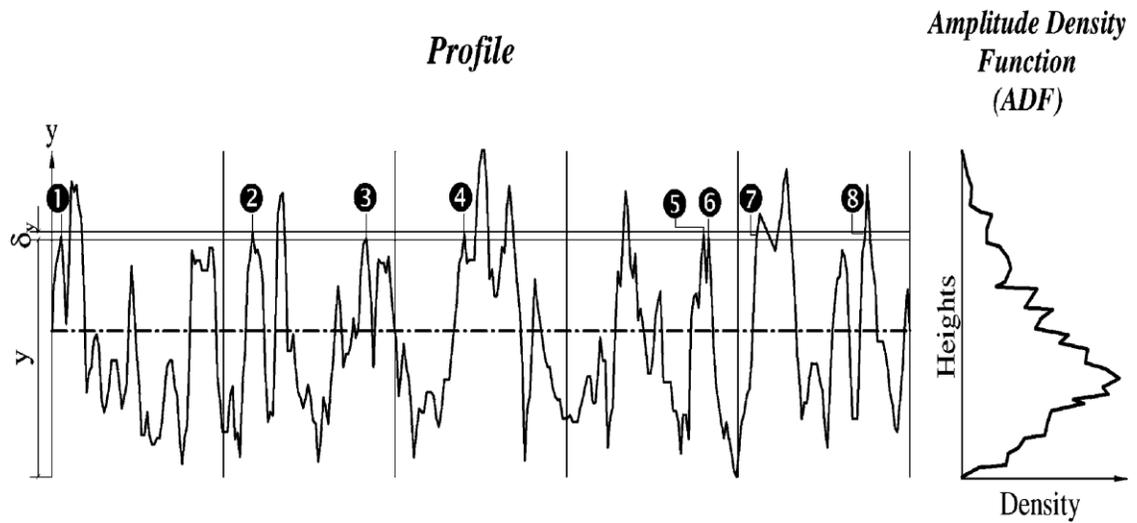


Fig.I.8. Amplitud de la función de densidad ADF. (Gadelmawla et al, 2002)

Función de auto correlación (ACF): define la dependencia general de los valores de los datos en una posición a los valores de estos datos en otra posición, y se calcula de la siguiente fórmula:

$$ACF(\delta x) = \frac{1}{L} \int_0^L y(x)y(x + \delta x) dx$$

Correlación de altura (β): describe la correlación característica de ACF, es la distancia más corta que el valor de ACF reduce a cierta fracción.

Energía espectral de densidad (PSD): es importante para caracterizar la aspereza amplitud y espaciamento, y se calcula de la siguiente fórmula:

$$PSD(f) = \frac{1}{L} \left| \int_0^L y(x) \exp(-i2\pi fx) dx \right|^2$$

2. parámetros de espacio:

Contar las regiones altas (HSC): es el numero de las regiones altas por encima de la línea media (Fig.I.9).

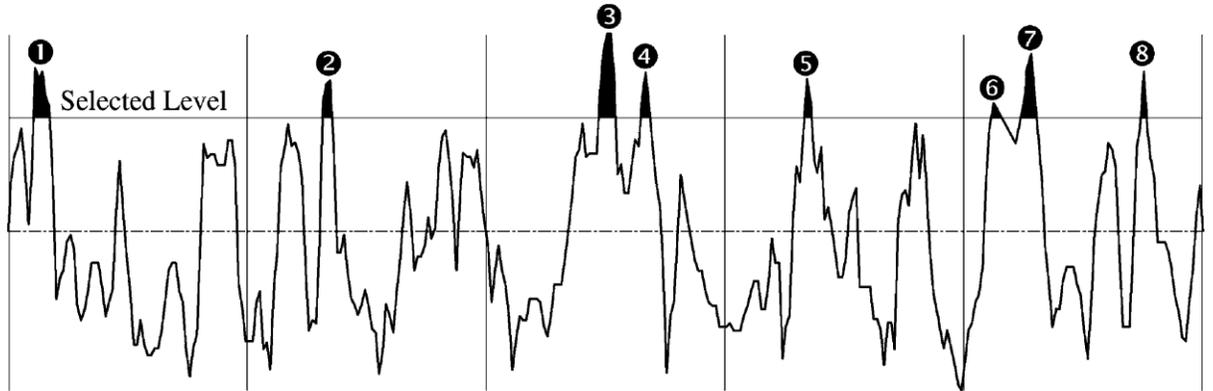


Fig.I.9. HSC por encima de línea elegida. (Gadelmawla et al, 2002)

Contar los picos (Pc): es el numero de los picos locales, los cuales se plantean a través de elegir una banda tiene la misma distancia por arriba y por debajo de la línea media (Fig.I.10).

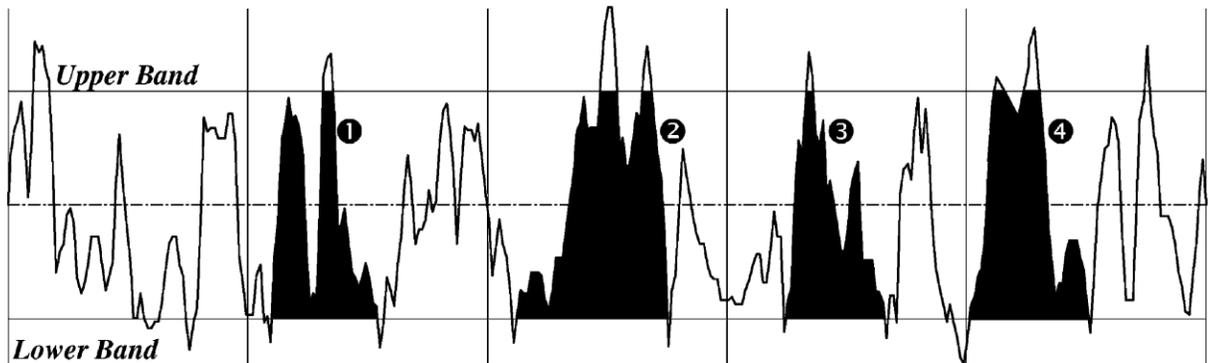


Fig.I.10. Pc dentro de una banda elegida. (Gadelmawla et al, 2002)

El espacio medio adyacente de los picos locales (S): es el espacio medio de la parte más alta del perfil medida entre dos adyacentes solo cuando la distancia vertical entre los adyacentes picos es mayor o igual de 10% del Rt del perfil (Fig.I.11), y se calcula de la siguiente fórmula:

$$S = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^n S_i$$

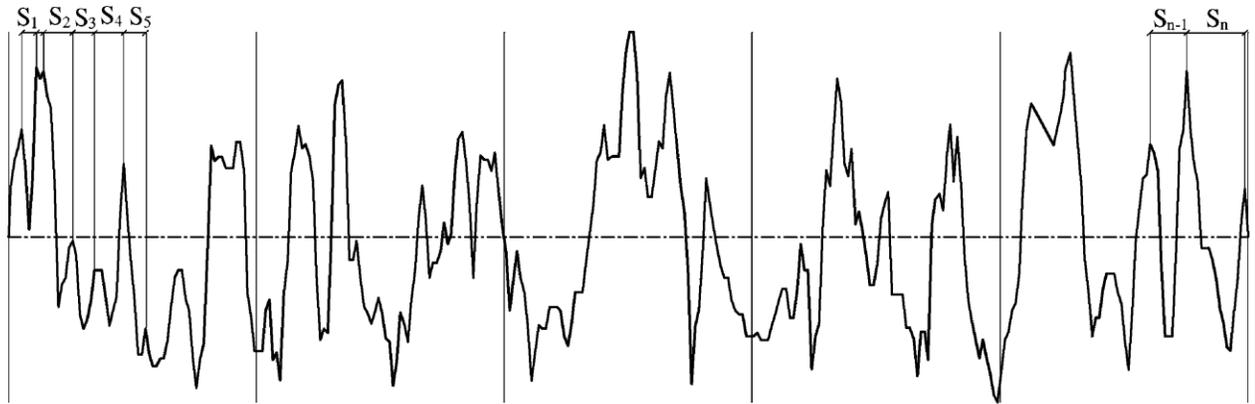


Fig.I.11. Espacio medio (S). (Gadelmawla et al, 2002)

Espacio medio de la línea media (S_m): es el espacio medio del punto más alto del perfil atravesando la línea media por arriba y por abajo (Fig.I.12), y se calcula de la siguiente fórmula:

$$S_m = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^n S_i$$

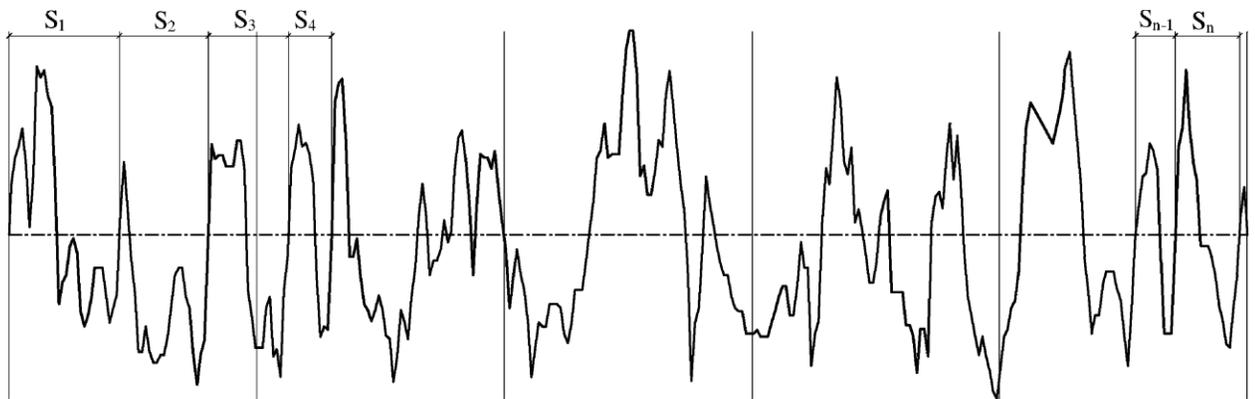


Fig.I.12. Espacio medio de la línea media (S_m). (Gadelmawla et al, 2002)

Numero de intersecciones del perfil de la línea media ($n(0)$): es el numero de las intersecciones de la línea media en cada centímetro a lo largo del perfil (Fig.I.13), y se calcula de la siguiente fórmula:

$$n(0) = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^n c_i$$

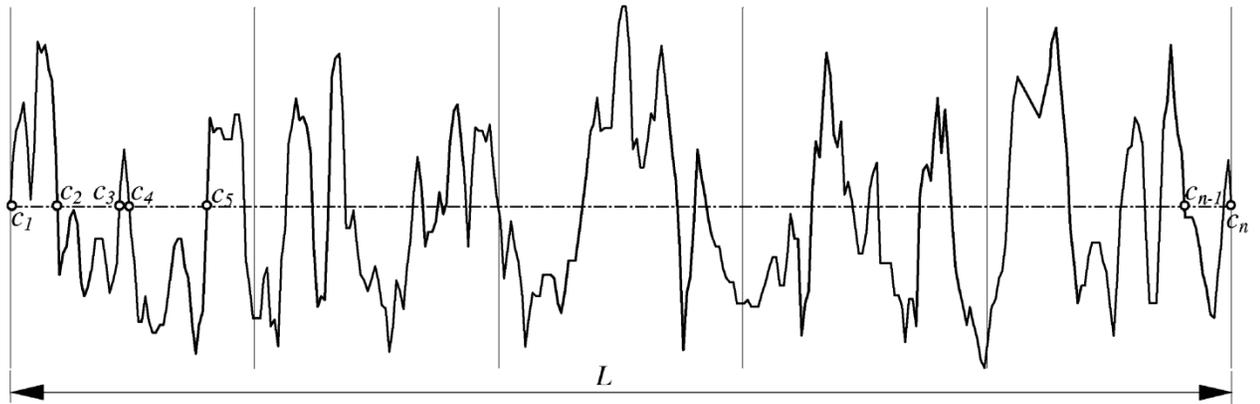


Fig.I.13. Número de intersecciones del perfil de la línea media (n (0)). (Gadelmawla et al, 2002)

Numero de los picos en el perfil (m): es el número de los picos en cada unidad, solo cuando la distancia entre los dos picos es mayor de 10% de la altura máxima del perfil Rt (Fig.I.14), y se calcula de la siguiente fórmula:

$$m = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^n m_i$$

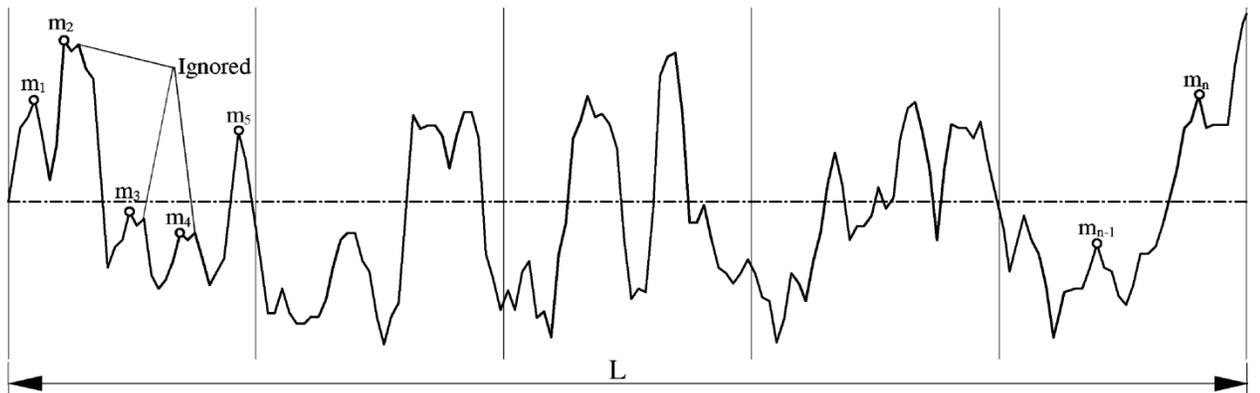


Fig.I.14. Número de los picos en el perfil (m). (Gadelmawla et al, 2002)

Numero de los puntos de inflexión (g): es el numero de los puntos de inflexión (Cuando el perfil cambia su sentido) del perfil en cada unidad (Fig.I.15), y se calcula de la siguiente fórmula:

$$g = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^n g_i$$

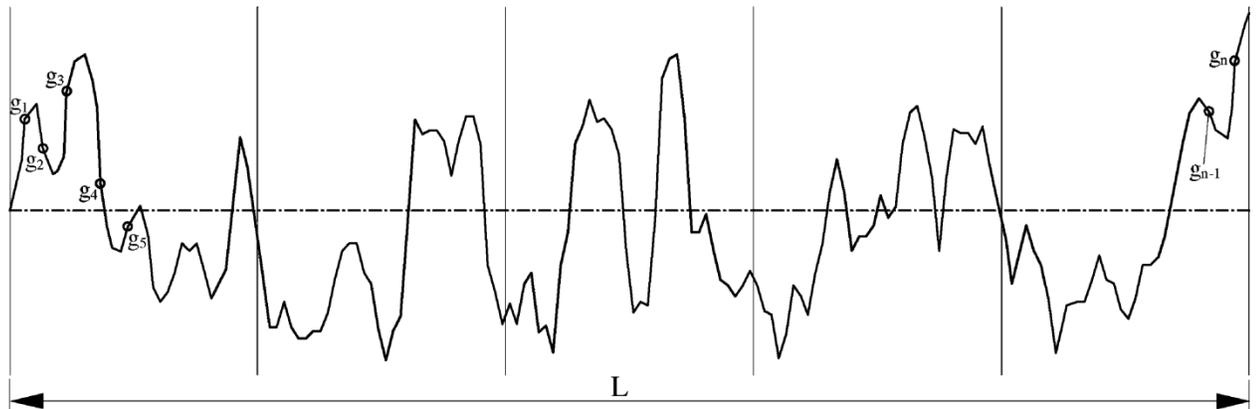


Fig.I.15. Numero de los puntos de inflexión (g). (Gadelmawla et al, 2002)

Media de radio de curvaturas (r_p): es la media de las curvaturas principales de los picos a lo largo del perfil, y se calcula de la siguiente fórmula:

$$r_{pi} = \frac{2y_i - y_{i-1} - y_{i+1}}{l^2}$$

1.4.1.B. Morfología

La morfología ayuda para saber la cristalinidad, Inclusiones, Vacantes, Límites de grano, y Forma 2D y 3D de los detalles superficiales.

La morfología de una superficie (ondulación) da unas informaciones sobre la topografía superficial ayuda en formar una imaginación de la superficie lejos de los valores numéricos de la rugosidad, mediante estudiar imágenes de dos dimensiones y tres dimensiones sacadas de microscopias como la confocal (Plu) y la electrónica del barrido (SEM), La morfología explica demuestra la posibilidad de tener dos topografías distintas con los mismos valores de rugosidad.

1.4.1.C. Dimensión fractal

Normalmente una superficie fractal tiene unas irregularidades que ocupan “llenar” el espacio incrustación (de tres dimensiones). Dimensión fractal cuantifica el trastorno en términos de la capacidad de llenar el espacio de la superficie, por lo tanto una superficie fractal debe ocupar intrínsecamente más espacio de una superficie plana (es decir, el espacio topológico, dos dimensiones).

De hecho, una superficie fractal normalmente se convierte en el espacio de llenado, pero no lo hace de manera uniforme, es que ocupa sólo ciertas regiones del espacio incrustación. Por lo tanto, la dimensión fractal se relaciona con el grado de compactación de la estructura del espacio de llenado.

En geometría de fractales, la dimensión fractal, es un número real que generaliza el concepto de dimensión ordinaria para objetos geométricos que no admiten espacio tangente.

La dimensión fractal es un exponente que da cuenta de cuán completamente parece llenar un fractal el espacio conforme se amplía el primero hacia escalas más y más finas. No existe una única dimensión fractal sino una serie de dimensiones que frecuentemente resulta equivalentes pero no siempre.

1.4.2. Química de superficie

La composición química da información sobre la composición atómica y el estado químico de los elementos en el implante.

Existen varias técnicas para evaluar la composición química de superficie del implante, Las más utilizadas son (microscopía electrónica de barrido EDX, X-Ray Photoelectron Spectroscopy XPS).

La técnica XPS analiza la espectrometría de la superficie mediante determinar la caracterización química de superficies. En esta técnica se detecta los elementos livianos como O, C, N y explica la situación de la combinación química de los elementos presentes en las superficies analizadas. A veces es obligatorio aumentar los tiempos de medida para coleccionar suficiente cantidad de cuentas, especialmente en el caso de los implantes odontológicos en que las superficies son rugosas o roscadas, porque una gran proporción de los fotoelectrones emitidos no alcanzan el analizador por lo que no contribuyen a la señal XPS.

I.4.3. Humectabilidad

Las propiedades mecánicas dan informaciones sobre la (elasticidad, plasticidad, tensión residual)

La humectabilidad es un factor que afecta en la respuesta de un cuerpo extraño, donde se dividen los metales en dos grupos hidrofóbicos o hidrofílicos, la superficie hidrofóbica tiene baja energía, es que induce la fibrosis, por otro lado la superficie hidrofílica con alta energía como el titanio, es que induce la actividad mitótica la que favorece la ramificación celular y la producción de la matriz extracelular, por tanto Lim concluye que la humectabilidad de una superficie predice su histocompatibilidad. Cuanto más humectable sea mayor formación de pseudópodos y microvilli celulares y por tanto mayor adhesión celular al implante.

- Ángulo de contacto θ

Cuando se deposita una gota de líquido sobre una superficie sólida, esta adopta una forma controlada por la energía libre de las tres interfaces involucradas sólido-líquido, sólido-vapor, y líquido vapor. 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° , 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, Θ_a es el ángulo de contacto de avance y Θ_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 sustrato. Entre las causas que pueden provocar histéresis se encuentran la contaminación tanto del líquido como del sustrato, 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 et al, 1997) se pueden encontrar multitud de formulaciones que tratan de justificar o completar la ecuación de equilibrio de Young para que incorpore las discrepancias encontrada en las superficies reales, intentando proporcionar un sentido físico al valor del ángulo de contacto.

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

La técnica utilizada en el estudios e 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 la interfase curva estática objeto de estudio. El tipo utilizado fue el de la gota sésil: se deposita una gota de líquido 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.

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.

El ángulo de contacto se forma entre la superficie de un líquido en contacto con una superficie solida. El ángulo de contacto se varía según la competición entre las fuerzas moleculares liquido –liquido y las fuerzas liquido-solido, y según del sólido y del liquido de que se trata. También afecta la superficie del solido (liso, limpieza)

Si el ángulo de contacto es menor que 90° , la superficie liquida se mantiene poco contacto con la superficie del sólido y subirá por un tubo estrecho.

Si el ángulo de contacto es mayor que 90° , el líquido se extiende y se hundirá en un tubo. Si $\theta = 90^\circ$, el liquido no ascenderá ni bajará. El ascenso o el hundimiento de un líquido en un tubo estrecho.

I.4.4. Adhesión, diferenciación y proliferación celular

La adhesión celular es la capacidad celular de unirse a elementos del medio externo o a otras células. La adhesión celular resultado de las fuerzas electrostáticas y otras interacciones inespecíficas por moléculas específicas en adhesión celular.

Se utilizan varias líneas como 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), MG-63 es la línea utilizada en el Centro de Instrumentación Científica de nuestra Universidad (Rosales et al, 2010)

Otros autores utilizan la línea MC3T3-E1 (DSMZ, Braunschweig, Germany), también es una línea de osteoblastos se usa in modelo vitro (Lamolle et al, 2009b, He F, 2010, Lumetti S et al, 2016).

I.5. Cultivo celular

El cultivo celular es un proceso cada vez tiene más beneficios en la implantología dental, es el juez que puede valorar el éxito o la utilidad de los tratamientos superficiales de los implantes dentales.

I.5.1. Proteínas relacionadas con la adhesión celular

Proteínas colágenicas (colágeno tipo I 97% y colágeno tipo V 3%) forman 90% de la matriz extracelular y 10% lo forma proteínas no colágenicas (osteocalcina 20%, osteonectina 20%, sialoproteínas óseas 12%, proteoglicanos 10%, osteopontina, fibronectina, factores de crecimiento, proteínas óseas morfogenéticas, etc). Estas proteínas están sintetizadas por el hueso y tienen un papel importante en la adhesión de los osteoblastos en la superficie del implante.

Proteínas como Arg-Gly-Asp y secuencias poliacídicas, la osteopontina y la sialoproteína ósea participan en la adhesión celular y en el enlace mineral (Butler, Ritchie, 1995).

En estudios empíricamente sobre la adhesión celular se aisló diversos grados de pureza y caracterizadas de las proteínas como fibronectina, laminina, epibolina, epinectina y vibronectina. Y recientemente se aisló el tripeptido arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) (Ruoslati, 1987). RGD son receptores de la superficie celular por las integrinas, que pueden reconocer sólo una simple proteína que contenga el péptido RGD, por esto se necesita células diferentes con diferentes integrinas para reconocer a

diferentes proteínas RGD.

Por eso se utilizan biomateriales de recubrimiento con sustancias que promuevan el anclaje de una población celular deseada a otras o bien el anclaje celular no específico por incorporación de péptidos con la secuencia RGD en polímeros de la superficie de los implantes, lo que 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, 1999).

Existen proteínas óseas con propiedades quimiotáticas determinante en adhesión celular, como Arg-Gly-Asp con una potencia especial de fijar los receptores de la membrana celular como integrinas (fibronectina, osteopontina, sialoproteína ósea, trombospondina, colágeno tipo I, vitronectina), (Grzesik, Robey, 1994).

Otros estudios de inmunocitoquímica demuestran que la capa interfacial electrónica densa contiene muchos glicosaminoglicanos (Linder, 1985), en especial manera la osteopontina y la sialoproteína ósea así como proteínas plasmáticas, como $\alpha 2$ glicoproteína HS (Nancy et al, 1998; Ayuhawa 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 séricas, 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).

I.5.2. Proteínas del citoesqueleto

El citoesqueleto es un sistema de filamentos responsables del mantenimiento y los cambios en la forma celular, existe en el citoplasma de las células, además de dirigir la locomoción celular, el movimiento de varios elementos en el citoplasma, la integración de los orgánulos citoplasmáticos más importantes, la división celular, la organización de los cromosomas y el movimiento, y la adhesión de una célula a una superficie o con otras células.

Los contactos focales o placas de adhesión son los sitios de adhesión entre el cultivo celular y la superficie del sustrato, también se puede definirlos como uniones cerradas donde 10-15 nm separan la superficie del sustrato y la membrana celular.

Los contactos focales se forman en células de baja movilidad y está promovida *in vitro* por proteínas de matriz extracelular como fibronectina, vitronectina.

En la parte exterior de los contactos focales parecen unas proteínas receptoras específicas como las integrinas. Donde en la parte interior de los contactos focales parecen proteínas trabajan como mediadoras de la interacción entre los filamentos de actina y las proteínas receptoras de membrana (integrinas), estas proteínas son la talina, paxillina, vinculina, tensina.

Se participan muchas proteínas (integrina, proteínas del citoesqueleto, proteinasas, proteínas kinasas y fosfatasas, moléculas señalantes etc) con vinculina y talina en la placa de adhesión. Estas proteínas tienen un papel muy importante en la señal de transducción.

La arquitectura de citoesqueleto de la actina es determinante para mantener la forma de la célula y la adhesión celular. Cuando se organiza en largos bultos, la F-actina suporta protrusiones en forma de dedo de la membrana del plasma conocidas como filopodia; y cuando se organiza en forma de red, eso suporta protrusiones en forma de hoja llamadas lamellipodia. Si se presentan unidas en bultos con las placas de adhesión, las fibras sometidas a estrés de actina podrían transmitir fuerzas al sustrato (Zigmond, 1996).

I.5.3. Moléculas de adhesión

Moléculas de adhesión celular (MAC) son proteínas localizan en la superficie de la membrana celular con la capacidad de unirse con otra célula, en el caso de unirse con la matriz extracelular se llama el proceso adhesión celular.

Son proteínas receptores transmembrana, tienen tres dominios

- Intracelular: interacciona con el citoesqueleto.

- Transmembrana: atraviesa la membrana.
- Extracelular: interacciona con la matriz extracelular (unión heterofilica), con otras MAC, o con proteínas del mismo tipo (unión homofilica).

Estas proteínas pertenecen a diferentes familias. La mayoría de estas proteínas entran en cinco familias fundamentales son las selectinas, las inmunoglobulinas, cadherinas, integrinas, y los receptores de linfocitos. Entre ellas, solo las caderinas y las integrinas han sido descritas hasta ahora en células osteoblasticas. También se puede clasificar estas familias a base de la dependencia del calcio, es que entran las inmunoglobulinas y las integrinas bajo de MACs independientes de calcio.

Las inmunoglobulinas son homofílicas o heterofílicas, es que pueden unirse a las integrinas o a otras inmunoglobulinas diferentes.

La familia de las integrinas está compuesta por 24 heterodimeros de dos subunidades unidas de forma no covalente denominadas α y β . Se describió 16 sub-unidad α y 8 subunidad β . La diversidad de estructuras esta asociadas con varias posibilidades de enlace con el ligando. Cada sub-unidad está compuesta por un largo dominio extracelular, un dominio transmembrana y un corto dominio citoplasmático.

Las integrinas son heterofílicas que se unen a las MACs tipo inmunoglobulina o a la matriz extracelular ha sido demostrado que las integrinas interactuan directamente con el substrato de titanio (Gronowics y McCarthy, 1996).

Cuando atraviesa la integrina la membrana forma una interfase entre los compartimentos entra y extra celulares y puede trasladar los ligandos externos a informaciones internas que se meten en varias procesos (adhesión celular, migración celular, y consecuentemente la regulación del crecimiento celular y la diferenciación).

El agrupamiento y la ocupación por parte de la integrina provoca el reclutamiento de la tensina y la adhesión focal de la kinasa, su fosforilación y sucesivamente el reclutamiento de talina, vinculina, y α -actina, (Craig y Johnson, 1996).

Existen factores como iones y la acción de agentes reguladores intracelulares así como extracelulares afectan en el numero de integrinas en la superficie de la célula, y su afinidad para las proteínas en la superficie del substrato (Damsky, 1999). Los cambios numéricos de estos factores (iones y sus distribuciones en la superficie de las células) pueden producir un cambio en el fenotipo por alteración de la expresión génica (Gronowics y McCarthy, 1996).

Las su-unidades de integrina $\alpha 1$ y $\alpha 5$ son los dominantes en el hueso y todos los tipos de células óseas parecen en células de cultivo (Hughes, 1993).

I.5.4. Influencia del material sobre la adhesión celular

Las características de una superficie como la topografía, la composición química, y la energía superficial juegan papel importante en la adhesión celular, es que determinan si las moléculas son absorbidas por la superficie, además de dirigir y orientar las moléculas (Boyan, 1996).

Características superficiales como la morfología, la capacidad de proliferación y la diferenciación son determinante en la primera fase de adhesión de las proteínas. Otras características termodinámicas de la superficie, permite la interactúan con el bio ambiente alrededor a través de formar una capas reactivas.

Los efectos sobre la superficie producidos por las técnicas utilizadas en la preparación de la superficie y de esterilización tienen un papel importante sobre la adhesión celular in vitro (Baier et al, 1982; Stanford et al, 1994; Vezeau et al, 1996).

El titanio comercialmente puro c.p tienen un espesor de oxido de 2-6 nm antes de implantación, aun que este espesor del oxido es de 2a 3 veces más anchos en implantes desinsertados. Analizando la composición química del oxido, se detectó unos cambios causados por incorporación de Ca, P, y S (Lausmaa et al, 1988; Sundgren et al, 1985).

Se demostró que se consigue mejor adhesión celular en superficies hidrofílicas que en superficies hidrofóbicas (Altankov, Groth, 1994).

La absorción y la modificación estructural de las proteínas en el material esta influenciada por la energía de la superficie (Boyan et al, 1996) es que en las superficies cargadas positivamente contraen contactos muy estrechos con las células que forman la membrana celular del substrato, mientras que en superficies cargadas negativamente se encuentran contactos focales entre células y substrato (Shelton et al, 1998).

Estudio in vitro sobre la influencia de la vitronectina en la adhesión celular demostró que la presencia de vitronectina en una región cargada positivamente en células óseas es determinante para la distribución, la adhesión y la proliferación (Thomas et al, 1997).

(Altankov, Groth, 1994) habló sobre la importancia de la adsorción de la plasma fibronectina en la adhesión celular, es que la conformación de la plasma fibronectina afecta las conformaciones del dominio celular y la afinidad de la fibronectina con su receptor de superficie celular (Iuliano et al, 1993).

Evaluando la adhesión celular en materiales polimetilmetacrilado pero con grados distintos de rugosidad. Se encontró que la adhesión celular tenía relación con el grado de rugosidad y la hidrofobicidad, es que la componente apolar de la energía de superficie incrementa significativamente con la rugosidad aunque la componente básica disminuye y (Lampin et al, 1993).

II. Justificación y objetivo

II.1. Justificación del trabajo

Con todo el éxito que está teniendo el implante dental en restaurar al diente en los pacientes que tienen ausencia de unos o todos los dientes seguimos teniendo casos de riesgo donde no se puede garantizar este tratamiento como en los pacientes que sufren infecciones o tumores afecta en el metabolismo del hueso, pacientes diabéticos y pacientes fumadores, o en casos de necesidad de carga mediata, por eso se necesita buscar soluciones para mejorar la osteointegración y conseguir una adhesión celular más rápida, lo que requiere investigar más en los temas que pueden influir en la osteointegración y la adhesión celular, temas como el material empleado para fabricar el diente, el tratamiento que recibe la superficie, el diseño macroscópico del implante, y la técnica quirúrgica.

En este trabajo se eligió el titanio porque es el más utilizado por su estabilidad, compatibilidad, y se eligió el ácido fluorhídrico para grabar la superficie por su efecto en mejorar la adhesión celular a través de aumentar la dimensión fractal y la humectabilidad de la superficie.

Otros estudios evaluaron el efecto del tiempo de grabado ácido (Lamolle et al, 2009b) pero el tiempo de grabado ácido no iba suficiente para determinar el mejor tiempo de grabado, por eso en este trabajo se grabó la superficie más tiempo hasta 10 minutos.

II.2. Objetivo

El objetivo principal de este estudio es evaluar el efecto del tiempo de grabado ácido en la topografía (rugosidad, morfología, y dimensión fractal), la humectabilidad, la química de la superficie del titanio, y la adhesión celular; Además de evaluar el efecto de las diferentes escalas de medida.

III. Materiales y métodos

Este trabajo se realizó en la Universidad de Granada con la colaboración entre la Facultad de odontología en el laboratorio de investigaciones y la Facultad de ciencias en el departamento de física aplicada. En primer lugar se describen los materiales utilizados en este estudio, la preparación de la muestra, las técnicas de grabación acida, y posteriormente los experimentos realizados, tabla III.1:

Tabla III.1. Diseño del trabajo					
Barras de Ti c.p grado II →144 discos					
↓					
Pulir+ultrapulido+pasivado					
↓					
24 discos (control)	24 discos grabados por 2min	24 discos grabados por 3min	24 discos grabados por 5min	24 discos grabados por 7min	24 discos grabados por 10min
3 discos por grupo para el confocal	3 discos por grupo para XPS	3 discos por grupo para EDX	3 discos por grupo para ADSA	12 discos por grupo para el cultivo celular	

III.1. Materiales utilizados

En este estudio se utilizó barras de titanio comercialmente puro Ti c.p. Grado II (Manfredi Pure Titanium, S. Secondo di Pinerolo, Italia), tabla III.2:

Tabla III.2. Composición química y porcentaje de los elementos en el Ti c.p grado II						
composición	N% máx	C% máx	H% máx	Fe% máx	O% máx	Ti %
Ti cp Grado II	0.03	0.10	0.0125	0.30	0.25	Balance

Las cristalinas del Ti tienen una forma hexagonal como muestra la imagen obtenida del microscopio electrónico de barrido (fig.III.1)

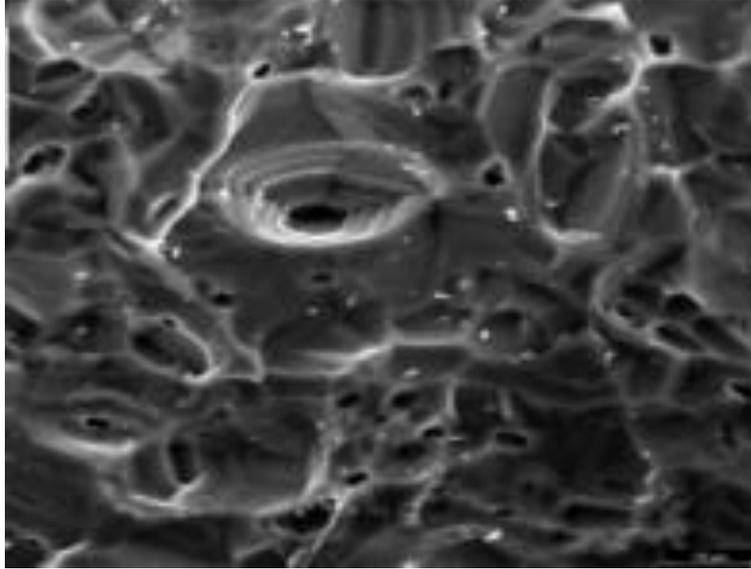


Fig. III.1: Imagen del microscopio electronico muestra la cristalina hexagonal del Ti.

III. 2. Preparación de los especímenes

Los discos se han obtenido a partir de la mecanización de barras de 2 cm por un diámetro de 3-4 mm del material referido. Se cortaron en un micrótopo Accutom 50 (Struers, Alemania) (Fig. III.2) utilizando discos de corte diamantados (C.F.Schroder, Alemania).



Fig.III.2.Micromoto Accutom utilizado para cortar las barras del titanio

Una vez obtenidos los discos se realizaron pulido mévalo grafico manualmente con discos de SiC de 400, 800, 1000, 1200, 2000, 2500, 4000 grit (Fig. III.3).

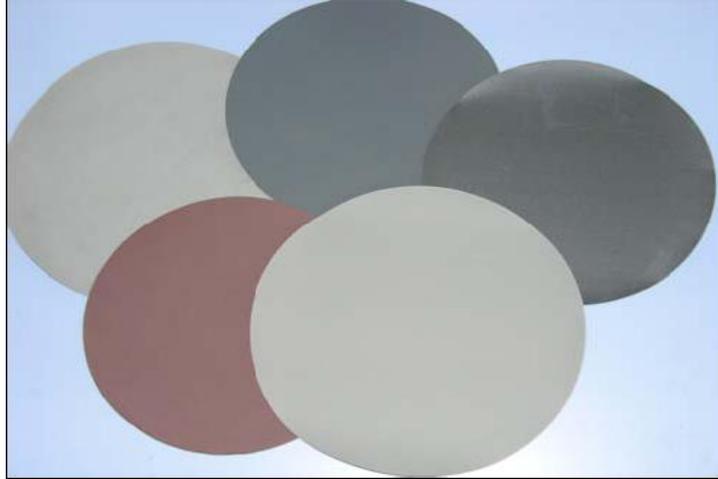


Fig.III.3. Discos abrasivos utilizados en el pulido.

El ultrapulido se realizó manualmente con partículas de oxido de aluminio de (1, 0,3, 0,05) μm (Buehler, Munich, Germany). (Fig. III.4) hasta llegar a un pulido espejo o mévalo grafico (Fig. III.5).



Fig.III.4. Partículas de aluminio utilizadas en el ultrapulido.



Fig.III.5. Discos de titanio después el ultrapulido

Posteriormente se lavaron en un baño ultrasonido (Selecta, Barcelona, Spain), Se dividió la muestra (144 discos) en 6 grupos de estudio (24 discos en cada grupo) en función de la acción recibida, el primer grupo se quedó sin grabar (pulido espejo), se consideró como control para comparar el efecto del grabado ácido en el resto de los grupos. Se utilizó el ácido fluorhídrico (Banreac) al 10% para grabar los discos a distintos tiempos. Los grupos de estudio fueron:

Grupo 1: Control (pulido espejo).

Grupo 2: Grabado por 2 min.

Grupo 3: Grabado por 3 min.

Grupo 4: Grabado por 5 min.

Grupo 5: Grabado por 7 min.

Grupo 6: Grabado por 10 min.

Los especímenes que recibieron grabado ácido se pasivaron en un ataque químico con una disolución de ácido nítrico (Panreac, Barcelona, España) al 30% durante 3 min, finalmente, todos los discos se lavaron en ultrasonidos con acetona (Panreac, Barcelona, España) al 70% durante 20 min y se secaron en estufa a 37° durante 24h, y sucesivamente se lavaron en agua destilada por 30 min y secaron en estufa a 37° durante 24h.

En este capítulo hablamos de los instrumentos utilizados y explicamos las técnicas usadas para hacer las medidas y sacar los resultados.

III.3. Rugosidad y dimension fractal

Para este propósito se utilizó el microscopio Confocal de luz blanca PLμ, Scanning ElectronMicroscope Leo1430-VP (Carl Zeiss,Oberkochen,Germany)., el microscopio confocal es un instrumento muy importante para la determinación cuantitativa de la rugosidad y la dimension fractal de la superficie de los discos, se utilizó cinco objetivos (x100, x200, x500, x1000, y x1500) escaneando distintas áreas (58x43 μm², 117x86 μm², 292x214 μm², 584x428 μm², y 776x642 μm²)

Tabla.III.3. Los parámetros de la topografía		
Parámetro	descripción	Unidad
Ra	Media aritmética de las desviaciones del perfil	μm
Rq	Media de la raíz cuadrada de las desviaciones del perfil	μm
Rt	Máxima altura del perfil	μm
Rp	La altura del máximo pico	μm
Rv	La profundidad del mayor valle	μm
Rsk	Simétrica de la distribución de los picos (skewness)	-
Rku	Se forma de la distribución de los picos (kurtosis)	-
DF		

Se evaluaron valores de siete parámetros de descripción vertical (o en altura) del perfil: Ra, Rq, Rp, Rv, Rt, Rsk area, Sku area, descritos en la table anterior.



Fig. III.9 Imagen del microscopio confocal de luz blanca

Se utilizaron tres discos de cada tiempo, se realizaron 3 medidas en cada uno de los discos.

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.

III.4. Morfología de la superficie

Para evaluar la morfología de las superficies estudiadas se utilizaron dos microscopios (el microscopio confocal, y el microscopio electrónico de barrido) para obtener una imaginación cercana a la actualidad y formar mejor entendimiento a los resultados de la rugosidad.

III.4.1. Morfología con el microscopio confocal

Se estudiaron todas las imágenes sacadas del microscopio confocal (perfil, bidimensiones, tridimensiones) para observar los cambios morfológicos en cada uno de los tiempos estudiados con la ayuda de los análisis de los parámetros de la rugosidad. Las siguientes figuras (fig.III.8, fig.III.9, fig.III.10, fig.III. 11) enseñan una muestra de las imágenes de dos y tres dimensiones y los perfiles.

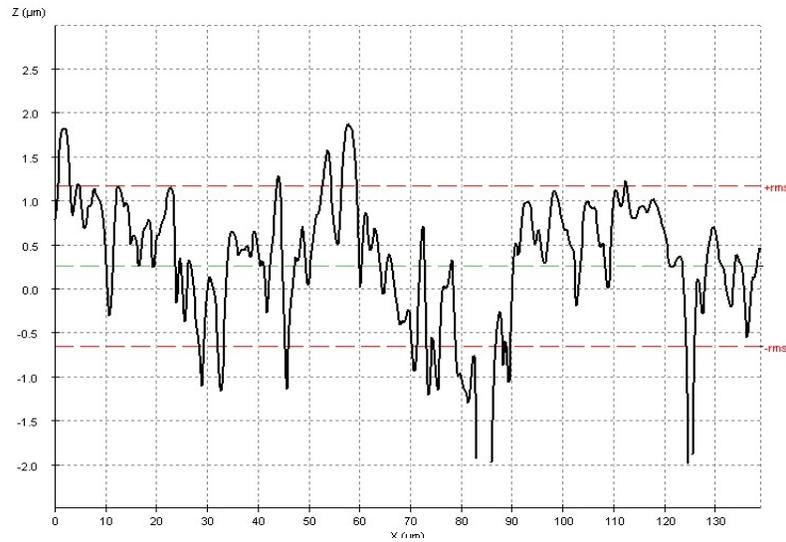


Fig.III.10: Imagen perfil observa la topografía de la superficie grabada 2 min con el objetivo x1000 del microscopio confocal.

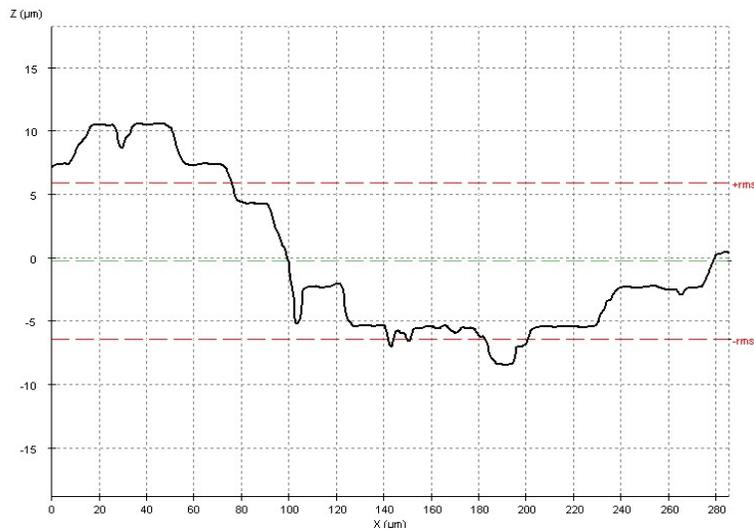


Fig.III.11: Imagen perfil observa la topografía de la superficie grabada 10 min con el objetivo x500 del microscopio confocal.

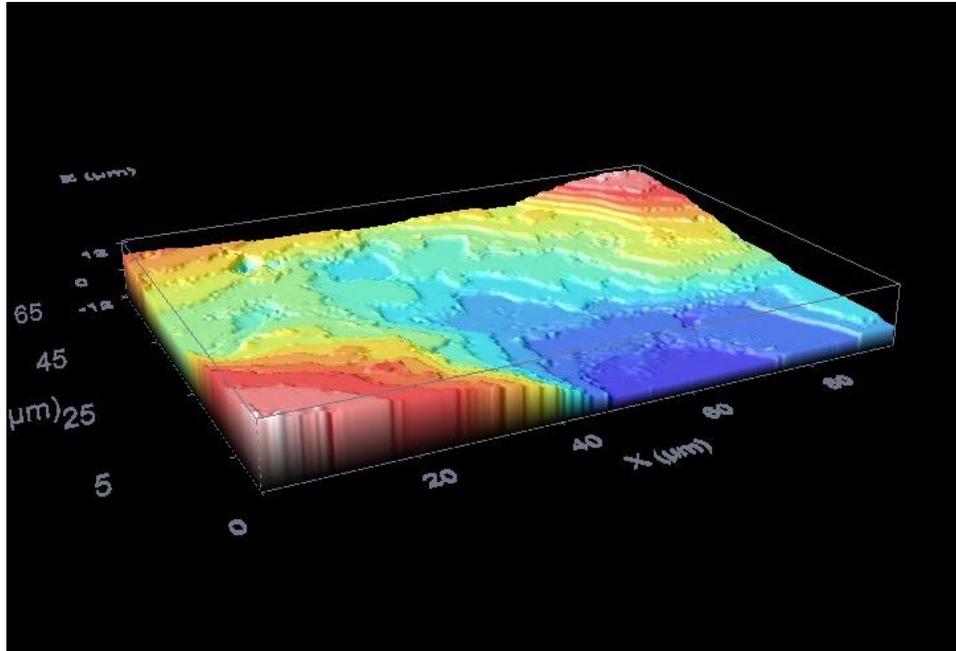


Fig.III.12: Imagen tridimensional observa la topografía de la superficie grabada 10min con el objetivo x1000 del microscopio confocal.

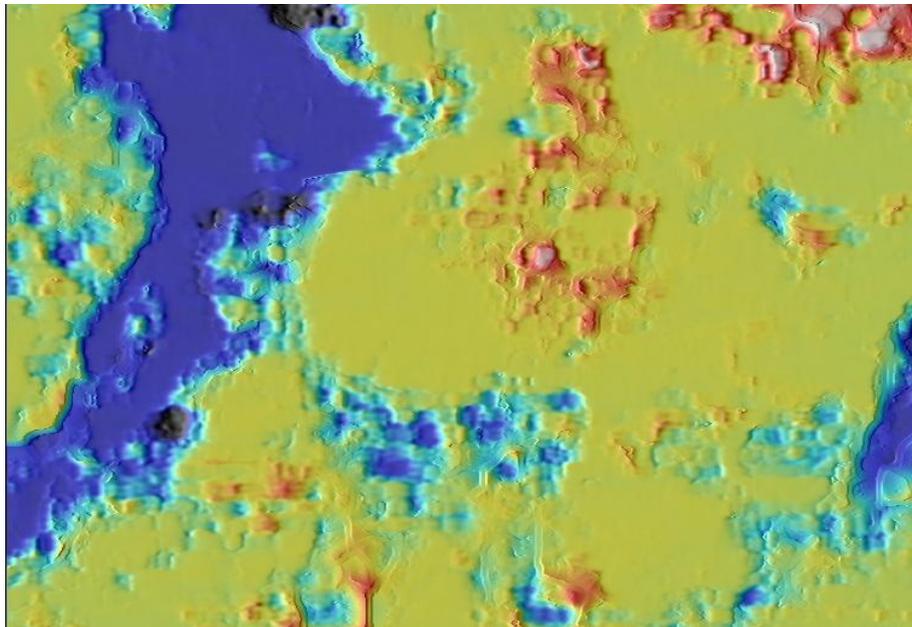


Fig.III.13: Imagen bidimensional observa la topografía de la superficie grabada 2 min con el objetivo x1500 del microscopio confocal.

III.4.2. Morfología con microscopio electrónico de barrido (MEB)

La morfología de la muestra estudiada fue analizada también con la microscopía electrónica de barrido.

El microscopio electrónico de barrido de alta resolución, modelo Hitachi, S-510, es el que se usó en el presente estudio, dotado de:

- Tensión de aceleración de 25 kv.
- Rangos de aumentos de 20x a 150.000x a 5 mm de distancia de trabajo.
- Control manual de todas las funciones.
- Detector de SE, con resolución de 7 nm a 25 kv.
- Detector de BSE tipo semiconductor de cuatro cuadrantes con resolución de Z=1.
- Detector de EDX, Röntec, M Series, Edwin, Si (Li).
- Sistema de microanálisis Edwin de Röntec.
- Cámara de infrarrojos GW con monitor LCD.

Aparte de dos unidades, unidad de metalización con oro NANOTECH SEMPREP2, y la unidad de evaporación con carbón POLARON CC7650.

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.



Fig.III.14. Microscopio Electrónico de Barrido Hitachi

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.

Tres discos de cada tiempo utilizaron para observar la morfología con el microscopio electrónico de barrido usando 4 aumentos (500, 1000, 2000, 5000) según lo siguiente:

Los especímenes, se cementaron en portamuestras de aluminio para MEB y se cubrieron con carbon durante 1 minuto utilizando la unidad de evaporación con carbón POLARON CC7650.

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

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.

Las siguientes figuras ofrecen imágenes tridimensionales a varios aumentos de superficies estudiadas.

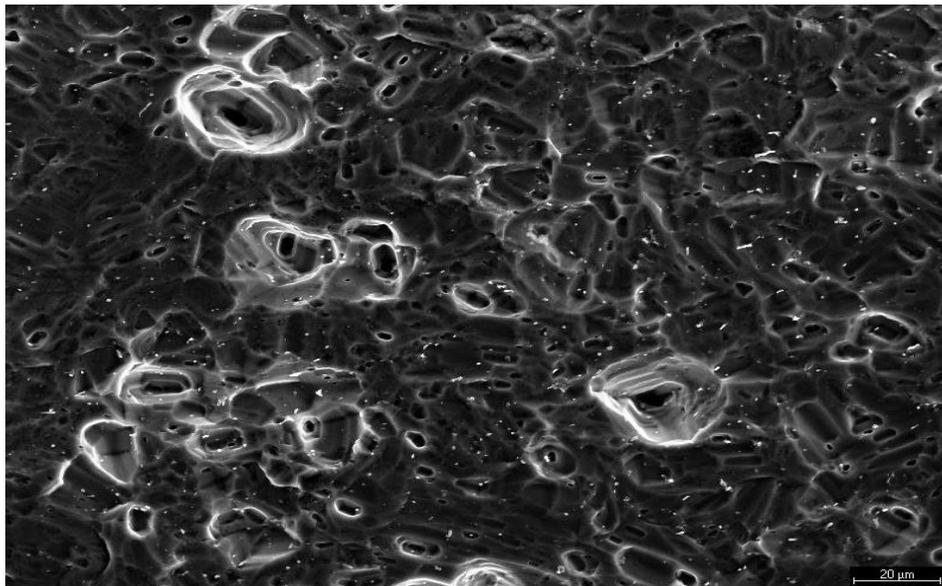


Fig.III.15: Imagen tridimensional observa la morfología de la superficie grabada 2 min con magnificación de 500x del microscopio electrónico.

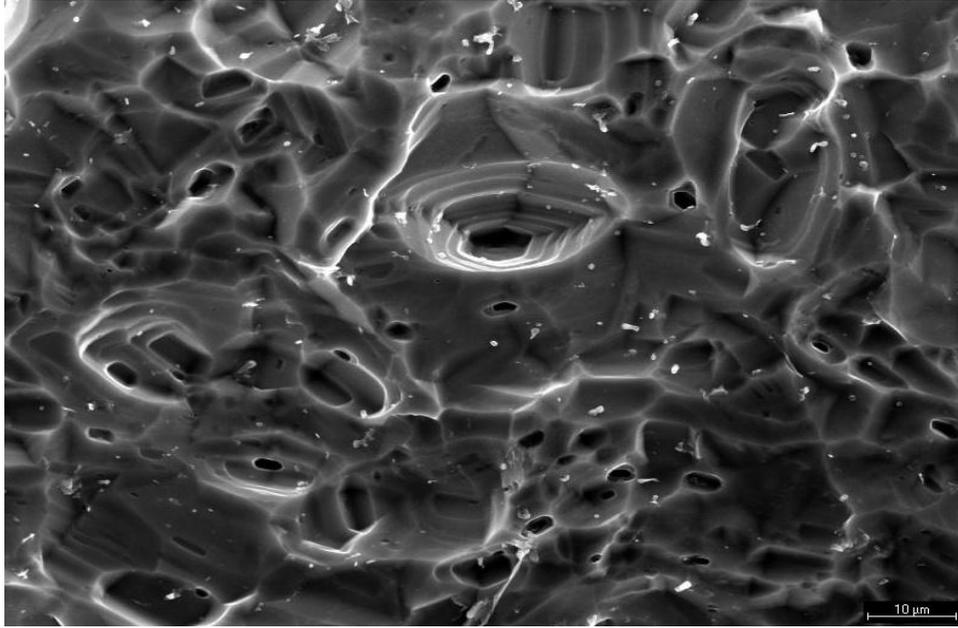


Fig.III.16: Imagen tridimensional observa la morfología de la superficie grabada 7 min con magnificación de 1000x del microscopio electrónico.

III.5. Química de la superficie

La caracterización química de las superficies se analizó sobre 3 discos de cada grupo de la muestra estudiada. Se utilizó el Espectrómetro de Fotoelectrones de Rayos-X Kratos Axis Ultra-DLD, compuesto de:

- Cámara de análisis con accesorio de calentamiento (hasta 600 °C) y enfriamiento (hasta-150 °C) de las muestras.
- Fuente de rayos-X de doble ánodo (Mg/Al). Potencia 450 W.
- Monocromador Al K α . Potencia 600 W.
- Manipulador de muestras automático de alta precisión (x, y, z, θ).
- Cámara de admisión de muestras.
- Analizador hemisférico de electrones conectado a un detector DLD (delay-line detector).
- Cañón de iones con entrada de gas integrada (Ar) para decapado y desbastado de superficies.
- Fuente de electrones para neutralización de cargas.
- Sistema de video-microscopio.
- Célula de reacción catalítica de alta temperatura.
- Sistema de generación y medida de ultra alto vacío (10⁻⁹ torr) compuesto de bomba turbomolecular (cámara de admisión) y bomba iónica con bomba de sublimación de

titanio (cámara de análisis).

- Computador y Software para adquisición y procesado de datos.

Photoelectron Spectroscopy X-ray (XPS) Permite el análisis de una región de la muestra ($300\ \mu\text{m} \times 700\ \mu\text{m}$) o de un punto determinado ($110\ \mu\text{m}$, $55\ \mu\text{m}$, $27\ \mu\text{m}$ o $15\ \mu\text{m}$ de diámetro). El equipo dispone de un cañón de iones que permite combinar su elevada sensibilidad superficial con el ataque iónico (ion-etching), de manera que se obtiene la composición química en función de la profundidad (depth profiles).

La técnica ARXPS (Angle-Resolved XPS) permite analizar la composición superficial de una muestra con resolución angular.

El modo map permite obtener mapas superficiales rastreando una energía determinada.

Esta técnica Identifica todos los elementos presentes en las superficies (excepto H y He). Determinación cuantitativa de la composición elemental de la superficie.



Fig.III.17. Espectrómetro de Fotoelectrones de Rayos-X Kratos Axis Ultra-DLD

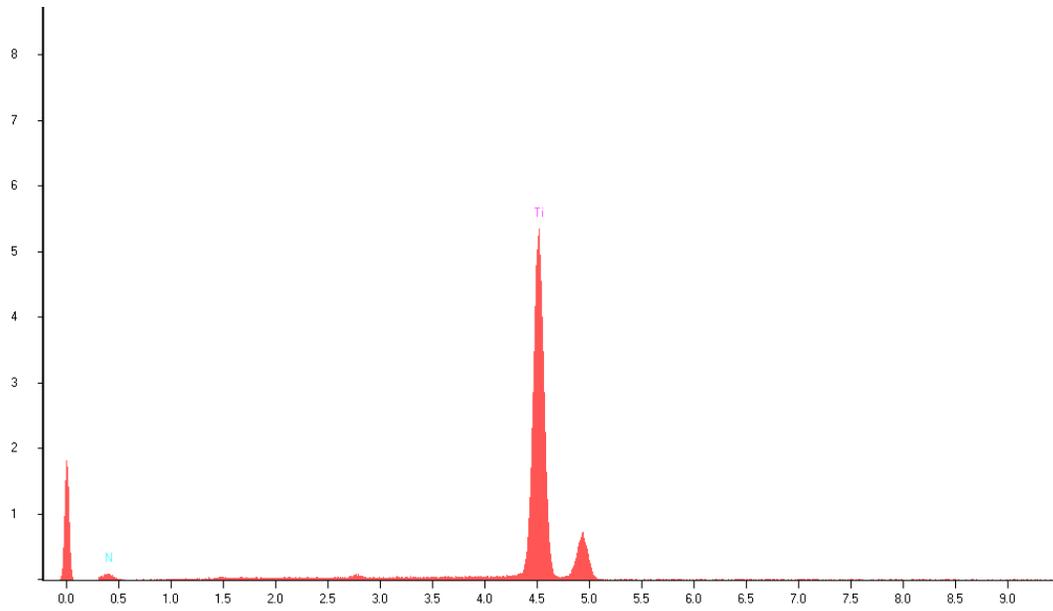


Fig.III.18: El porcentaje de Los elementos en la superficie grabada según los análisis químicos del microscopio electrónico.

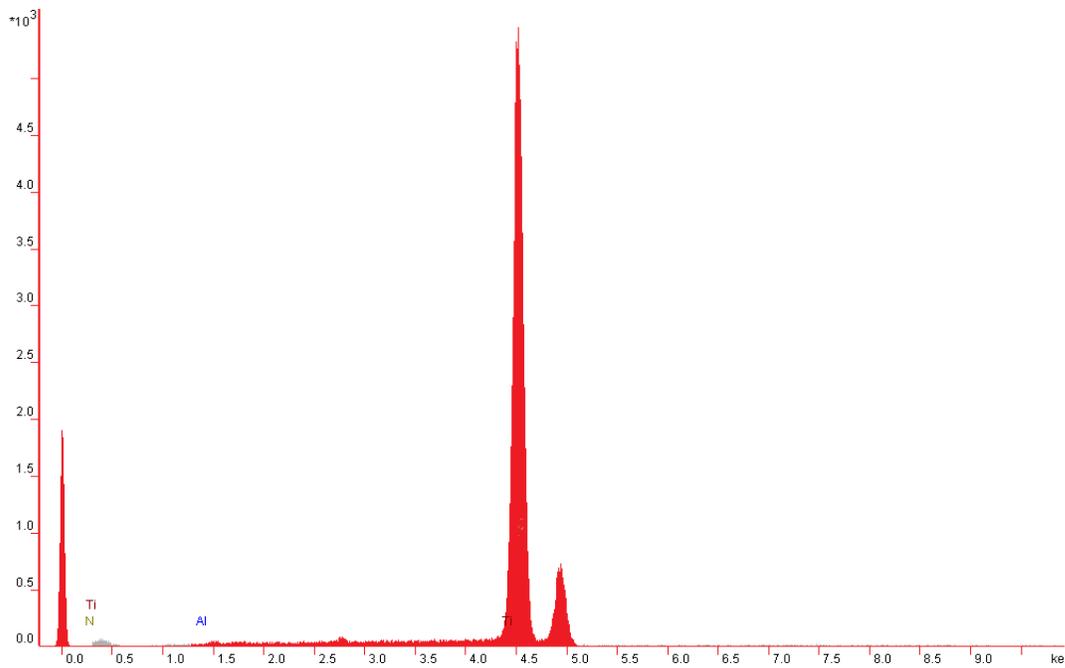


Fig.III.19: El porcentaje de Los elementos en la superficie lisa según los análisis químicos del microscopio electrónico.

III.6. Medida del ángulo de contacto θ

Se utilizó el método (Axisimetric Drop Shape Análisis-Profile) ADSA-P (gota, burbuja) en la medida de la humectabilidad de las superficies del titanio con agua destilada, sacando el ángulo de avance de la gota y retroceso de la burbuja.

Para la planificación del método ADSA-P y el procesamiento de las gotas y las burbujas, se ha utilizado un instrumento que consta de varios elementos. En la (figura I.19) se muestra un esquema del dispositivo para la técnica ADSA-P del laboratorio de Física aplicada de la Universidad de Granada.

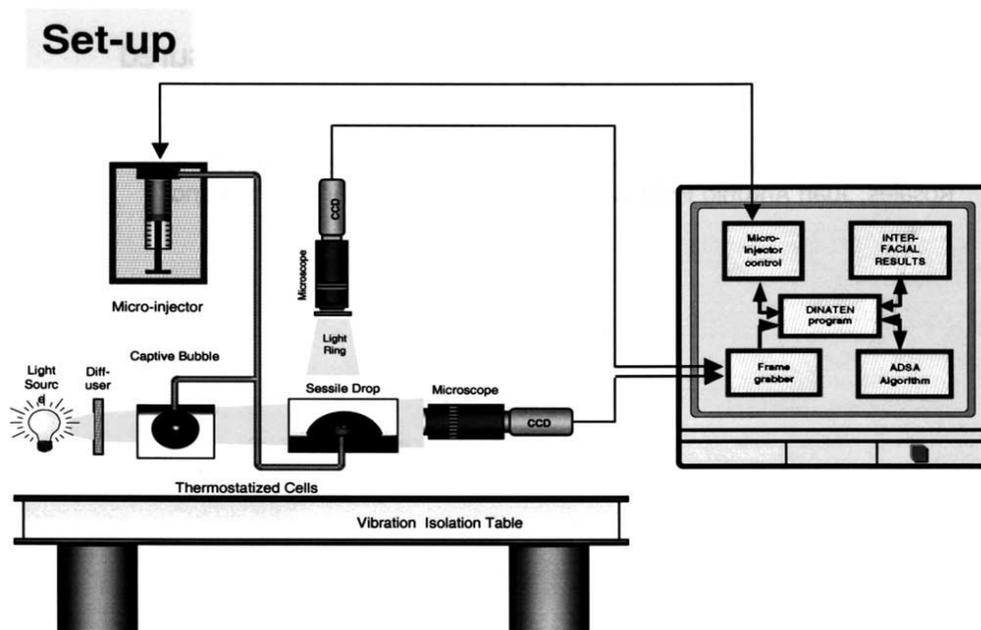


Fig.III.6. Esquema del dispositivo utilizado para medir el ángulo de contacto de una gota sésil con la técnica ADSA-P.

1º Mesa antivibratoria (Fig 3.6). 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 apoyado 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 video. 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 (Graticules 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 experiencia 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° Programas informáticos 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.

10° Instrumental para depósito y creación de las gotas y las burbujas. 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 un inyector conectado con un almacén y este almacén se llena agua en el caso de la gota, y se queda vacía en el caso de la burbuja.

Tres discos de cada tiempo fueron preparados para realizar esta medida haciendo un agujero en el centro de los discos (la medida del agujero es 1 mm), se hizo dos medidas para cada, una para obtener el ángulo de avance de la gota y la otra para obtener el ángulo de retroceso de la burbuja.

El proceso de obtención de las medidas interfaciales con la técnica ADSA-P 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 o burbuja) 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.

4° Visualización de la (gota o burbuja). Se visualiza la imagen de la (gota o burbuja) 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 del ángulo de contacto.

Mediante la técnica ADSA y con las coordenadas físicas de la gota se calcula el ángulo de contacto.

III.6.1. Ángulo de contacto de avance

El protocolo de trabajo utilizado para obtener medidas precisas de los parámetros interfaciales en el caso de la gota fue 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 la medida.

5) Se coloca el disco a analizar encima del microposicionador después pegar lo a un bloque preparada para recibirlo.

6) Se inyecta una gota inicial de 10 μl Se captura la imagen utilizando el programa Dina Ten teniendo en cuenta que la imagen debe estar bien enfocada y contrastada.

7) Se guarda la imagen y después se abre con el programa para apuntar la referencia de las dimensiones de la gota.

8) Se inyecta la IRS y mientras el programa automáticamente se captura cada 1 segundo y salen las medidas directamente.

9) Se guarda los datos y se encarga el programa del análisis y obtención de medidas sobre las imágenes capturadas de perfil lateral.

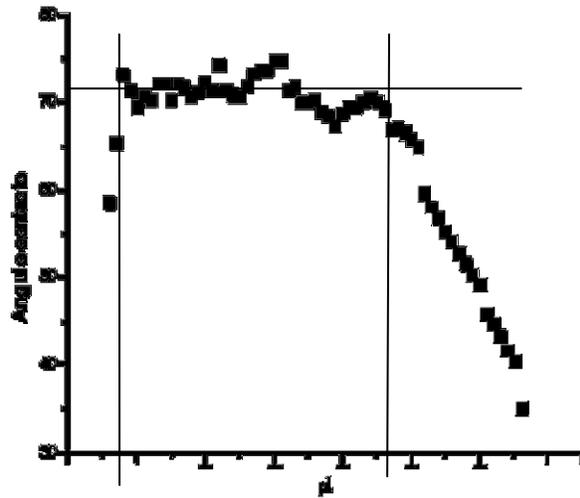


Fig.III.7: El ángulo de contacto del avance de la gota de cada imagen capturada de las superficies pulidas.

Para obtener el ángulo de avance de la gota se calcula la media de los valores desde el principio hasta que empieza el ángulo bajar en función del tiempo (los valores existen entre las barras en la Fig.III.7).

III.6.2.Ángulo de contacto de retroceso de la burbuja cautiva

El protocolo de trabajo utilizado para obtener medidas precisas de los parámetros interfaciales en el caso de la burbuja fue 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 la medida.

5) Se pone el bloque con el disco pegado en un cubo transparente lleno de agua.

6) Se inyecta una burbuja inicial de 10 μm Se captura la imagen utilizando el programa Dina Ten teniendo en cuenta que la imagen debe estar enfocada y contrastada.

7) Se guarda la imagen y después se abre con el programa para apuntar la referencia de las dimensiones de la burbuja.

8) Se inyecta la IRS y mientras el programa automáticamente se captura cada 1 segundo y salen las medidas directamente.

9) Se guarda los datos y después se encarga el programa del análisis y obtención de medidas sobre las imágenes capturadas de perfil lateral.

El ángulo de retroceso de la burbuja se calcula la media de los valores desde el principio hasta que empieza el ángulo subir en función del tiempo (los valores existen entre las barras Fig.III.8),

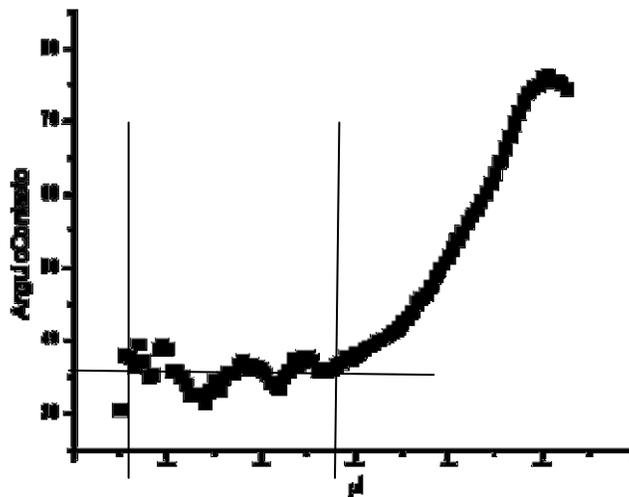


Fig.III.8: El ángulo de contacto del retroceso de la burbuja de cada imagen capturada de las superficies tratadas por 3 minutos.

La media de los ángulos de avance y retroceso obtenidos se utilizó para calcular el ángulo Young como en la siguiente fórmula (Morra M et al,1990):

$$\cos\theta_{app} = R_w \cos\theta_y$$

donde R_w es la proporción de la área real al aparente de la superficie (Wenzel RN, 1936).

III.7. La disolución del Ti

Para evaluar el efecto del tratamiento aplicado en el porcentaje de peso perdido del titanio de la masa principal, se tomaron tres discos lisos y después de pesarlos utilizando una balanza ultra sensible se grabaron durante 2min con HF y se pasivaron en un ataque químico con una disolución de ácido nítrico (Banreac) al 30% durante 3 min, finalmente, todos los discos se lavaron en ultrasonidos con acetona (Banreac) al 70% durante 20 min y se secaron en estufa a 37° durante 24h, y sucesivamente se lavaron en agua destilada por 30 min y secaron en estufa a 37° durante 24h; y después se tomó el peso (este proceso se repitió después de cada grabación ácida).

Después se grabó la muestra 1min más para llegar a 3min de grabación (pasivado y peso).

Se grabó la muestra 2min más para llegar a 5min de grabación (pasivado y peso).

Se grabó la muestra 2min más para llegar a 7min de grabación (pasivado y peso).

Se grabó la muestra 3min más para llegar a 10min de grabación (pasivado y peso).

Se calculó el porcentaje del peso perdido con respecto a la masa principal.

III.8. Respuesta celular

Cuatro discos de cada grupo fueron sumergidos in osteoblastos MG-63 del banco de la células en el Centro de instrumentación científica de la universidad de Granada, .

Medio de cultivo: EMEM con BSS de Earle + 2 mM GLUTAMINA modificado conteniendo: 1.0 mM piruvato sódico, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (NEAA), 1.5 g/L de bicarbonato sódico y suplementado con 10% Suero bovino fetal inactivado. Este medio está formulado para su uso en atmósfera con 5% de CO₂.

Procedimiento de subcultivo: Dividir los cultivos confluentes sembrando a 1:4 hasta 1:8 a una densidad de 1-3x10000células/cm² usando tripsina/EDTA, 0.25%, 0.03%

respectivamente. Se incuban a 37 C y 5% de CO₂. El medio debe renovarse cada 2-3 días.

III. 8.1. El cultivo 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 2x10⁵ 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 estudiadas. Posteriormente, las placas se incuban a 37° C en atmósfera de CO₂ (5%), Los discos son recogidos a 24 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 triplicado.

Los resultados se han expresado en n° células/ml.

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 múltiples 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 confianza al 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.

III.8.2. Morfología celular

El cuarto disco de cada serie se utilizó para evaluar la morfología. Después del período de incubación de 24 horas, el medio de cultivo se retiró y se trató el disco con 4% glutaraldehído (Agar Scientific, Reino Unido) en PBS (pH 7,2) durante 20 minutos para fijar las células, seguido de deshidratación en alcoholes graduados, inmersión durante 10 min en hexametildisilazano, secado al aire, revestimiento con paladio de oro, y se visualizaron por medio de microscopio electrónico de barrido (Leo 1430-VP, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Las muestras fueron fotografiadas en formato digital, empleando la mayor resolución posible (300dpi) en extensión tif.

IV. Resultados

IV.1. Disolucion del Ti

Analizando los datos conseguidos de las medidas del peso después de cada grabación acida corresponde con el tratamiento aplicado, se encontró que hay una relación directa entre el tiempo de grabado y el porcentaje del peso perdido (Tab.IV.I) y (Fig.IV.1).

Tab.IV.1. Disolucion del Ti en masa y altura					
Tiempo de grabado min	2	3	5	7	10
Disolucion de masa (%) μg	0.021 (0.004)a	0.042 (0.005)b	0.061 (0.006)c	0.093 (0.004)d	0.123 (0.005)e
Disolucion de altura(%) μm	0.007 (0.002) a	0.012 (0.003)b	0.015 (0.005)b	0.065 (0.002)c	0.085 (0.006)d

Los valores con la misma letra son estadísticamente similares ($P>0,05$). DE: Desviación estándar.

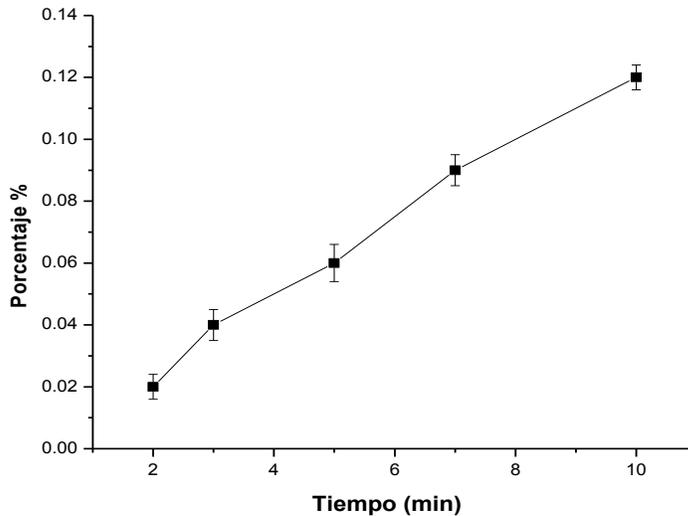


Fig.IV.1. El porcentaje del peso perdido en función del tiempo de grabado.

IV.2. Topografía

IV.2.1. Rugosidad

En este apartado se muestran los parámetros de rugosidad obtenidos (Ra, Rq, Rp, Rv, Rt, Rsk, Rku) con el Microscopio confocal utilizando los 5 objetivos x100, x200, x500, x1000, x1500, cada uno de los parámetros tuvo sus propias modificaciones depende al tiempo de grabado y el objetivo utilizado.

La rugosidad Ra se muestra en las tablas (IV.2.1/ IV.2.2/ IV.2.3/ IV.2.4/ IV.2.5) y en la grafica IV.2.1 donde a x100 se observa que se produce un incremento progresivo en función del tiempo de grabado. Este incremento se estabiliza a los 5 min, obteniendo valores similares a los 5 y 7min. A x200 y x500 se observa la misma tendencia descrita, el efecto producido por el grabado acido es similar. La rugosidad se incrementa hasta los 5min, y lo mismo por x1000 y x1500.

La rugosidad Ra fue diferente en función del aumento observado, los valores fueron mayor cuanto menor fue el aumento del objetivo utilizado. La rugosidad más baja se observó a x1000 y x1500, siendo los valores similares, y la rugosidad más alta se observó a x100, bajo los aumentos x200 y x500 los valores fueron más bajos que a x100 pero similares entre ellos.

La rugosidad Rp se muestra en las tablas (IV.2.1/ IV.2.2/ IV.2.3/ IV.2.4/ IV.2.5) y en la grafica IV.2.2 donde a x100 se observa que se produce un incremento progresivo entre el control y la muestra grabada. Este incremento se estabiliza obteniendo valores similares a los 3, 5 y 10min y un valor máximo a los 7min. A x200 se observa que se produce un incremento progresivo en función del tiempo de grabado hasta los 3min donde estabiliza el incremento obteniendo valores similares. A x500, x1000, x1500 se observa incremento entre el control y la muestra grabada, pero no se nota cambio en Rp en la muestra grabada obteniendo valores similares.

La rugosidad Rp fue diferente en función del aumento observado, los valores fueron mayor cuanto menor fue el aumento del objetivo utilizado. La rugosidad más baja se observó a x500, x1000 y x1500, siendo los valores similares, y la rugosidad más alta se observó a x100, bajo los aumentos x200 los valores fueron más bajos que a x100.

La rugosidad R_q se muestra en las tablas (IV.2.1/ IV.2.2/ IV.2.3/ IV.2.4/ IV.2.5) y en la grafica IV.2.3 donde a x100 se observa que se produce un incremento progresivo en función del tiempo de grabado, obteniendo valores similares a los 2 y 3min, y a los 5 y 7min. A x200 y x500 el efecto producido por el grabado acido es similar. La rugosidad se incrementa hasta los 5min, a x1000 y x1500 se observa la misma tendencia descrita.

La rugosidad R_q fue diferente en función del aumento observado, los valores fueron mayor cuanto menor fue el aumento del objetivo utilizado. La rugosidad más baja se observó a x1000 y x1500, siendo los valores similares, y la rugosidad más alta se observó a x100, bajo los aumentos x200 y x500 los valores fueron más bajos que a x100 pero similares entre ellos.

La rugosidad R_v se muestra en las tablas (IV.2.1/ IV.2.2/ IV.2.3/ IV.2.4/ IV.2.5) y en la grafica IV.2.4 donde a x100 se observa que se produce un decremento progresivo en función del tiempo de grabado. Este decremento se estabiliza a los 5 min, obteniendo valores similares a los 5, 7 y 10min. A x200 se observa la misma tendencia descrita, el efecto producido por el grabado acido es similar. La rugosidad se incrementa hasta los 5min, a x500, x1000 y x1500 se observó un decremento entre el control y la muestra grabada, pero no se nota cambio en función del tiempo en la muestra grabada obteniendo valores similares.

La rugosidad R_v fue diferente en función del aumento observado, los valores fueron menor cuanto mayor fue el aumento del objetivo utilizado. La rugosidad más alta se observó a x500, x1000 y x1500, siendo los valores similares, y la rugosidad más baja se observó a x100, bajo los aumentos x200 los valores fueron más altos que a x100.

La rugosidad R_t se muestra en las tablas (IV.2.1/ IV.2.2/ IV.2.3/ IV.2.4/ IV.2.5) y en la grafica IV.2.5 donde a x100 se observa que se produce un incremento progresivo en función del tiempo de grabado. Este incremento se estabiliza a los 5 min, obteniendo valores similares a los 5, 7 y 10min. A x200 se observa la misma tendencia descrita, el efecto producido por el grabado acido es similar. La rugosidad se incrementa hasta los 5min, a x500, x1000 y x1500 se observó un incremento entre el control y la muestra grabada, pero no se nota cambio en función del tiempo en la muestra grabada obteniendo valores similares.

La rugosidad R_t fue diferente en función del aumento observado, los valores fueron mayor cuanto menor fue el aumento del objetivo utilizado. La rugosidad más baja se observó a x500, x1000 y x1500, siendo los valores similares, y la rugosidad más alta se observó a x100, bajo los aumentos x200 los valores fueron más bajos que a x100.

La rugosidad R_{sk} se muestra en las tablas (IV.2.1/ IV.2.2/ IV.2.3/ IV.2.4/ IV.2.5) y en la grafica IV.2.6 donde se nota que la R_{sk} es mayor de cero (positiva), salvo cuando utilizamos el objetivo x500 y el objetivo x200 en los tres últimos grupos (grabado por 5,7,10 min) donde fue negativo.

La rugosidad R_{sk} fue diferente en función del aumento observado. El valor más alto de R_{sk} fue a los 2min utilizando el objetivo x100, y el valor más bajo fue a los 2min utilizando el objetivo x500.

La rugosidad R_{ku} se muestra en las tablas (IV.2.1/ IV.2.2/ IV.2.3/ IV.2.4/ IV.2.5) y en la grafica IV.2.7 donde a x100 se observó un incremento significativo entre el control y el grupo 1 (grabado por 2min) donde marca su valor máximo, después empieza a bajar hasta los 5min donde estabiliza obteniendo valores similares en 5, 7 y 10min, A x200, x500, x1000 y x1500 se observa la misma tendencia descrita, el efecto producido por el grabado acido es similar.

La rugosidad R_{ku} fue diferente en función del aumento observado, los valores fueron mayor cuanto menor fue el aumento del objetivo utilizado. La rugosidad más baja se observó a x200, x500, x1000 y x1500, siendo los valores similares, y la rugosidad más alta se observó a x100. La rugosidad R_{ku} fue siempre ≥ 3 , salvo a los 10min utilizando el objetivo x1500.

Los datos de rugosidad se muestran en las tablas: (IV.2.1/ IV.2.2/ IV.2.3/ IV.2.4/ IV.2.5), y en las graficas (IV.2.1/ IV.2.2/ IV.2.3/ IV.2.4/ IV.2.5/ IV.2.6/ IV.2.7) se muestran graficas de cada uno de los parámetros de rugosidad

Tabla IV.2.1. Parámetros de rugosidad obtenidos en área (58x43 μm^2) en los distintos tiempos de grabado [media (DE)]							
Tiempo	Ra	Rq	Rp	Rv	Rt	Rsk	Rku
0	2.0 (0.2) a	2.5 (0.2) a	14.0 (0.2) a	-15.4 (0.1) a	29.5 (0.3) a	0.06 (0.01) a	2.2 (0.4) a
2	4 (2) b	6 (2) b	64 (16) b	-41 (13) a	101 (14) b	1.2 (0.8) b	11(7) b
3	5 (2) b	6 (2) b	72 (5) c	-46 (10) b	113 (10) b	2.2 (0.8) c	16 (6) b
5	6 (1) c	8 (1) c	70 (2) c	-57 (4) c	127 (19) c	0.8 (0.4) b	7 (2) c
7	7 (1) c	9 (1) c	82 (8) d	-57 (8) c	139 (10) c	0.9 (0.5) b	8 (2) c
10	8 (2) c	11 (2) d	65 (10) b	-62 (12) c	128 (17) c	0.5 (0.3) d	5 (2) c
Los valores con la misma letra son estadísticamente similares ($P>0,05$). DE: Desviación estándar.							

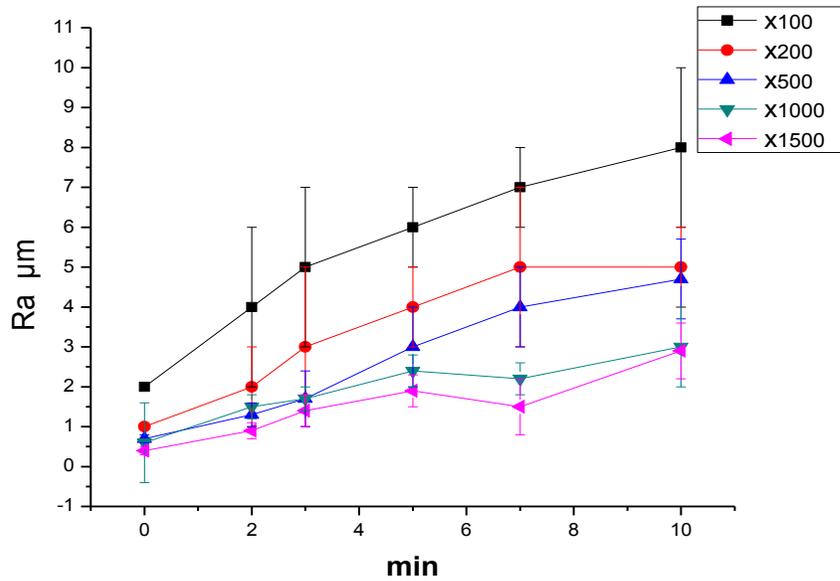
Tabla IV.2.2. Parámetros de rugosidad obtenidos en área (117x86 μm^2) en los distintos tiempos de grabado [media (DE)]							
Tiempo	Ra	Rq	Rp	Rv	Rt	Rsk	Rku
0	1.2 (0.1) a	1.8 (0.2) a	7.7 (0.1) a	-8.6 (0.2) a	16.3 (0.4) a	0.05 (0.02) a	2.0 (0.4) a
2	2 (1) b	3 (1) b	26 (5) b	-22 (4) b	49 (6) b	0.6 (0.6) b	7 (5) b
t3	3 (2) c	4 (2) c	34 (0.4) c	-25 (2) b	56 (6) c	0.9 (0.7) b	11 (6) c
5	4 (1) c	5 (1) c	36(5) d	-31(6) c	67 (9) d	-0.3 (0.4) c	5 (1) d
7	5 (2) d	6 (2) d	38 (8) d	-32 (5) c	70 (12) d	-0.4 (0.3) c	5 (2) d
10	5 (1) d	7 (1) d	36 (3) d	-28 (4) c	65 (6) d	-0.2 (0.3) c	3 (1) a
Los valores con la misma letra son estadísticamente similares ($P>0,05$). DE: Desviación estándar.							

Tabla IV.2.3. Parámetros de rugosidad obtenidos en área (292x214 μm^2) en los distintos tiempos de grabado [media (DE)]							
Tiempo	Ra	Rq	Rp	Rv	Rt	RSk	RKu
0	0.7 (0.1) a	0.9 (0.1) a	3.1 (0.1) a	-3.1 (0.1) a	6.2 (0.2) a	-0.01 (0.02)a	1.9 (0.2) a
2	1.3 (0.7) b	1.8 (0.7) b	8 (3) b	-13 (4) b	21 (4) b	-0.5 (0.5)b	7 (4) b
3	1.7 (0.2) b	2.2 (0.4) b	11 (2) c	-13 (3) b	24 (3) b	-1 (1) c	9 (4) b
5	3 (1) c	4 (1) c	11(2) c	-17 (4) c	28 (5) c	-0.6 (0.3)b	3.5 (0.9)c
7	3.9 (0.9) c	5 (1) d	13 (2) c	-16 (3) c	30 (4) c	-0.4 (0.3)b	3 (1) c
10	4.7 (0.8) d	6 (1) d	14 (3) c	-20 (3) d	34 (6) c	-0.5 (0.1)b	3.2 (0.4)c
Los valores con la misma letra son estadísticamente similares (P>0,05). DE: Desviación estándar.							

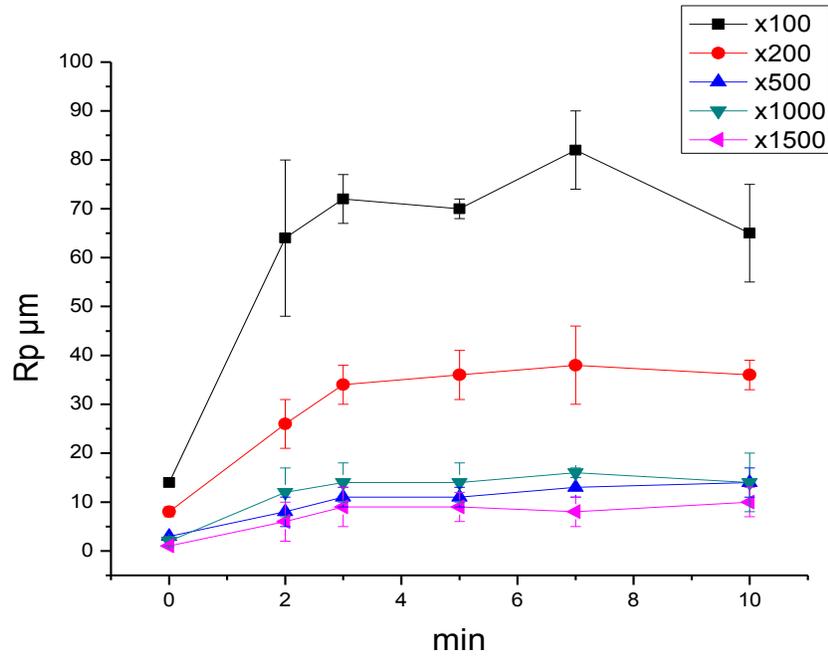
Tabla IV.2.4. Parámetros de rugosidad obtenidos en área (584x428 μm^2) en los distintos tiempos de grabado [media (DE)]							
Tiempo	Ra	Rq	Rp	Rv	Rt	Rsk	Rku
0	0.6 (0.1) a	0.8 (0.1) a	1.6 (0.2) a	-1.5 (0.2) a	3.2 (0.2) a	-0.01 (0.01)a	1.8 (0.3) a
2	1.5 (0.3) b	1.9 (0.3)b	12 (5) b	-13 (2) b	24 (6) b	-0.1 (0.9) b	7 (5) b
3	1.7 (0.3) b	2.4 (0.4)b	14 (4) b	-13 (2) b	27 (4) b	0.1 (0.5) b	6 (2) b
5	2.4 (0.4) c	3.0 (0.2) c	14 (4) b	-15 (3) c	29 (2) c	0.1 (0.2) b	3.6 (0.7)c
7	2.2 (0.4) c	3.0 (0.6) c	16.2 (0.5)b	-17 (2) c	33 (8) c	-0.2 (0.9) b	5 (2) b
10	3.4 (0.8) d	4 (1) c	14 (6) b	-16 (5) c	31 (8) c	0.2 (0.5) b	3.0 (0.6c
Los valores con la misma letra son estadísticamente similares (P>0,05). DE: Desviación estándar.							

Tabla IV.2.5: 1Parámetros de rugosidad obtenidos en área (776x642 μm^2) en los distintos tiempos de grabado [media (DE)]							
Tiempo	Ra	Rq	Rp	Rv	Rt	Rsk	Rku
0	0.4 (0.1) a	0.5 (0.2) a	0.9 (0.2) a	-0.8 (0.1) a	1.7 (0.2) a	-0.02 (0.01)a	1.7 (0.3) a
2	0.9 (0.2) b	1.3 (0.2) b	6 (4) b	-5 (1) b	12(4) b	-0.01 (1.18)a	6 (4) b
3	1.4 (0.4) c	1.8 (0.4) c	9 (4) c	-5 (2) b	12 (5) b	0.7 (0.7) b	6 (3) b
5	1.9 (0.4) d	2.4 (0.5) d	9 (3) c	-7 (2) b	17 (3) c	0.4 (0.4) b	3.5 (0.5)c
7	1.5 (0.7) c	1.9 (0.8) c	8 (3) c	-7 (3) b	19 (10) c	0.9 (0.9) b	6 (4) b
10	2.9 (0.7) e	4 (1) e	10 (3) c	-7 (3) b	16 (5) c	0.4 (0.4) b	2.5 (0.5) c

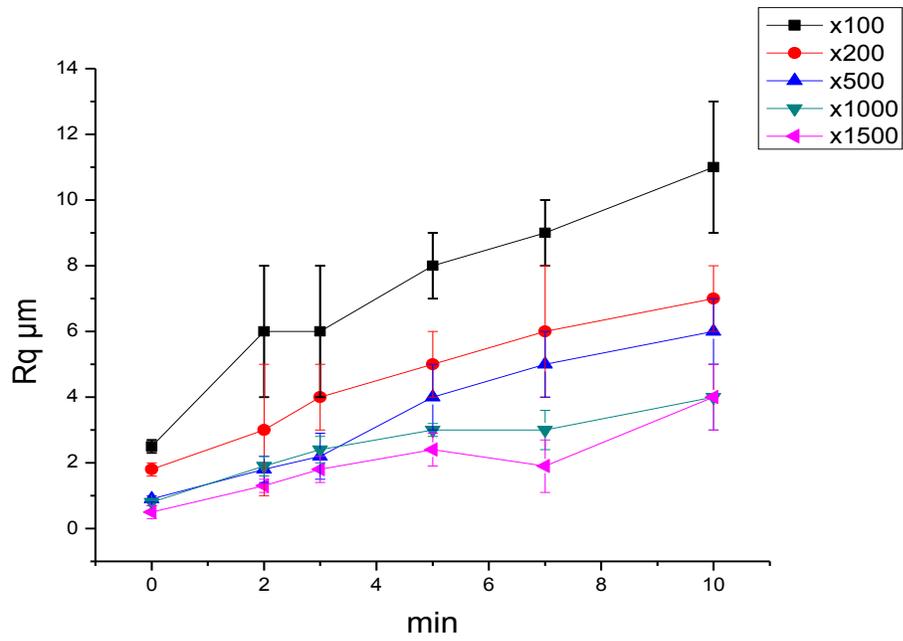
Los valores con la misma letra son estadísticamente similares ($P>0,05$). DE: Desviación estándar.



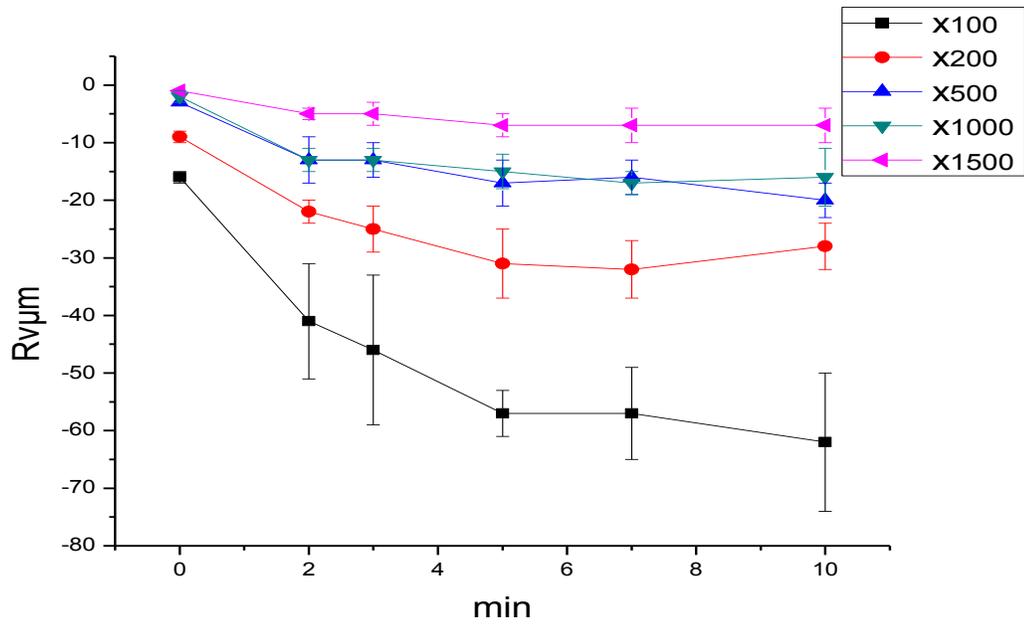
Gra IV.2.1: Rugosidad Ra de las superficies grabadas a distintos tiempo.



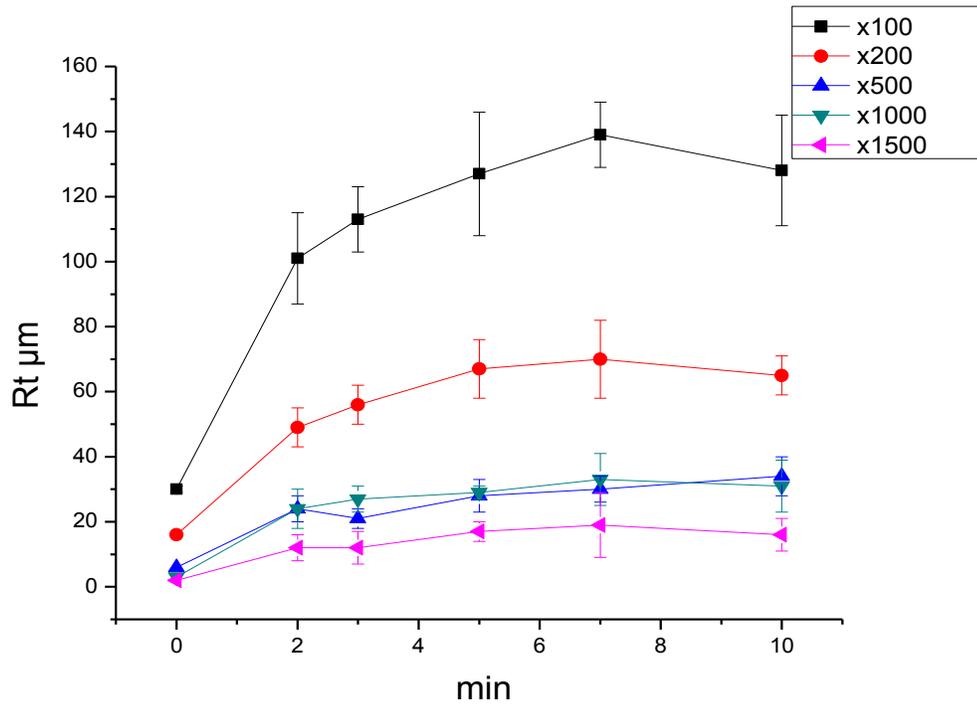
Gra IV.2.2: Rugosidad R_p de las superficies grabadas a distintos tiempo.



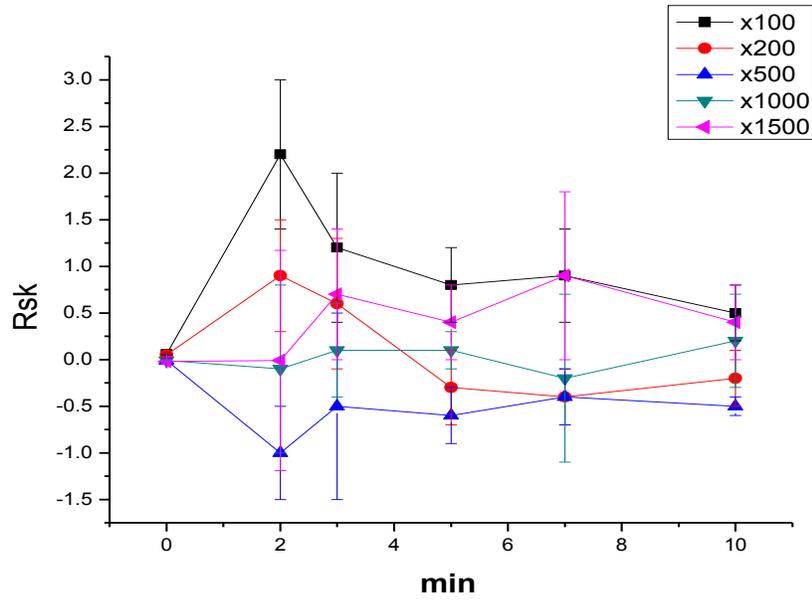
Gra IV.2.3: Rugosidad R_q de las superficies grabadas a distintos tiempo.



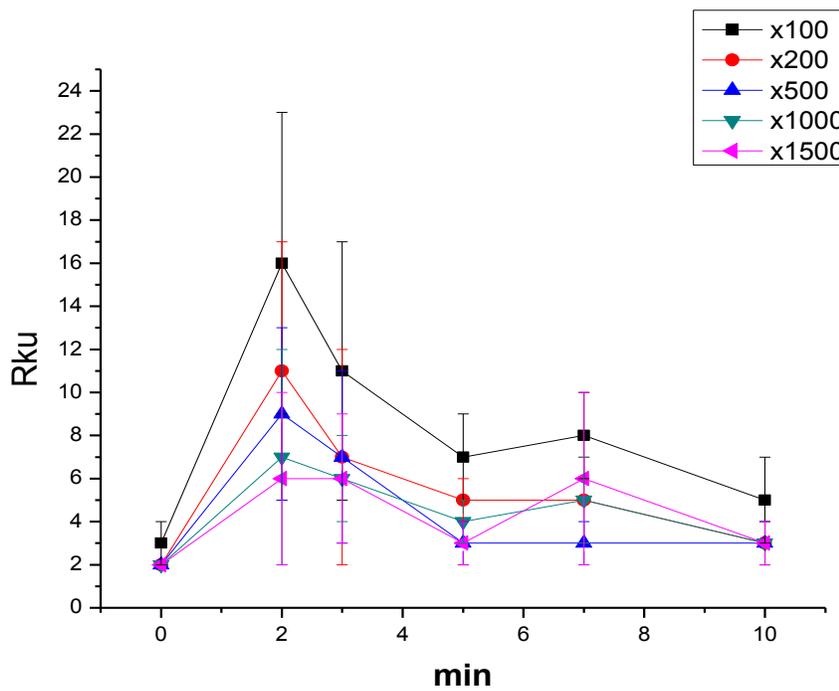
Gra IV.2.4: Rugosidad R_v de las superficies grabadas a distintos tiempo.



Gra IV.2.5: Rugosidad R_t de las superficies grabadas a distintos tiempo.



Gra IV.2.6: Rugosidad R_{sk} de las superficies grabadas a distintos tiempo.

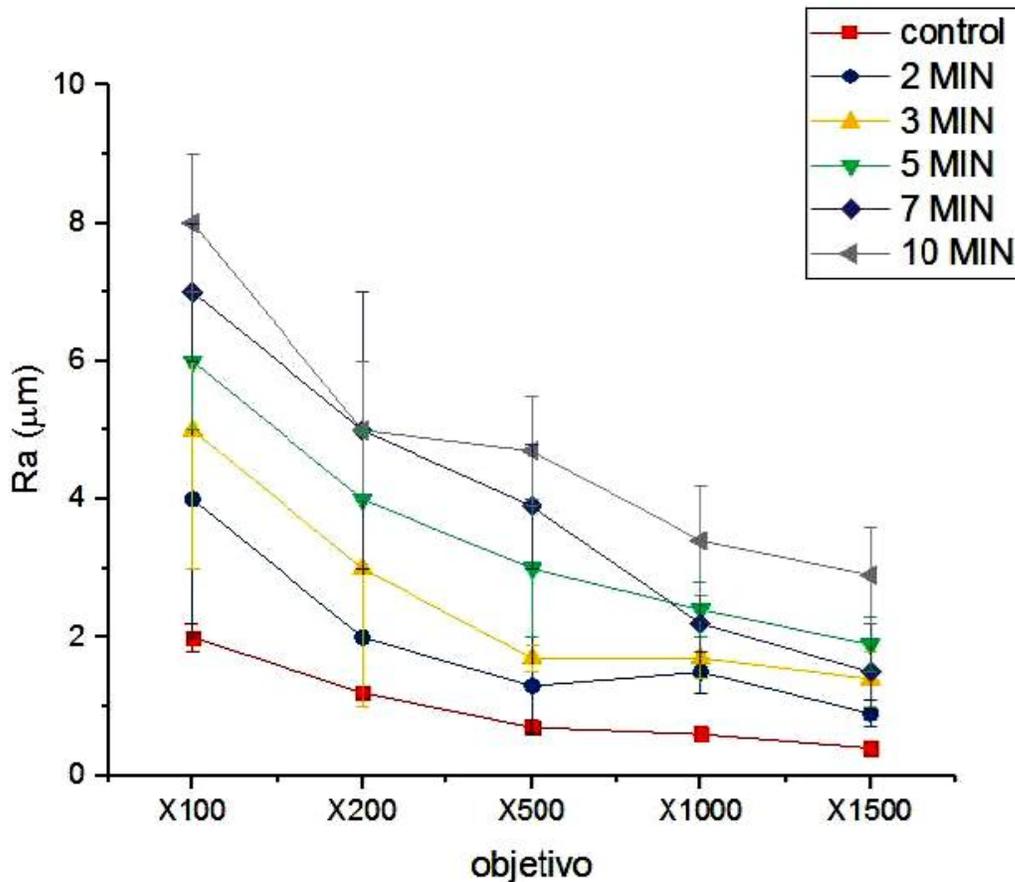


Gra.IV.2.7: Rugosidad R_{ku} de las superficies grabadas a distintos tiempo.

• Evaluar el efecto de la escala de medida

Utilizar varias escalas de medida (micra y sub-micra) demostró cambio en el valor de la rugosidad de la misma muestra, el valor mayor de Ra en cada muestra se registró con el objetivo X100 y el menor con el objetivo X1500, los valores obtenidos utilizando los objetivos X1000, X1500 son similares, también los valores obtenidos utilizando los objetivos X200, X500 son similares, el cambio mayor siempre se registró utilizando el objetivo X100.

Cuanto más lisa es la superficie menos diferencia hay en las diferentes escalas, y cuando mayor es la rugosidad encontró más diferencia entre las escalas, como en la siguiente grafica (Gra.IV.2.8).



Gra.IV.2.8. El cambio de la rugosidad Ra al respecto a la escala de medida.

IV.2.2. Morfología

- **Morfología con la microscopia confocal de luz blanca**

Los resultados morfológicos del microscopio confocal se encuentran en las figuras IV.2.1 a IV.2.10 con imágenes tridimensional y bidimensional. El tiempo de grabado influyó en la morfología de las áreas escaneadas, se encontró un cambio significativo entre el control y las superficies grabadas, donde el control se presenta una superficie lisa con la presencia de irregularidad por su estructura cristalina.

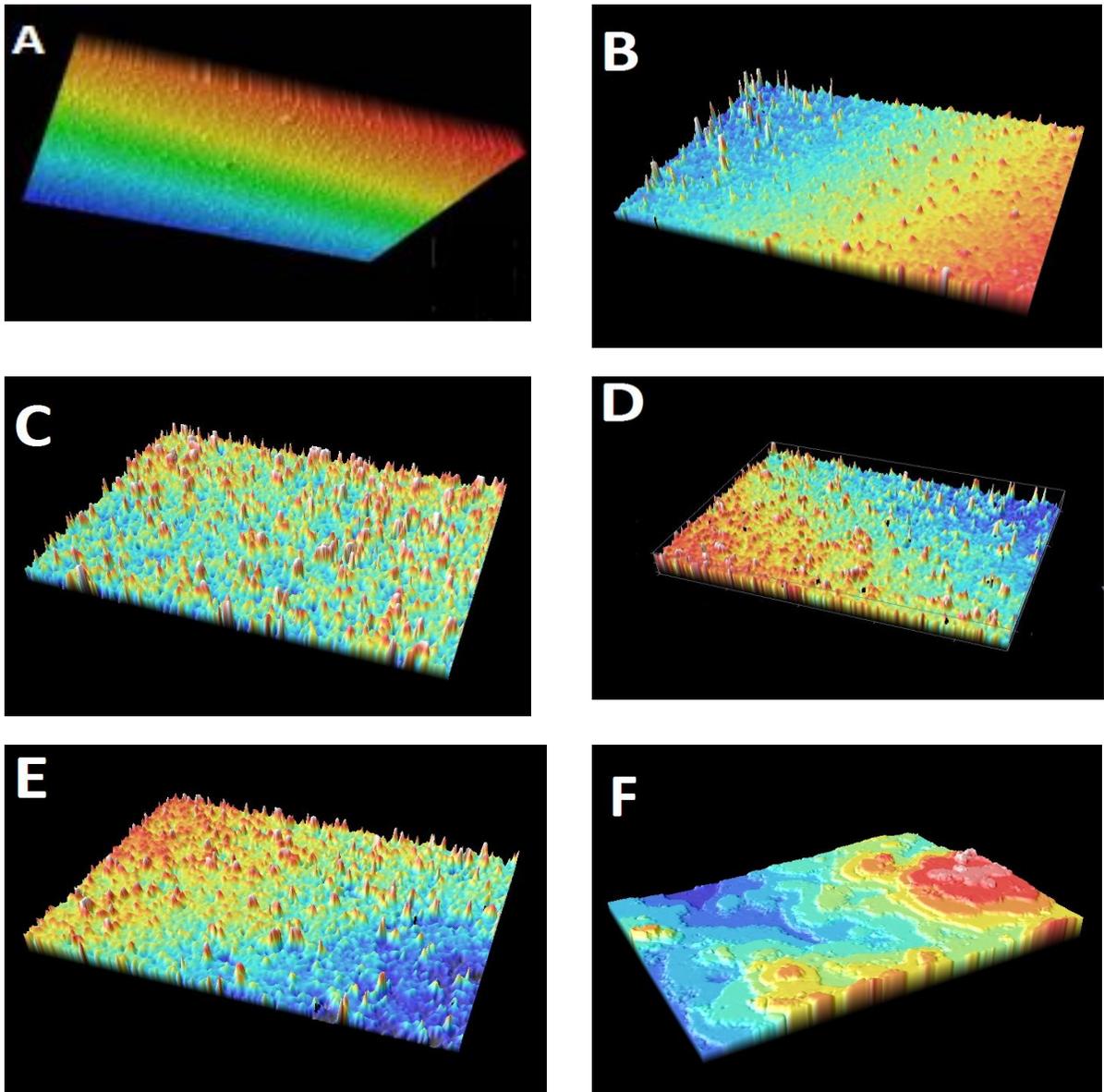


Fig. IV.2.1. Imágenes de microscopia confocal de las superficies de Ti grabadas a distintos tiempos (área escaneada $58 \times 43 \mu\text{m}^2$)

A: control, B: 2min, C: 3min, D: 5min, E: 7min, F: 10min

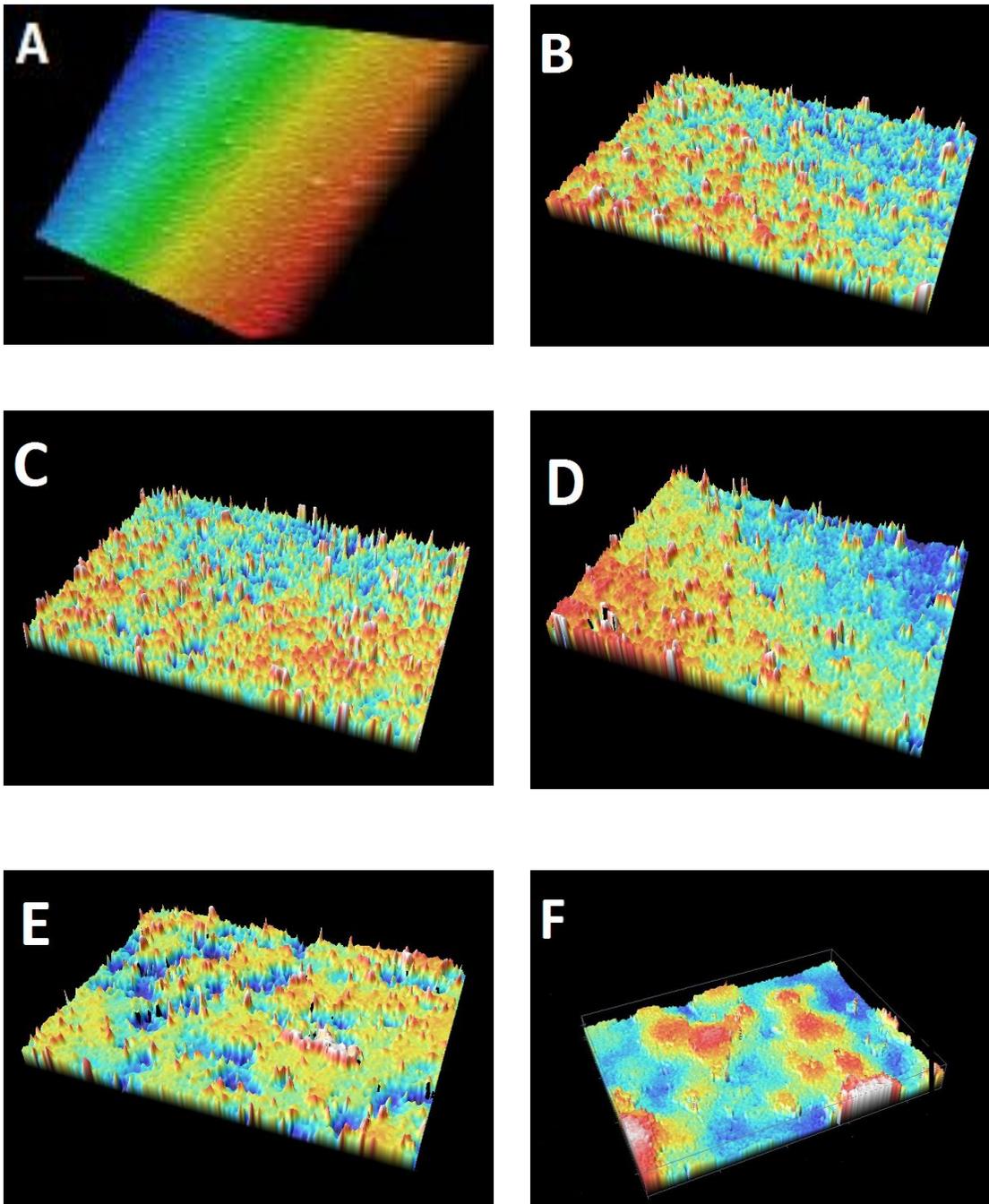


Fig. IV.2.2. Imágenes de microscopia confocal de las superficies de Ti grabadas a distintos tiempos (área escaneada $117 \times 86 \mu\text{m}^2$).
A: control, B: 2min, C: 3min, D: 5min, E: 7min, F: 10min

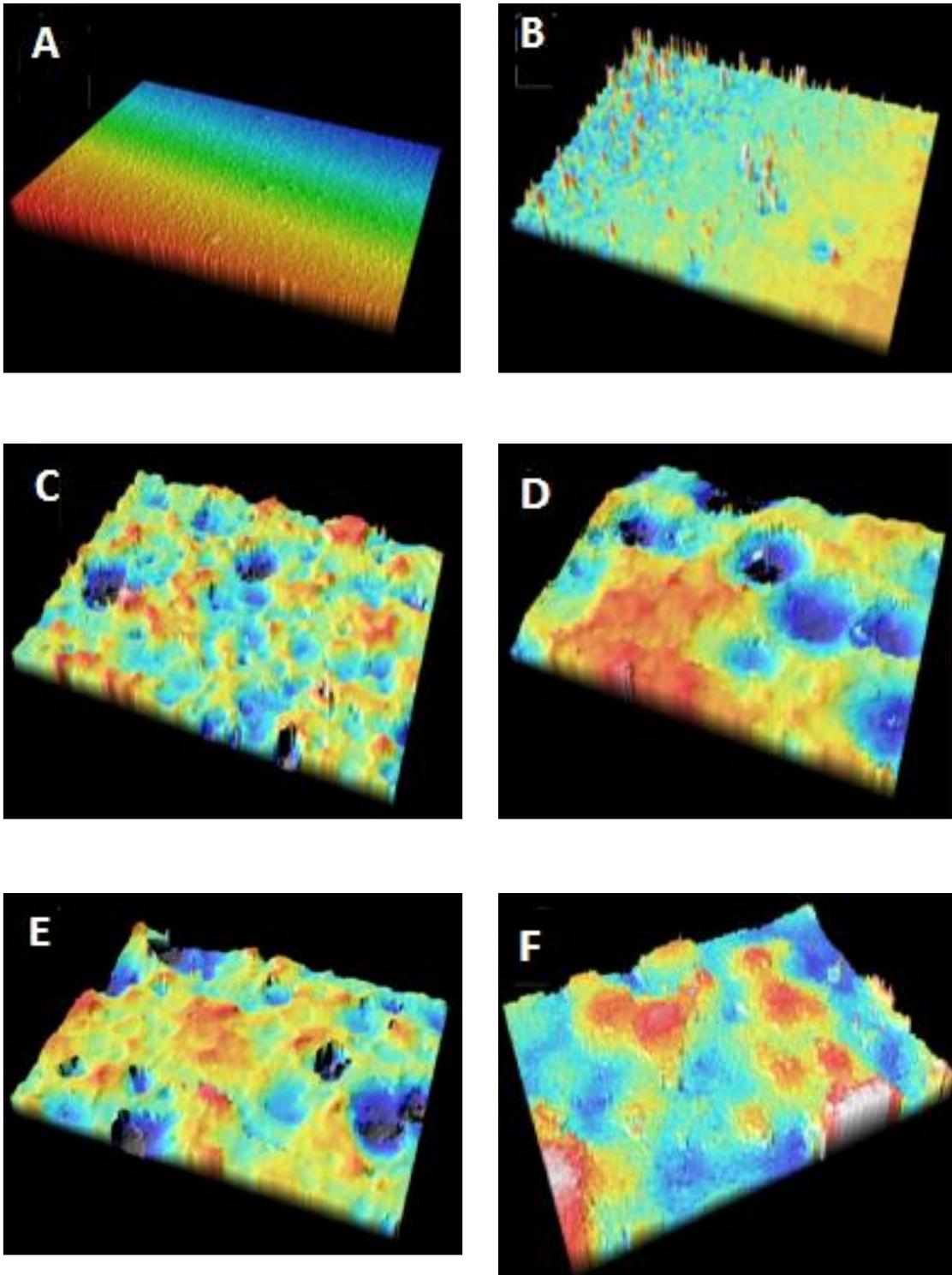


Fig. IV.2.3. Imágenes de microscopia confocal de las superficies de Ti grabadas a distintos tiempos (área escaneada $292 \times 214 \mu\text{m}^2$)

A: control, B: 2min, C: 3min, D: 5min, E: 7min, F: 10min

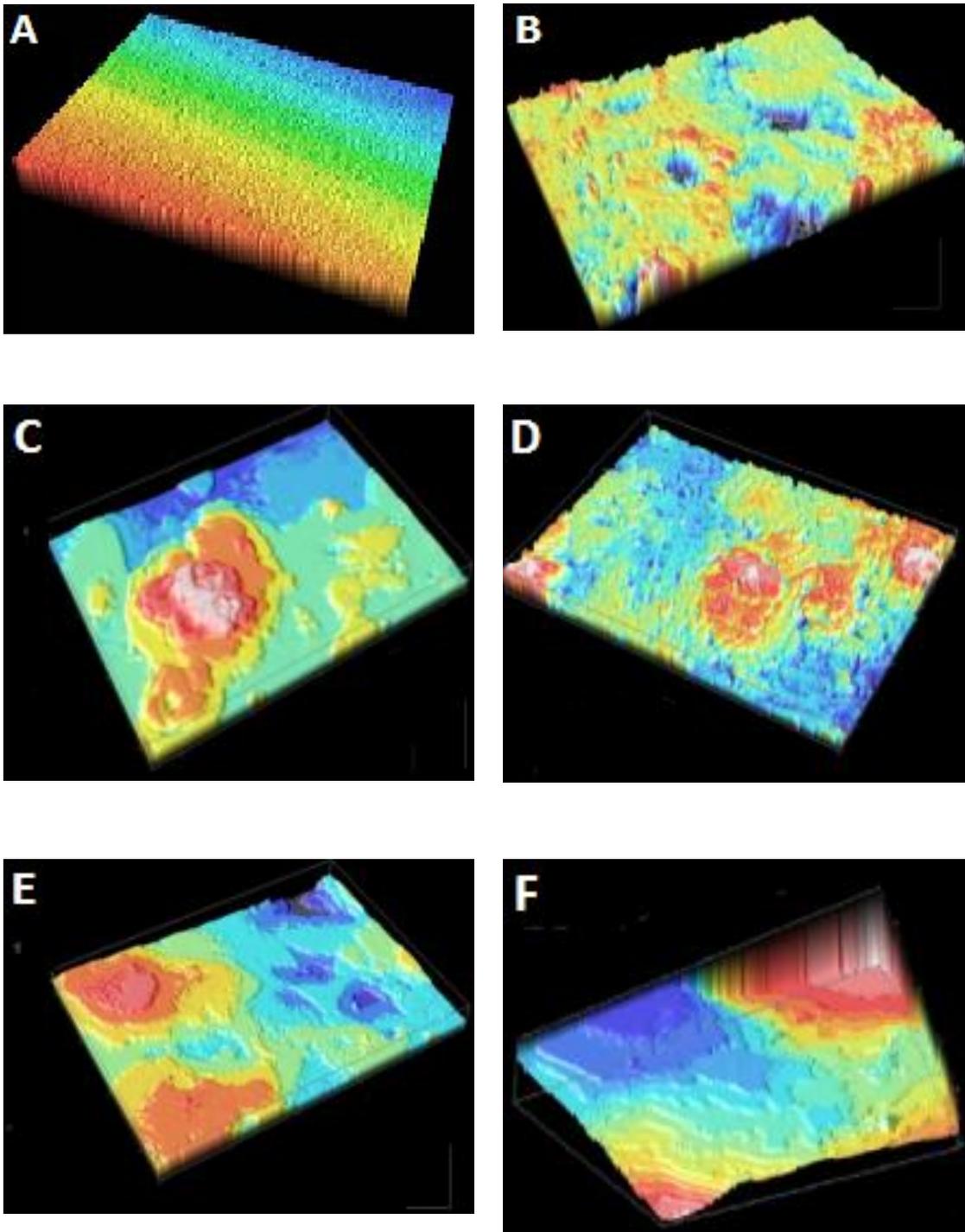


Fig. IV.2.4. Imágenes de microscopia confocal de las superficies de Ti grabadas a distintos tiempos (área escaneada $584 \times 428 \mu\text{m}^2$)
A: control, B: 2min, C: 3min, D: 5min, E: 7min, F: 10min

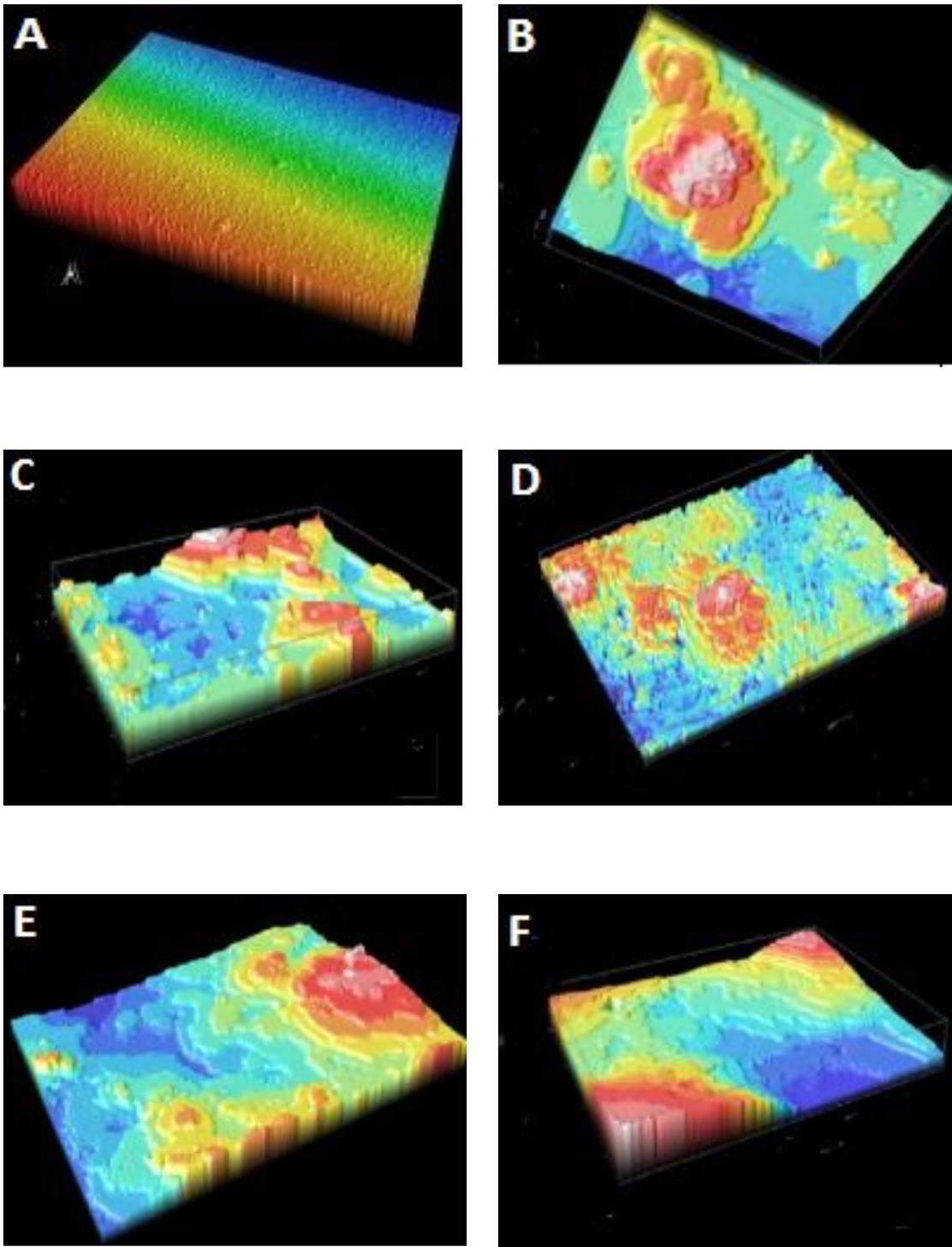


Fig. IV.2.5. Imágenes de microscopia confocal de las superficies de Ti grabadas a distintos tiempos (área escaneada $776 \times 642 \mu\text{m}^2$)
A: control, B: 2min, C: 3min, D: 5min, E: 7min, F: 10min

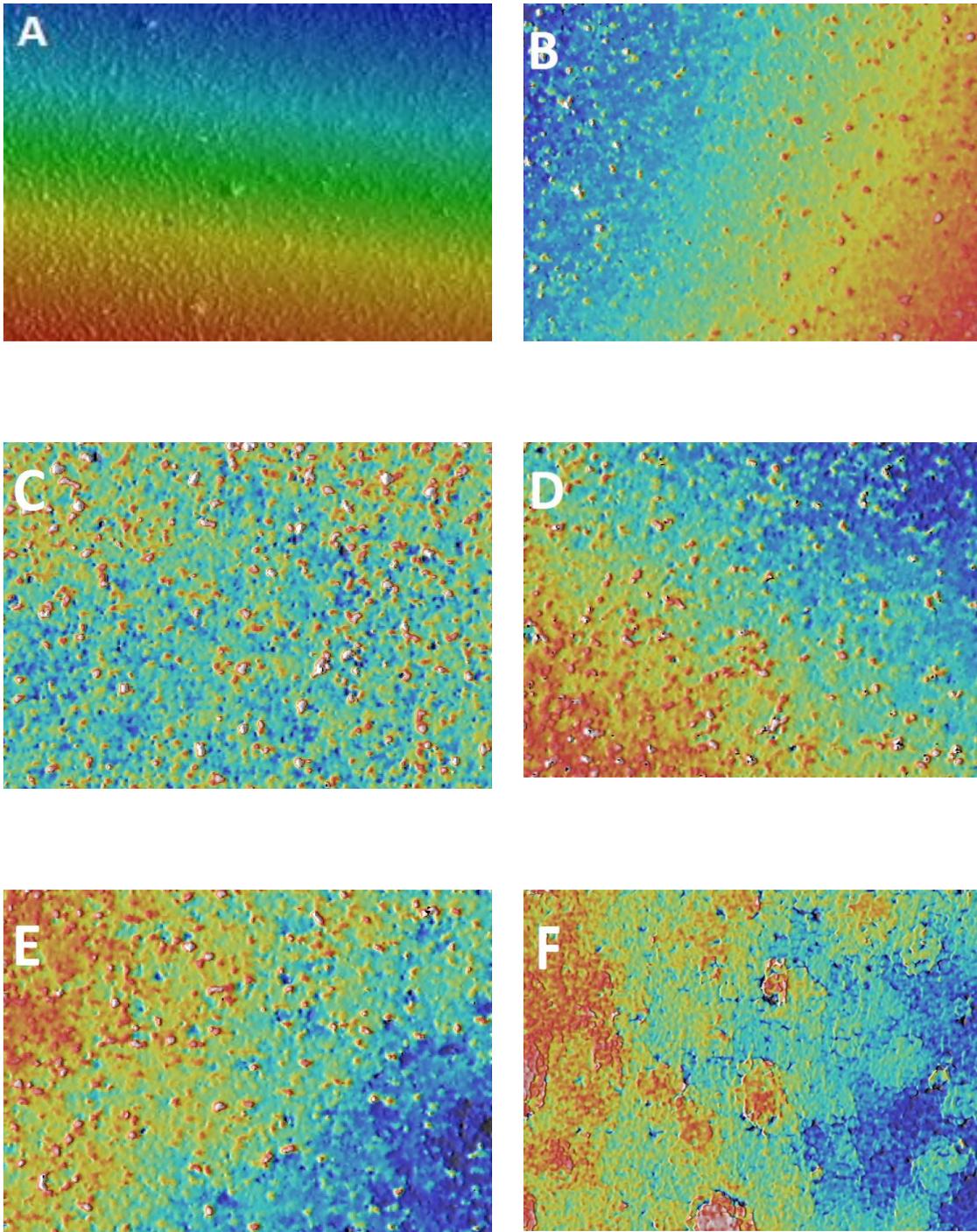


Fig. IV.2.6. Imágenes de microscopia confocal de las superficies de Ti grabadas a distintos tiempos (área escaneada $58 \times 43 \mu\text{m}^2$)
A: control, B: 2min, C: 3min, D: 5min, E: 7min, F: 10min

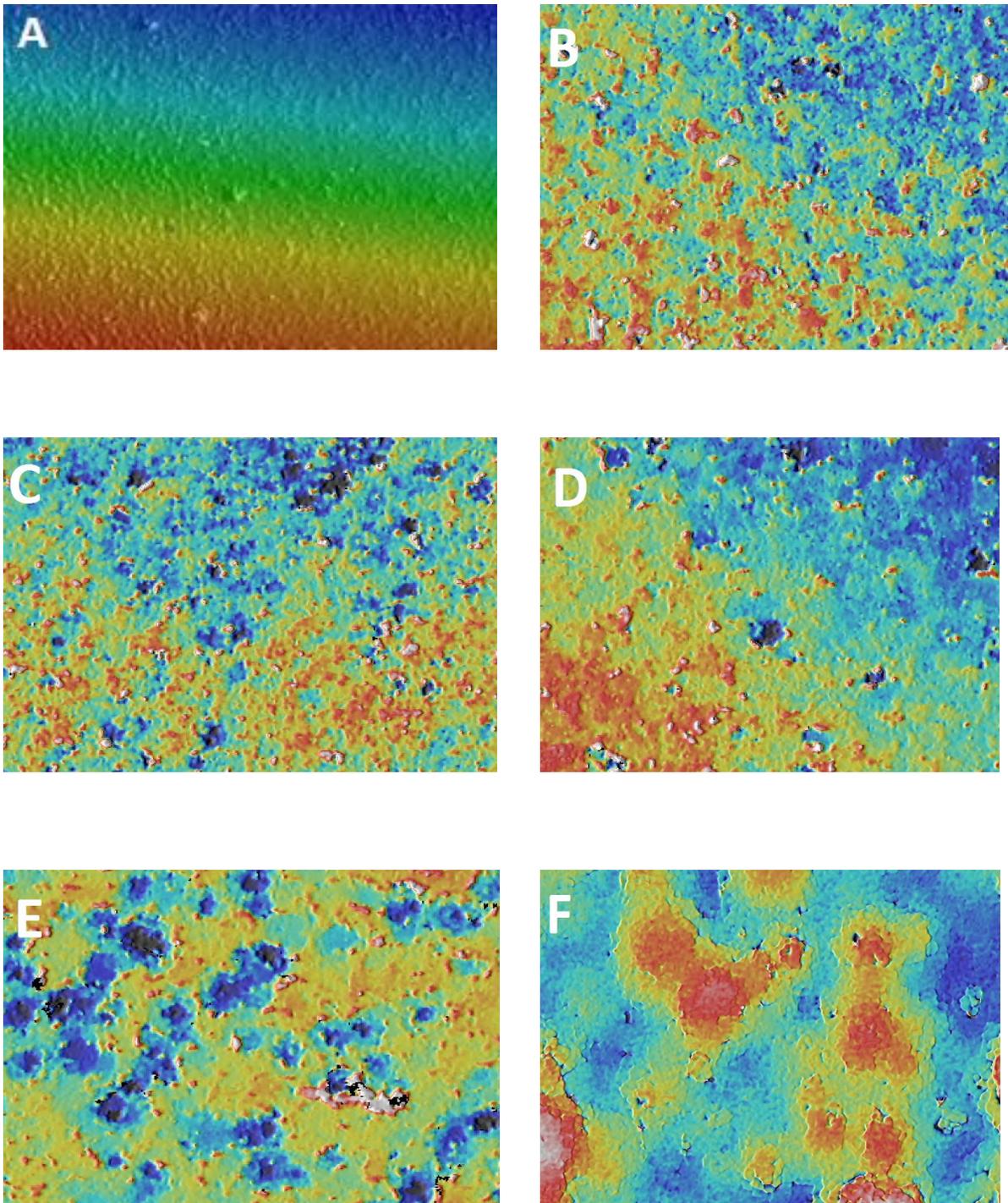


Fig. IV.2.7. Imágenes de microscopia confocal de las superficies de Ti grabadas a distintos tiempos (área escaneada $117 \times 86 \mu\text{m}^2$)
A: control, B: 2min, C: 3min, D: 5min, E: 7min, F: 10min

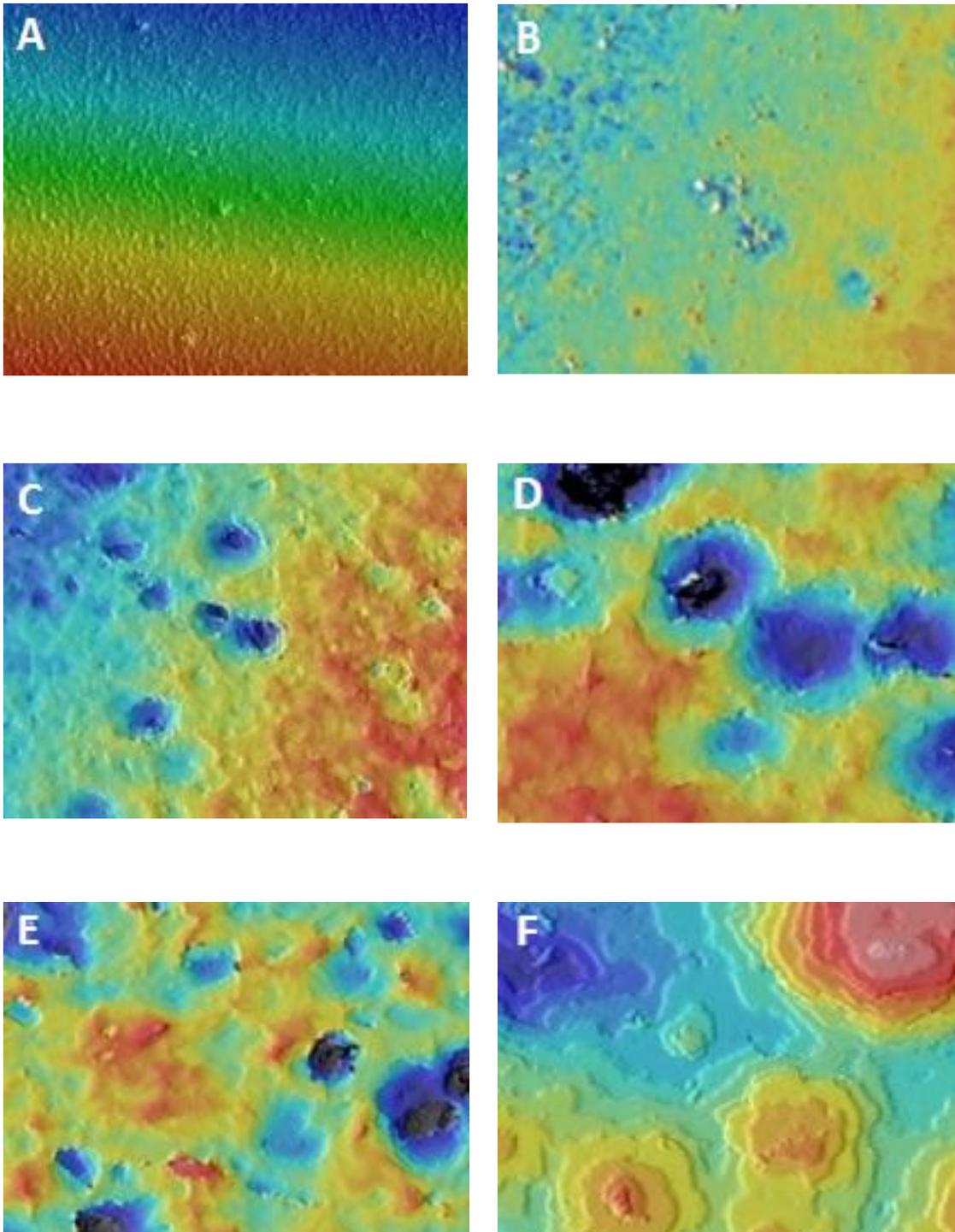


Fig. IV.2.8. Imágenes de microscopia confocal de las superficies de Ti grabadas a distintos tiempos (área escaneada $292 \times 214 \mu\text{m}^2$)
A: control, B: 2min, C: 3min, D: 5min, E: 7min, F: 10min

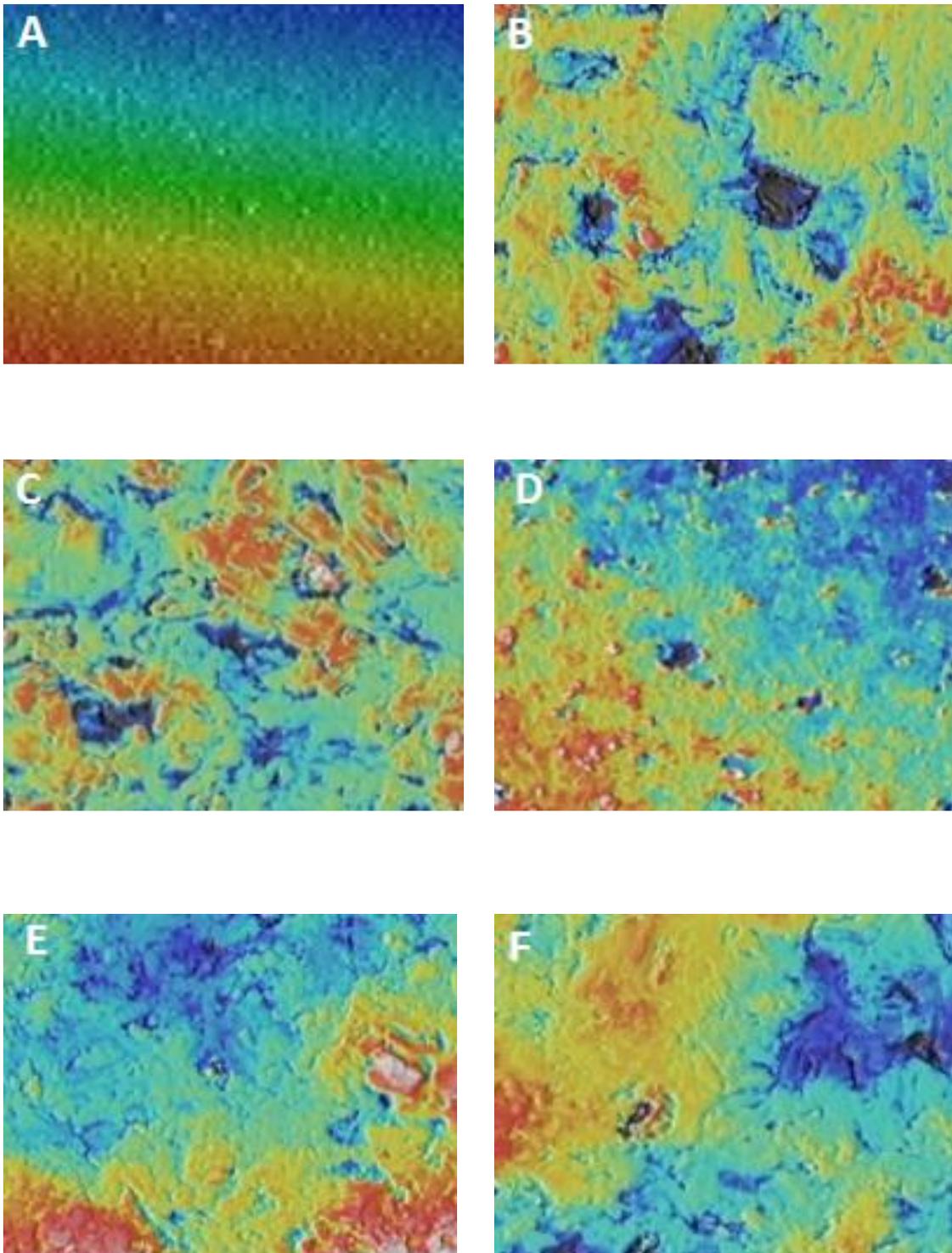


Fig. IV.2.9. Imágenes de microscopia confocal de las superficies de Ti grabadas a distintos tiempos (área escaneada $584 \times 428 \mu\text{m}^2$)

A: control, B: 2min, C: 3min, D: 5min, E: 7min, F: 10min

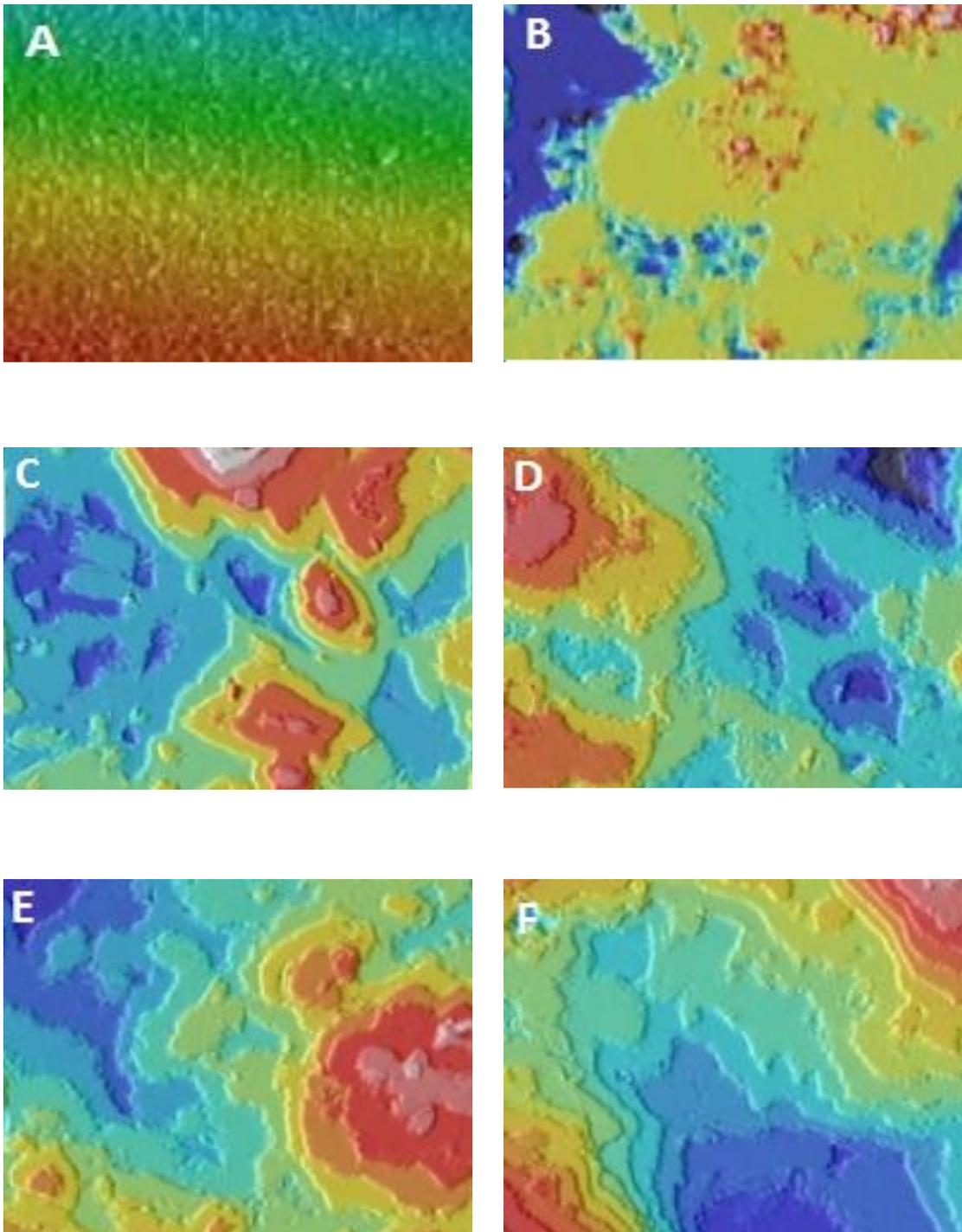


Fig. IV.2.10. Imágenes de microscopia confocal de las superficies de Ti grabadas a distintos tiempos (área escaneada $776 \times 642 \mu\text{m}^2$)

A: control, B: 2min, C: 3min, D: 5min, E: 7min, F: 10min

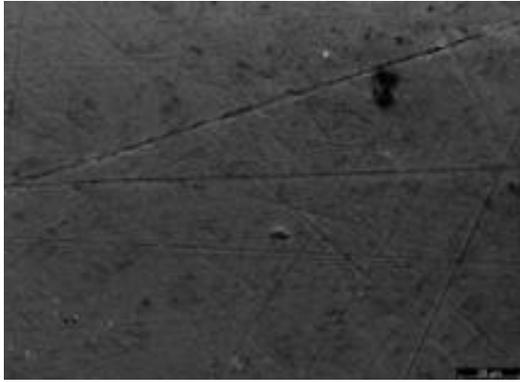
En el grupo2 (grabado por 2 min) la superficie empieza sufrir un cambio significativo donde se ve una superficie con muchos picos y valles, en el grupo3 (grabado por 3min) se observó que los picos y valles son menos de lo que se encontró en el grupo2, en el grupo4 (grabado por 5min) se nota que los picos y valles son menos de lo que se encontró en el grupo3, no se observó cambio entre el numero do los picos y valles entre los últimos tres grupos donde mantienen valores similares, y esto se ve claramente en la figura IV.1.7. Se observó otros cambios en las superficies estudiadas de ser lisa en el control con un perfil plano a superficie rugosa con perfil de muchos picos y valles en los grupos (2 y3) a superficie mas rugosa pero con menos picos y valles y con un perfil cortado donde los picos y valles se hacen planos teniendo imágenes de islas en los grupos (4, 5, y 6).

- **Morfología con microscopio electrónico de barrido (MEB)**

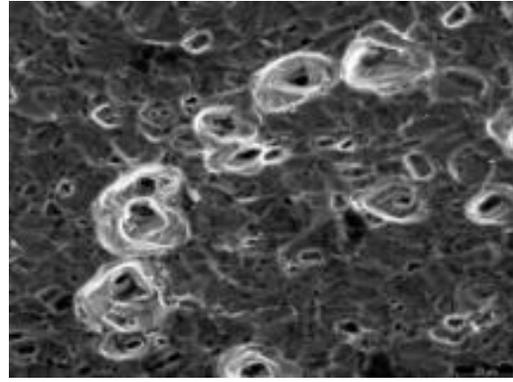
Los resultados morfológicos del microscopio electrónico se encuentran en las figuras IV.2.11 a IV.2.13.

El tiempo de grabado influyó en la morfología evaluada con el microscopio electrónico, en el control presenta un aspecto suavemente ondulado, donde se ve superficie lisa con pequeñas irregularidades con valles de diámetro pequeño entre 0.05 y 0.1 μm producidas por el ultra pulido con las partículas de oxido de aluminio.

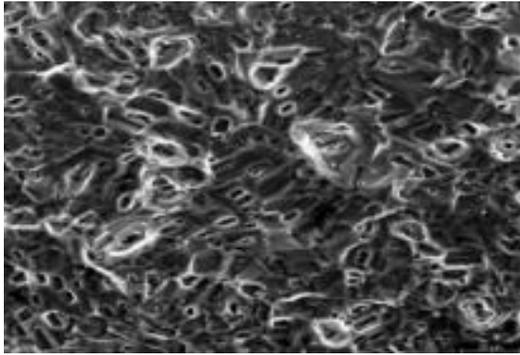
Las superficies grabadas han presentado un patrón de rugosidad homogéneo y ordenado debido a su estructura cristalina, además se han detectado poros de diámetro pequeños entre 0.05 y 0.1 μm en estas cinco superficies, no ha habido diferencias significativas entre el tamaño de los poros de las cincos superficies. El proceso de grabado produce áreas de depresión cercanas entre ellas, cubiertas uniformemente por micro poros. Los micro poros son únicamente producidos por el proceso de grabado ácido, se nota el aumento lineal de los micro poros con el tiempo de grabado; Esto se ve claramente en las siguientes figuras.



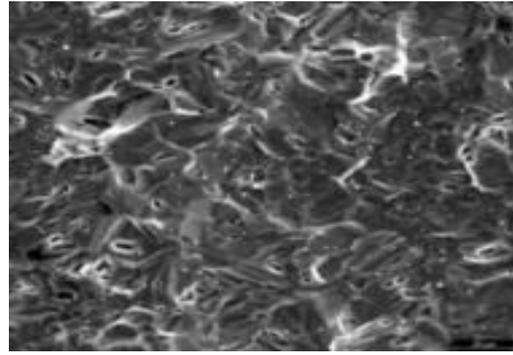
A



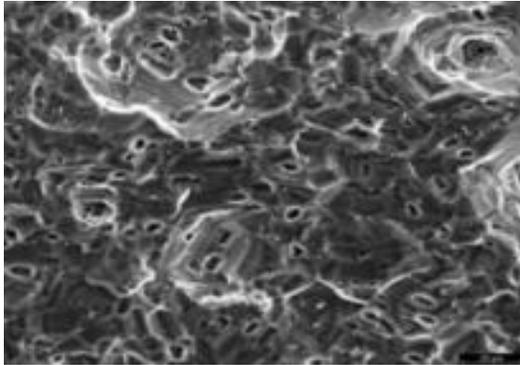
B



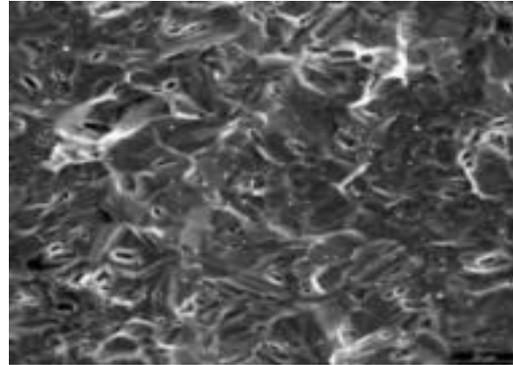
C



D

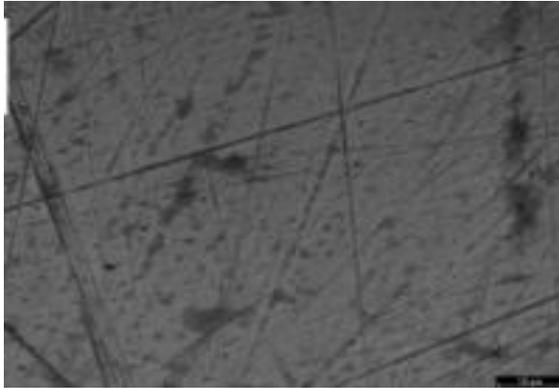


E

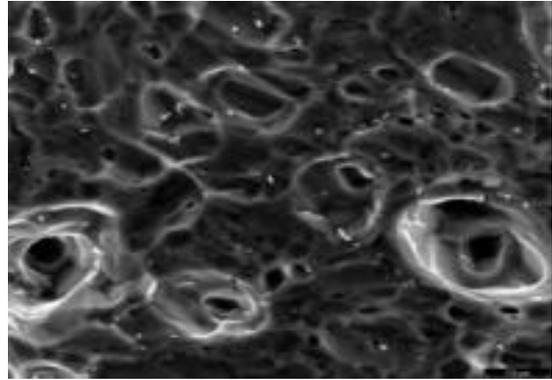


F

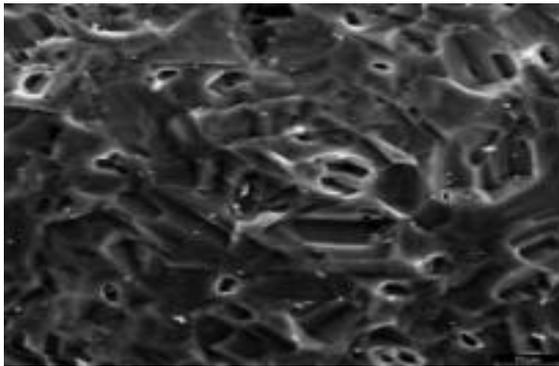
Fig. IV.2.11 Imágenes de MEB de las superficies estudiadas a distintos tiempos (área $205 \times 155 \mu\text{m}^2$). A: control, B: 2min, C: 3min, D: 5min, E: 7min, F: 10min.



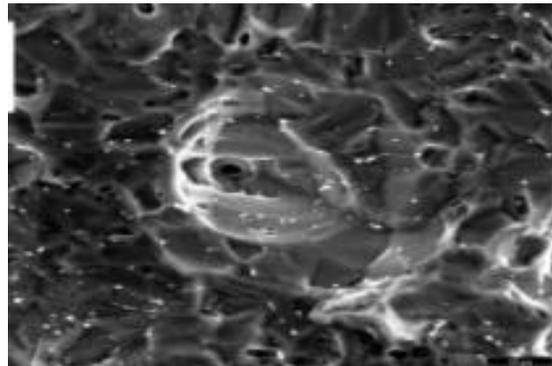
A



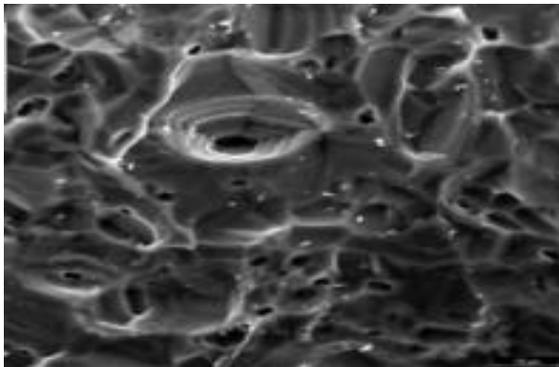
B



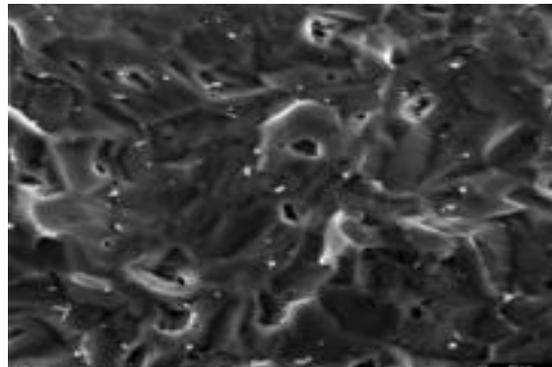
C



D

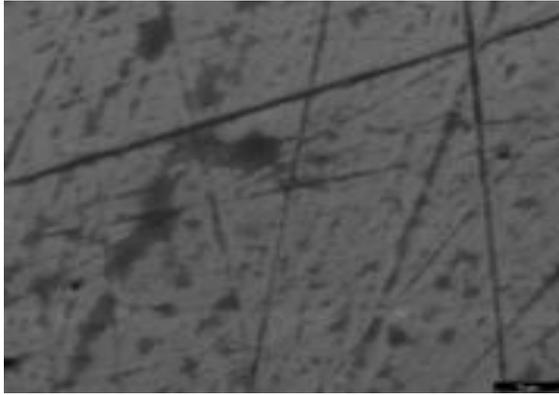


E

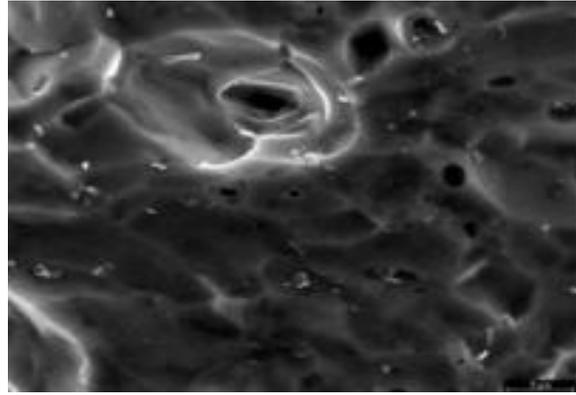


F

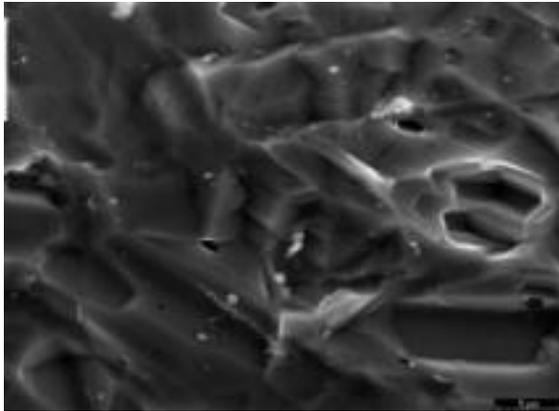
Fig. IV.2.12. Imágenes de MEB de las superficies estudiadas a distintos tiempos (área $410 \times 310 \mu\text{m}^2$). A: control, B: 2min, C: 3min, D: 5min, E: 7min, F: 10min.



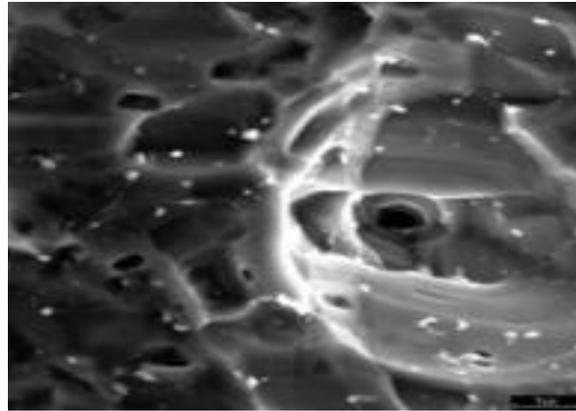
A



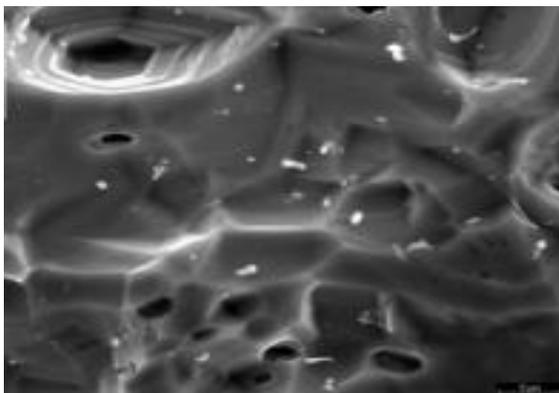
B



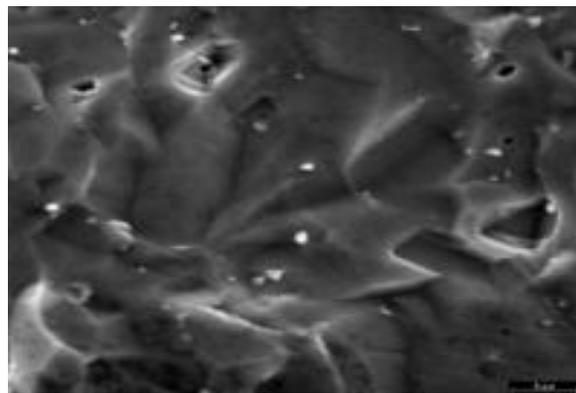
C



D



E

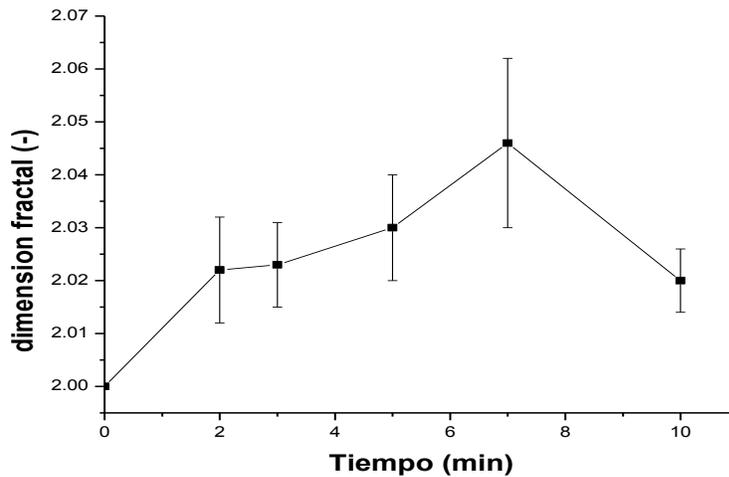


F

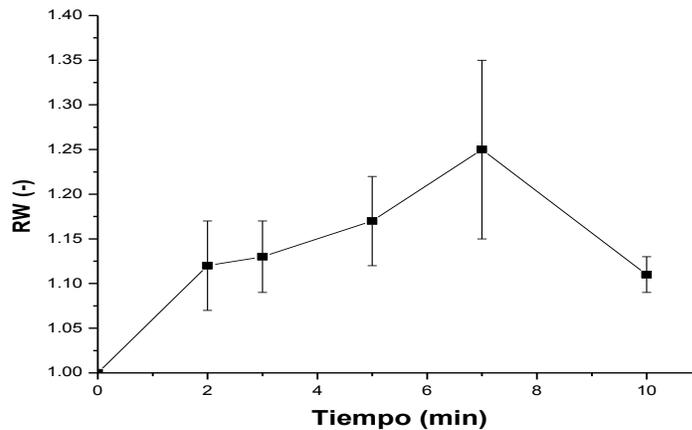
Fig. IV.2.13. Imágenes de MEB de las superficies estudiadas a distintos tiempos (área $820 \times 620 \mu\text{m}^2$). A: control, B: 2min, C: 3min, D: 5min, E: 7min, F: 10min.

IV.2.3. Dimensión fractal y factor Wenzel

Los resultados obtenidos de la dimensión fractal y factor Wenzel se encuentran en las graficas IV.2.9 y IV.2.10. El tratamiento aplicado tuvo su efecto sobre la dimensión fractal y factor Wenzel de las superficies estudiadas, se detectó un cambio significativo de la dimensión fractal entre el control y la muestra grabada, notando una gran subida a los 2 min, sigue subiendo el valor de la dimensión fractal hasta los 7min, después baja a los 10 min igualando el valor conseguido a los 2 min. Los cambios de factor Wenzel siguen la misma tendencia como se puede ver en las siguientes graficas.



Gra IV.2.9. La dimensión fractal de las superficies estudiadas.



Gra IV.2.10. Factor Wenzel de las superficies estudiadas.

IV.3. Química de la superficie

Los resultados de la química de la superficie se encuentran en la tabla IV.3. El tiempo de grabado influyó en la química de las superficies estudiadas, donde se detectó cambio cualitativo y cuantifico entre las superficies estudiadas, se observó la presencia del aluminio únicamente en el control y desaparece en las muestras grabadas; se detectó la presencia del flúor solamente en el segundo grupo y desapareció en el resto de los grupos. Se observó una contraposición entre el carbono y oxígeno, se observó la presencia del nitrógeno en todas las muestras estudiadas; la siguiente tabla (Tabla IV.3) demuestra los cambios de los elementos químicos en la muestra estudiada:

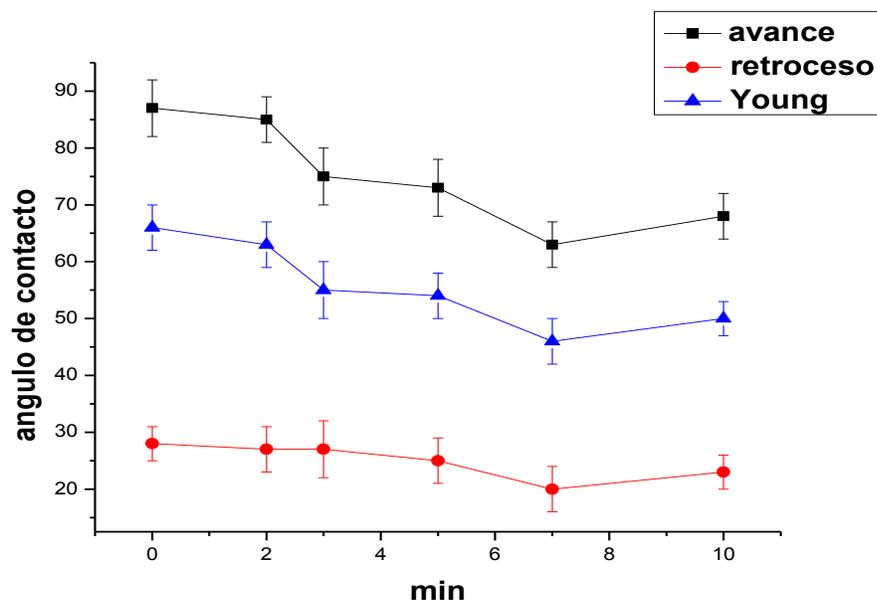
Tabla IV.3: Porcentaje de cada elemento en las superficies estudiadas medidas con el XPS.						
Tiempo	control	2 min	3 min	5 min	7 min	10 min
O (1s)	27	29	53.5	52.5	44.5	48
Ti (2p)	7	4	15	16	15	17
C (1s)	60	62	30	30	39.5	34
N (1s)	3.5	4.5	1.5	1.5	1	1
Al (2p)	2.5	0	0	0	0	0
F (1s)	0	1/2	0	0	0	0

IV.4. Humectabilidad

Los resultados de la humectabilidad se encuentran en la tabla y la grafica IV.4. El tratamiento aplicado influyó en la humectabilidad de las superficies estudiadas. El ángulo de avance de la gota y el ángulo retroceso de la burbuja, se sacó la media de los dos ángulos y se utilizó la ecuación Wenzel para calcular el ángulo Young; analizando los valores de los ángulos (avance, retroceso y la media) se encontró que los ángulos de contacto fueron menores de 90°, el ángulo más grande siempre lo tuvo el control, no detectó cambio en el tercer y el cuarto grupos, el ángulo menor se detectó a los 7 min de grabado.

Tabla IV.4: Ángulos de contactos de avance, retroceso, media, y Young. (media [DE])				
TIEMPO min	AVANCE	RETROCESO	MEDIA	YOUNG
0	87 (5)a	28 (3)a	58(5)a	58 (2)ab
2	85 (5)a	27 (4)a	57(5)a	61 (2)b
3	76 (5)b	27 (5)a	52(6)b	56 (4)bc
5	73 (5)bc	25 (4)a	50(6)bc	56 (5)bc
7	63 (4)d	18 (4)b	43(6)d	54 (5)cd
10	70 (4)c	20 (3)b	46(4)dc	51 (6)d

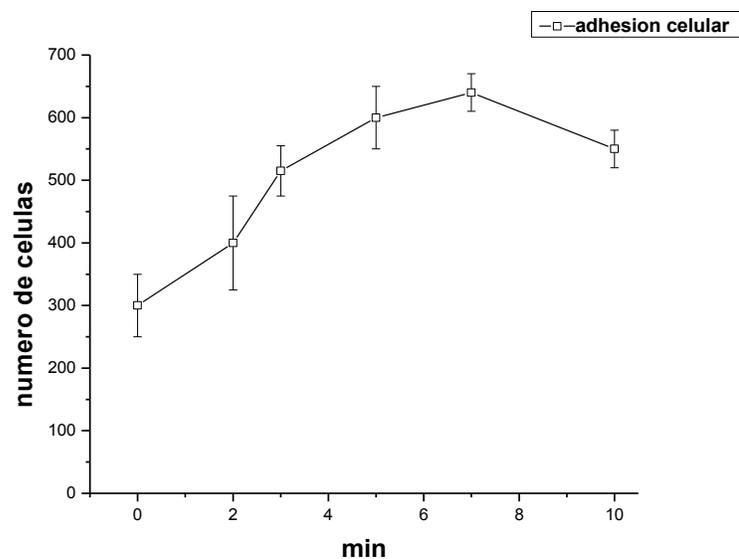
Los valores con la misma letra son estadísticamente similares ($P>0,05$). DE: Desviación estándar.



Gra IV.4. Los ángulos de contacto Young, avance y retroceso.

IV.5. El cultivo celular

Los resultados de adhesión celular a través del número de las células adheridas a la superficie se encuentran en la grafica IV.5. El tiempo de grabado influyó en el número de las células adheridas a la superficie en la muestra estudiada. Se encontró mucha diferencia entre el control y las superficies grabadas, el numero de las células pegadas era mayor en el grupo 5 (grabado por 7min), se encontró también que después de 7 min de grabación el numero de las células en las superficies empieza a minimizar como sale en la siguiente grafica

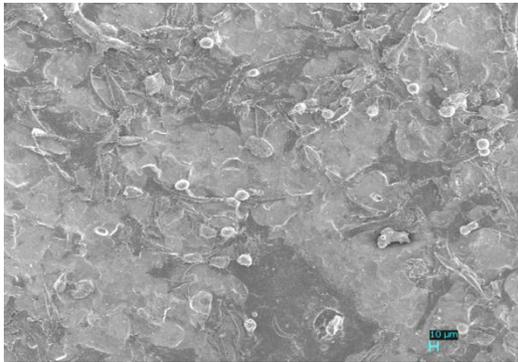


Grafica IV.5. Los resultados del cultivo celular

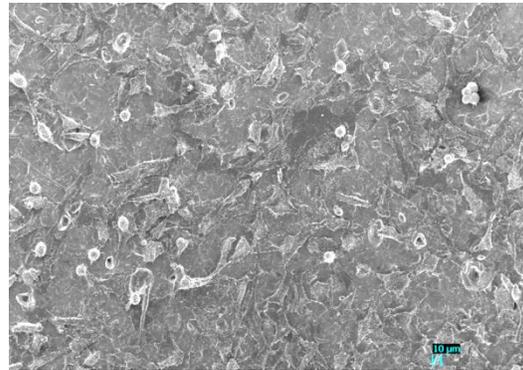
IV.6. Morfología celular

Los resultados morfológicos de las células se encuentran en la figura IV.6. Las células se pegan más a la superficie grabada que a la superficie lisa (control), en las superficies grabadas las células ocupan más área de la superficie que en el control, los núcleos están más visible en las superficies grabadas que los núcleos que están en el control, las células pegadas extendió en forma poligonal en la superficie del control, mientras que en una forma más alargada forma unidireccional en las superficies grabadas, aunque se nota que las células están más crecidas y desarrolladas en el cuarto y el quinto grupo de la muestra (grabadas por 5min, y 7min).

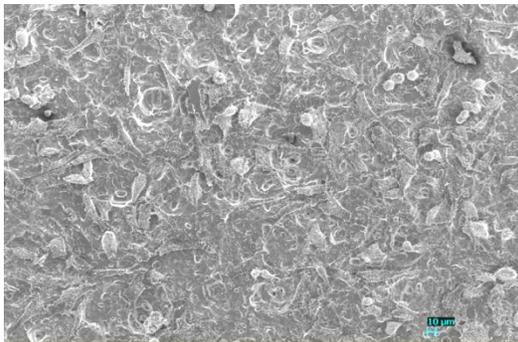
Control



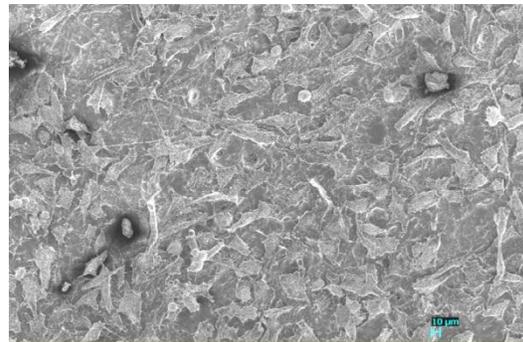
2min



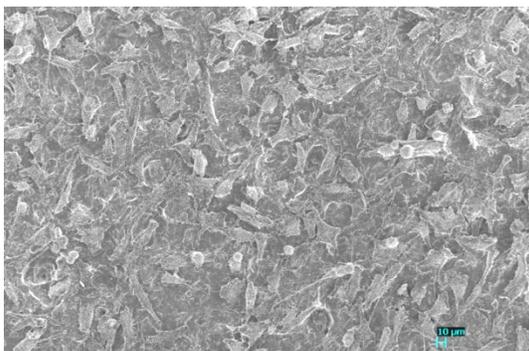
3min



5min



7min



10min

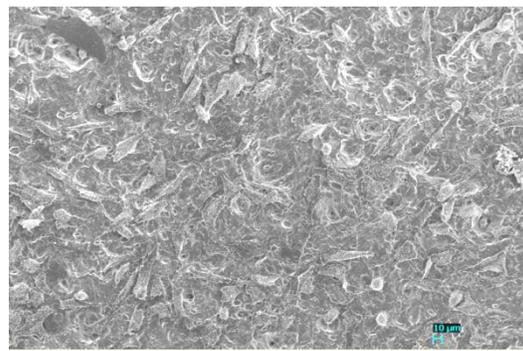


Fig. IV. 6. Imágenes de MEB . de las células pegadas a las superficies del Ti grabadas a distintos tiempos (área escaneada: 205x155 μm^2).

V. Discusión

Este trabajo ha demostrado que el tiempo de grabado ácido condiciona la topografía del titanio, humectabilidad, química superficial, y la respuesta celular. La adhesión celular primaria que garantiza la interfase hueso-implante tiene que ser lo más rápido posible. Este trabajo ofrece una oportunidad para conseguir rápida adhesión celular entre los 5 y 7 min de grabación. Este efecto estuvo relacionado con los cambios de la topografía, humectabilidad, y la química superficial durante el grabado ácido.

La metodología utilizada en el estudio de la muestra es determinante para obtener conclusiones. En este trabajo se realizaron una caracterización topográfica utilizando el microscopio confocal de luz blanca, esta técnica no se modifica la característica de la superficie, es que emplea luz de excitación de menor intensidad, reduce la concentración de oxígeno en el espécimen, el direccionamiento del 100% de la luz hacia el dispositivo de registro (cámara, película,...) para reducir al máximo el tiempo de exposición, emplea mecanismos de medición de la exposición óptima (automática) para reducir la iluminación al máximo, también la luz blanca es segura para la superficie (no afecta a la topografía); permite estudiar la muestra directamente sin aplicar o cubrirla con materiales como el carbón en el caso de utilizar el microscopio electrónico; y por otro lado esta técnica facilita datos de muchos parámetros de rugosidad, dimensión fractal, imágenes de dos y tres dimensiones de la superficie a varios aumentos.

Se utilizó varias escalas de medidas para mejor entendimiento de los cambios en el ángulo de contacto y la respuesta celular. Las señales topográficas microscópicas se pueden utilizar para controlar con precisión la adhesión, la morfología, la migración y la diferenciación en una amplia variedad de tipos de células que van desde fibroblastos a la matriz extra celular, así como ser aplicados para medir las fuerzas generadas por células (Nikkhah M et al, 2012).

Para evaluar la humectabilidad se utilizó el método ADSA-P con la técnica dinámica estudiando el ángulo avance de la gota y el ángulo retroceso de la burbuja; la potencia de esta técnica es que no se necesita introducir ningún parámetro interfacial inicial para hacer la medida, la única cosa necesaria es obtener la relación pixel-

centímetro de la imagen digital, la densidad del líquido y la gravedad local; el método dinámico es el más utilizado en las aplicaciones industrial (Kubiak et al, 2011), porque ofrece resultados más fiables que la técnica estática (gota sénil), en un estudio de (Lamolle et al, 2009b) para evaluar el efecto del tiempo de grabado en la humectabilidad se encontró que la muestra grabada es menos humectable que el control y esto está en contra de la práctica científica; es que el sistema de la gota sénil consiste en tres fases, la superficie sólida donde se pone la gota, el líquido utilizado para formar la gota y su vapor, y así se forman tres interfaces interfaz líquido-vapor (la superficie de la gota), interfaz sólido-líquido (el sólido mojado), interfaz sólido-vapor (sólido sin mojar); y la ecuación Young-Laplace relaciona la curvatura media de la superficie de la gota con la diferencia de presiones entre los lados de la interfaz; en este sistema la gota se alcanza la superficie y se anclaje a la superficie porque no tiene energía para avanzar, en la técnica gota –burbuja la línea de contacto avanza desde las zonas que ya está mojada o retrocede desde de la zona que ya está seca hasta llegar a su posición actual, en este sistema el ángulo de contacto manifiesta la resistencia al movimiento de la línea de contacto.(Rodríguez et al, 2010)

Para evaluar la química de la superficie se utilizó la espectroscopia fotoelectrónica de rayos X , XPS ó ESCA (Espectroscopia Electrónica para Análisis Químico), es el método de caracterización de superficies más ampliamente utilizado que el microscopio electrónico del barrido MEB, es que la onda de e- puede proporcionar información cualitativa y cuantitativa de todos los elementos presentes, excepto H y He y explica la situación de las combinación química de los elementos presentes en las superficies analizadas.

En un estudio para evaluar la composición química de la superficie de titanio grabada con ácido hidrofúorico y pasivado posteriormente con ácido hidrofúorico y ácido nítrico, el microscopio electrónico solo pudo detectar titanio en la superficie, sin embargo utilizando la técnica XPS se detectó titanio y otros elementos como carbón (Martínez et al, 2007).

Evaluando la adhesión celular se utilizó la línea MG-63 de osteoblastos, que se obtuvo de tejido óseo de un varón caucásico de 14 años con osteosarcoma (ATCC:

CRL-1427) del banco de las células en la universidad de Granada, esta línea es una de las más utilizadas en estudios biológicos aunque se trata de una línea de origen tumoral, varios estudios han demostrado su capacidad para proporcionar una respuesta similar a la de osteoblastos diferenciados. Esto es, la capacidad para sintetizar fosfatasa alcalina, osteocalcina y otras proteínas dependientes de vitamina K cuando su diferenciación se ve estimulada con calcitriol. (Bonewald et al, 1992); otros autores (Lamolle et al, 2009b, Lumitte et al, 2016) utilizan la línea MC3T3-E1 (DSMZ, Braunschweig, Germany), esta es una línea de osteoblastos se usa in modelo vitro en ratones en funcion American Type Culture Collection (ATCC, CRL 1661, Rockville, MD, USA). (Reigosa et al, 2008).

En este trabajo se encontró que el grabado ácido afecta en la topografía, y estos cambios han sido relacionados con el tiempo de grabado; evaluando la rugosidad se encontró que los parámetros (R_a , R_q , R_p , R_v , R_t) incrementan en función del tiempo de grabado ácido, es que consigue su valor máximo a los 10 min de grabado, esto está relacionado con la pérdida de masa, la que tiene relación directa con el tiempo de grabado. El grabado ácido erosiona la superficie, después quita la capa de óxido TiO_2 , y finalmente empieza el ácido quitando las cristalinidades de la superficie del titanio dejando la superficie con más huecos y poros produciendo una superficie con más irregulares con muchos picos y valles, por lo tanto se aumenta la rugosidad; este incremento de rugosidad favorece la adhesión celular y el número de células adheridas a la superficie incrementa en función del tiempo de grabado. Está demostrado que los osteoblastos prefieren pegarse a superficies de titanio con estructura nanométrica o sub-micron comparando con superficie lisa (Kahan et al, 2008).

Aunque a los 10 min de grabado se ha reducido la adhesión celular, esto está relacionado con la irregularidad superficial, es que la célula no prefiere una superficie tan irregular, en un estudio anterior se ha encontrado que el arenado con el grabado ácido producen superficie más rugosa que la superficie solo grabada, y en la superficie solo grabada conseguimos más adhesión celular (Rosales et al, 2010). En otros estudios se ha demostrado que la superficie muy rugosa reduce el contacto entre el hueso y el implante (Blanco et al, 2010).

Rsk este parametro es sensible a los profundos valles o a los altos picos. Una superficie con picos altos y valles profundos tiene zero Rsk. Rsk es negativo cuando el perfil presenta picos retirados o valles profundos, y Rsk es positivo cuando presenta el perfil valles rellenos o picos altos (Gadelmawla et al, 2002). Inicialmente la superficie pulida presenta Rsk cerca de cero, pero despues del grabado Rsk era negativo en todos los grupos grabados. Realmente entre 2-7 min no hubo diferencia. Otros estudios detectaron mas celulas adheridas a superficie con Rsk negativo pero con menos rugosidad (Lamolle et al, 2009a; Rosales et al, 2010). Osteoblastos adhiere mas facil a superficies con Rsk negativo. Curiosamente a los 10 min de grabado sube el valor de Rsk respecto a los otros grupos y se acerca de zero, y la adhesion celular es menor. Esto demuestra el efecto de parametro Rsk en adhesion celular.

Kurtosis Rku describe la nitidez del perfil (Gadelmawla et al, 2002). Las superficies con Rku superiores de 3 tienen "picos" agudos (leptocúrticas), mientras que las superficies con Rku inferiores de 3 indican "picos" más redondeados con "hombros" más amplios (platicúrtica). En este estudio, el tiempo de grabado reduce Rku progresivamente de 18 en la superficie no grabada a 3,2 (distribución gaussiana) después de 10 min de grabación. La mejor adhesión celular fue encontrado después de 5-7 min. Donde Rku obtuvo valores 5-6. (Lamole et al, 2009b, Biomaterialia acta) encontraron mayor resistencia-bond-implante en la muestra grabada con valor Rku (5,9). Además, (Lamole et al 2009b, biomateriales) encontró que la adhesion celular fue mayor cuando se eleva Rku 3,2-3,6 . Osteoblastos prefieren superficies lisas pero leptocúrticas superficies no Gaussianos o platicúrtica.

También se analizó factor wenzel (Rw) y se encontró que el grabado produce un aumento de la area en función del tiempo, con un valor máximo a los 7 minutos de grabado. Factor wenzel (Rw) se redujo después de 10 min. Este factor se expresa el contacto real de una superficie. A partir de este parámetro, se puede concluir que la mayor superficie de contacto se alcanza después de 5-7 min. Tiempos de grabado más largo (10 min.) Reduce el área de contacto real. La adhesión celular se relaciona con el área de contacto (Erwin A. Vogler. 1989). Mayor tiempo de grabado puede reducir la área y la adhesión celular.

Dimensión fractal es una herramienta útil para caracterizar una superficie. Aunque hay mucho esfuerzo dedicado al desarrollo y fabricación de nanotextured o estructurados superficies (Webster et al, 2006), los procesos de texturización convencionales proporcionan superficies rugosas al azar. Además, estas superficies rugosas son generalmente auto-afines, es decir, no es un trastorno anisotrópico porque la superficie se mantiene estadísticamente invariante bajo dilataciones de las x, y, z coordenadas pero por diferentes factores de escala (Mandelbrot, 1983). Dimensión fractal proporciona una medida de estos sistemas fuertemente desordenados independiente de la escala, independientemente de la escala de observación. Dimensión fractal surge como un índice más apropiado de trastorno de superficie (Chappard et al, 2003) en lugar de los parámetros de rugosidad de amplitud. Sin embargo, un solo exponente no es suficiente para la descripción completa de las superficies fractales. En este trabajo, la información parcial proporcionada por la dimensión fractal fue refinada por los valores de curtosis y asimetría, y confirmada por imágenes SEM. Alternativamente, lacunaridad se convierte en una contrapartida de la dimensión fractal, ya que sólo describe la textura de una superficie fractal (Mandelbrot, 1983). Superficies fractal teniendo mismas dimensiones fractales pueden parecer muy diferentes, debido a que tienen diferentes lacunaridad. En este trabajo se encontró que D_f experimentó un aumento dependiente del tiempo, excepto en el último tiempo de grabado. Lamolle (2009b) también encontró un aumento progresivo. Además, se encontró una relación positiva entre el DF y la adhesión celular (D_f superior se relaciona con una mayor adhesión celular) de acuerdo con otros estudios (Rosales et al, 2010).

Creando una superficie con más irregularidad, dicha superficie ofrece más contacto con las células, por otro lado el aumento de la rugosidad mejora la humectabilidad, y estos dos cambios mejoran la adhesión y la proliferación celular. (Rupp et al, 2004, Hotchkiss KM et al, 2016) en un trabajo evaluaron las modificaciones en las propiedades de la superficie del titanio después del grabado ácido o el arenado; encontraron que la superficie cambia de ser una superficie hidrofobia a superficie hidrofilia adsorbiendo gran cantidad de la fibronectina por los cambios en la micro

estructura lo que mejora la humectabilidad lo que afecta en el inicial contacto con los tejidos y la respuesta biológica inicial de la adsorción de la proteína, esta adsorción condiciona el contacto y este contacto condiciona la adhesión celular. También la topografía y la humectabilidad afectan directamente en la adhesión celular.

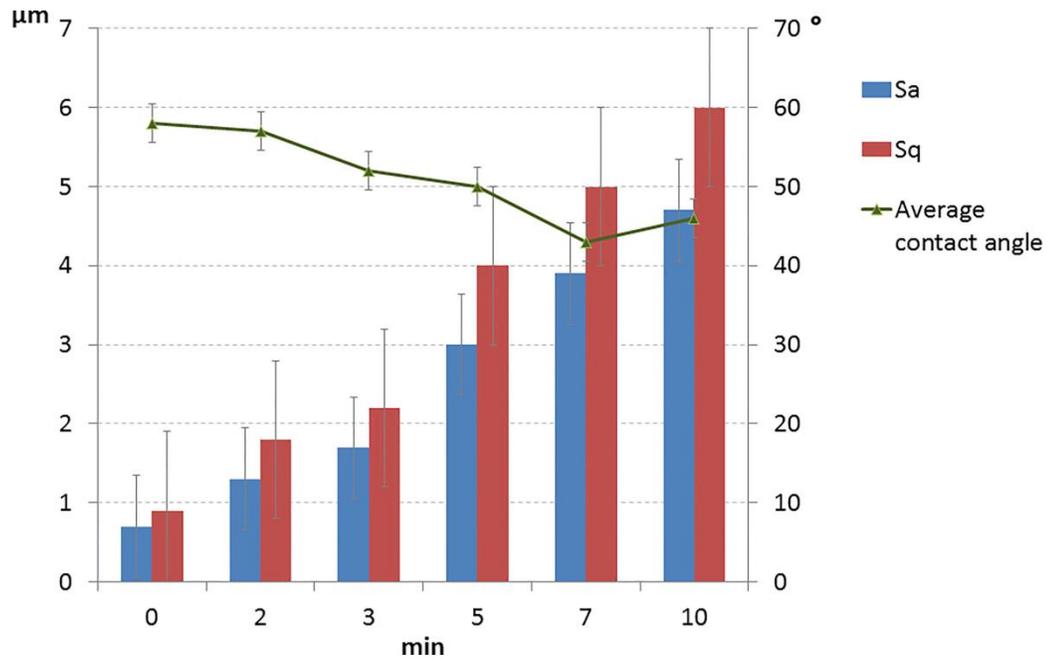


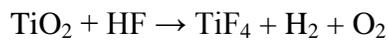
Fig.V.1. Grafica comparativa de Ra,Rq con el ángulo de contacto.

El grabado ácido modificó la composición química de la superficie hasta los 3min de grabado cuando se estabilizó. Analizando los datos de la espectrometría XPS de los elementos en la superficie se encontró (oxígeno, carbón, nitrógeno, aluminio, flúor, y titanio).

El aluminio pareció en el control por el ultra pulido donde se usó partículas de aluminio y desapareció después en la muestra grabada por el efecto del ácido utilizado (HF) que va limpiando la superficie grabada de las partículas integradas y esto muy importante porque un biomaterial no puede contener aluminio es que presenta una citotoxicidad muy elevada, incluso se usa el aluminio como guía para medir la citotoxicidad de los materiales (Gomez et al, 2007), esta citotoxicidad impide la adhesión celular y la osteointegración (el primer objetivo y la condición más importante para conseguir un tratamiento exitoso).

El nitrógeno aparece en cada una de las muestras estudiadas sin tener gran cambio en el porcentaje entre las muestras estudiadas, este nitrógeno no viene del ácido nítrico utilizado en el proceso del pasivado pero viene el nitrógeno de la atmosfera donde forma más que 78%.

F se observó sólo después de 2 min. de inmersión HF. La capa de óxido superficial Ti reacciona primero con los iones de fluoruro de la solución que a partir de entonces grabadas de distancia debido al fuerte efecto de la corrosión de la HF en óxido de Ti (Lamolle et al, 2009b).



El espesor de la capa de TiO_2 es mayor al comienzo del grabado ácido. Es un tiempo necesario para disolver la capa pasiva del Ti. 0,2% de HF necesita aproximadamente 150 s. (Lamolle et al, 2009b). Cuando la capa de TiO_2 original es disolver, la posibilidad de fijación F se reduce y entonces no se detecta. Estos resultados son consistentes con otras investigaciones (Nakagawa et al, 2001; Rodríguez Rius et al, 2005; Korotin et al, 2012). Los mecanismos que actúan de flúor en la superficie en las células adherentes aún no están aclarados (Cooper et al, 2003; Guo et al, 2007). Tal vez los beneficios de grabado HF a la superficie Ti se basan en los cambios en la topografía de la superficie a nivel micro y nanométrica cuenta más que la presencia de iones F. De hecho todos los estudios que utilizaron una F que contiene superficie preparan este Superficies similitud por HF grabado de una superficie lisa del ti (Monjo et al, 2008, Lamolle et al, 2009b, He et al, 2010; Li et al, 2011). Entonces, ellos están comparando una superficie lisa con F con una rugosa sin F, que contiene más áspera superficie Ti después de tratamiento de la IC. Como se señaló anteriormente, la topografía influye drásticamente la unión de las células (Kahang et al, 2008). Será interesante comparar rugosidad de superficies similares con y sin contenido de F para aclarar mejor el efecto real F.

El oxígeno se aumentó después del grabado. La concentración de oxígeno en la superficie tratada es mucho mayor que para la muestra no tratada, debido a que el

tratamiento con ácido elimina las capas superficiales contaminadas, aumenta su reactividad, y proporciona una mejor pasivación y la formación de gruesa capa de TiO_2 protección (Korotin et al, 2012). La formación de una gruesa capa de TiO_2 también contribuye a una mayor adhesión celular (Park J, et al. 2009).

XPS reveló incremento en el contenido de Ti y O, y un contenido disminuido de C, que era consistente con informes anteriores (Lamolle et al, 2009b; Li et al, 2010; Korotin et al, 2012). La presencia del carbono en todas las superficies estudiadas es inevitable, como los hidrocarburos atmosféricos, contaminación orgánica y el CO_2 se adsorbe fácilmente sobre superficies de titanio expuestas. Sin embargo, la presencia de carbono se reduce progresivamente con el tiempo de grabado. De 3 min. tiempo de inmersión, los valores de carbono se estabiliza y constante en el tiempo. Ahora bien, el origen es exclusivamente del CO_2 atmosférico. La reducción de C aumenta la energía superficial y el potencial de bio-aceptabilidad de una superficie de Ti (Korotin et al, 2012). Esto contribuye a explicar la adhesión celular más alta encontrada después de los grupos grabados superiores a 3 min.

Humectabilidad también fue influenciada por el tiempo de grabado. Humectabilidad era reducida y obtuvo su valor mínimo a los 7 min. Después, se aumentó de nuevo a los 10 min, dando la cuenta que todos los ángulos eran menores que 90° . Wettability de una superficie de expresar una relación entre tres fases (líquido, sólido y gas) que se relacionan en la ecuación de Young-Laplace (Rauscher M. Dietrich S., 2008). Variaciones de cada fase producen una modificación del ángulo de contacto. En este estudio el líquido (agua) y el gas (aire) son constantes. Entonces, las variaciones del ángulo de contacto están relacionados con las modificaciones de sustratos sólidos. El sólido se puede modificar la química y la topografía (irregularidades o rugosidad).

En la misma química de titanio, nanómetros (menos de 100 nm) y sub-micras (más a 100 nm) estructuras superficiales altera la energía superficial y la humectabilidad. Rugosidad y humectabilidad se relacionan en la ecuación de Wenzel (Khang et al, 2008). Las irregularidades de la superficie del sólido influye en las mediciones de ángulo de contacto. Este es expreses en la ecuación de Wenzel (Wenzel, 1936):

$$\cos\theta_{app} = R_w \cdot \cos\theta_\gamma$$

Cuando R_w (factor de Wenzel) da el área aparente, y θ_{app} consulte el ángulo de contacto en la superficie rugosa y θ_γ (ángulo de contacto Young) se refiere a la verdadera superficie lisa, ideal. Esta ecuación indica que si el ángulo de contacto medido sobre una superficie lisa es menor que 90° , que se reduce aún más por rugosidad, mientras que si es mayor que 90° , se incrementa. En este estudio, el ángulo de contacto sobre una superficie lisa de Ti era menor que 90° (superficie pulida no grabada), a continuación, rugosidad reduce el ángulo de contacto y por lo tanto aumenta la humectación. En este estudio, ángulo de contacto medido en la superficie sin grabado al agua fuerte o superficie lisa (θ_{app}) fue de menos de 90° ; luego como la rugosidad se aumenta después del grabado ácido ángulo de contacto (θ_γ) se redujo según factor de Wenzel, excepto a los 10 min de inmersión, cuando el ángulo de contacto y la rugosidad se aumentaron.

La química también influye en el ángulo de contacto y luego en la humectabilidad. Como se señaló anteriormente, los elementos químicos varían después del grabado y son relativamente estables después de 3 min de grabado. Las variaciones iniciales del ángulo de contacto también se deben a las variaciones químicas. Ángulo de contacto Young (θ_γ) se define por una superficie ideal. Si las variaciones de una superficie se basan únicamente en las irregularidades (Factor Wenzel (R_w)) entonces, θ_γ debe ser constante. θ_γ aumentó después del grabado debido a los cambios químicos (Al eliminación, reducción de C, F presencia) y luego disminuyó y después de 3 min (Ti, O, C, estabilización N). Después de 3, 5 y 7 min. θ_γ está demostrando relativamente estable que al mojar las variaciones se debió exclusivamente a factores topográficos. Sin embargo, después de 10 min. e incluso después de la hora 7 de inmersión, θ_γ disminuye mostrando que hay cambios en la energía de superficie.

Rugosidad mayor se detectó después de 10 min de inmersión, disminuyó humectabilidad en contra de que la ecuación Wenzel predice. Como se concluyó Kubiak et al, 2011, los parámetros de rugosidad más influyentes se refieren a la forma y

distribución de los picos. Para los picos más altos (alto R_p , R_v o R_T) la moción de la línea de contacto puede ser bloqueado por las asperezas de la superficie. Por lo tanto, en una superficie muy rugosa, un ángulo de contacto mayor se puede observar. Esta conclusión fue corroborado por Kubiak et al (2011), concluyeron que el factor K_r ($R_t/2R_a$) aumenta, el grado de propagación aumenta bruscamente. Sin embargo, los nuevos aumentos de K_r producen efectos decrecientes sobre dispersión. Entonces, para superficies muy rugosas, no se espera ninguna mejora adicional en la humectación. Esto explica por qué al final de 10 min de inmersión, la humectación se reduce en esta superficie muy rugosa.

En este estudio se utilizó una técnica de ángulo de contacto dinámico y desde el ángulo de contacto de avance y retroceso. La superficie no es homogénea y luego está la histéresis (diferencia entre el avance y retroceso de ángulo de contacto). El ángulo de contacto se puede calcular a partir de una gota equilibrada sobre superficies ideales. Sin embargo, para las superficies reales los valores medidos del ángulo de contacto generalmente son distintos al valor de equilibrio esperado. La diferencia puede ser atribuida a la superficie no uniformidad, la histéresis de ángulo de contacto, la heterogeneidad química, y rugosidad de la superficie física (Kubiak et al, 2011). El titanio es químicamente heterogéneo y rugoso, entonces se espera la histéresis y una técnica dinámica es necesaria para la obtención de datos correctos

Existen pocos estudios que determinaron el ángulo de contacto en función del tiempo de grabado. Lamolle (2009b) concluyó que el grabado se incrementó ángulo de contacto y luego reducir la humectación. Creemos que el método utilizado en este estudio (medición del ángulo de contacto estático) no es capaz de obtener datos válidos. El aumento de la topografía y la rugosidad produce un incremento de la humectabilidad como se señaló anteriormente. El efecto del grabado ácido en él humectabilidad se determinó en otros estudios de obtención de una reducción de ángulo de contacto (humectación aumento) después del grabado ácido (Rosales et al, 2010).

La humectabilidad de la superficie de un material de implante juega un papel clave en su éxito, ya que modula la adsorción de proteínas y por lo tanto influye en la adhesión celular y la integración del tejido en la interfaz. Humectabilidad después se relaciona con la adhesión celular (Khang et al, 2008). Humectabilidad de la superficie guía a los primeros eventos que ocurren en la interfaz de biomaterial / biológica, tales como la interacción de agua y proteínas con biomaterial y estos eventos guían aún más la respuesta (Kieswetter et al, 1996). En este estudio, la adhesión celular se relacionaba con la humectabilidad, y humectabilidad más baja se obtuvo después de 5 min. de grabado y así la adhesión celular. Esta conclusión fue corroborada en otros trabajos (Rosales et al, 2010).

Al nivel de cultivo celular se encontró mucha diferencia entre el control y las superficies grabadas no solo en el número de las células pegadas y la ubicación de las células en la superficie, pero también en el desarrollo y el crecimiento de las células; se encontraron los mejores resultados en las muestras grabadas por 5 y 7 min, el número reducido de las células en control vuelve por un lado a la topografía de la superficie lisa y por otro lado a las partículas de aluminio integradas en la superficie por el proceso del ultra pulido, la citotoxicidad del aluminio es un factor muy decisivo en la adhesión celular.

Hay estudios concluyeron que el desarrollo y proliferación celular se incrementaron en las superficies del Ti grabadas por 5 minutos más que las superficies arenadas y grabadas (Rosales et al, 2010). En otro estudio se utilizó HF 0.2 y el mejor tiempo para que las células se adjunten a la superficie era el 150s, pero la rugosidad se analizó hasta 150 s no más, entonces no es posible saber si la mayor rugosidad reducirá la adhesión celular (Lamolle et al, 2009b).

(Anselme y Biggerelle, 2005) en un estudio sobre la adhesión celular de los osteoblastos a varias superficies se encontraron que los osteoblastos humanos se extendió más íntimamente en la superficie con baja rugosidad que en las superficies rugosas, pero

la energía de adhesión (AP) de los osteoblastos humanos a largo plazo sobre superficies de titanio puro se relaciona con varios parámetros de rugosidad. Esta correlación con la rugosidad confirma una vez más que los osteoblastos humanos son más sensibles a la organización y la morfología de la rugosidad que a su amplitud sobre la superficie.

En un estudio para estudiar el efecto de la rugosidad de la superficie del Ti en la respuesta celular y la adsorción de las proteínas se encontró que la célula muy sensible a la rugosidad de la superficie es que la adhesión y la proliferación celular se incrementa con el incremento de la rugosidad; y utilizando la técnica XPS mostró que la albúmina se adsorbió en la superficie lisa y la superficie rugosa una mayor cantidad de las proteínas (la superficie rugosa une fibronectina 10 veces más de lo que une la superficie lisa); esta adsorción diferencial de las dos proteínas sobre superficies lisas y rugosas de aleación de Ti explica la diferencia en adhesión celular. (Deligianni et al, 2001)

(Martin et al, 1995) estudiaron el efecto de la rugosidad en la proliferación y la diferenciación de los osteoblastos utilizando la línea MG 63 sobre titanio; aplicaron cinco tratamientos y los clasificaron en cinco grupos según la rugosidad de la superficie menos rugosa al más rugosa. Encontraron una capa de óxido TiO_2 sobre todas las superficies estudiadas en un rango de 100 Å en la superficie menos rugosa hasta 300 Å en la superficie más rugosa; en la comparación de los cultivos celulares se encontró que el número de las células está reducido en la superficie más rugosa y incrementado en la superficie menos rugosa, cuando el número de células en los otros grupos era equivalente; La timidina de incorporación fue inversamente proporcional a la rugosidad superficial. La actividad específica de alcalina fosfatasa se disminuye con el aumento de la rugosidad superficial, con excepción de las células cultivadas en CA. Existe una correlación directa entre la rugosidad superficial y el ARN y la producción de CDP.

Se encuentra una relación directa entre la dimensión fractal con los resultados del área de contacto.

Analizando los datos se encontró que los cambios en la dimensión fractal y el área de contacto coinciden con la humectabilidad la que se presenta por el ángulo de contacto.

Los resultados del cultivo celular presentada en el numero de las células pegadas demuestra una relación directa con la humectabilidad y la topografía de la superficie.

La modificación de la superficie del titanio cuando se expone a la HF está influenciada tanto por el tiempo de exposición y la topografía de la superficie inicial. Un buen control de estos dos parámetros da la mejor reproducibilidad de este método de modificación de la superficie. (Lamolle et al, 2009b).

Entra el flúor en la estructura ósea y dental, y varias investigaciones estudiaron su efecto en la adhesión celular y la osteoconducción, pero aún no se puede confirmar el papel que puede jugar en la adhesión celular.

VI. Conclusiones

El grabado ácido mejora las propiedades de la superficie, y el tiempo de grabado afecta todas las propiedades de la superficie.

- La masa ha sufrido una pérdida de una forma lineal en función del tiempo.
- Los parámetros de rugosidad (R_a , R_q , R_p , R_v , R_t) demostraron un incremento en función del tiempo, aunque a partir de los 5 min de grabado ácido no hubo cambio significativo, $R_{kumayorde3}$, el control tuvo el valor más grande, después baja de una forma lineal hasta que iguale a 3 (superficie gaussiana) en el último grupo

(grabado por 10 min) , teniendo a un dominio igualado de los picos y valles en la superficie, R_{sk} es menor de cero en todas las superficies estudiadas aunque se acerca al cero cuando se graba la muestra durante 10 minutos; esto también se explica por el efecto de grabado ácido en la superficie lisa transformándola en una superficie agujerada con muchos picos y valles.

- La morfología se cambia de tener una superficie lisa con pocas irregulares en el control a una superficie agujerada con picos y valles en la muestra grabada, aunque este cambio está más claro a partir de los 5 minutos de grabado.
- La dimensión fractal se incrementó mucho en la muestra grabada y tuvo su valor máximo a los 7min de grabado.
- La química de la superficie tuvo cambios cualitativo y cuantitativo, el aluminio aparece solo en el control, el floró aparece solo en el segundo grupo, se notó una contra posición entre el oxígeno y el carbono.
- La humectabilidad ha sido mejor en la muestra grabada y tuvo su mejor valor entre 5 y 7min de grabado.
- Los resultados del cultivo celular coinciden con los resultados de la humectabilidad. Las células están más crecidas y desarrolladas en el cuarto y el quinto grupo de la muestra (grabadas por 5min, y 7min).

Referencias

Abrahamsson T, Berglundh E, Linder N.P, Lang J, Lindhe. Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clin Oral. Implants Res.* 2004;15:381–392.

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.

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 Mater Sci:Mater Medic.* 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.

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.

Blanco J, Alves CC, Nuñez V, Aracil L, Muñoz F, Ramos I. Biological width following immediate implant placement in the dog: flap vs. flapless surgery. *Clinical oral implants research.* 2010; 6:624-31.

Bonewald LF, Kester MB, Schwartz Z, Swain LD, Khare A, Johnson TL, Leach RJ, Boyan BD. Effects of combining transforming growth factor beta and 1, 25-dihydroxyvitamin D3 on differentiation of a human osteosarcoma (MG-63). *J Biolog Chem.* 1992;13:8943-9.

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

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* 1985;16:1-175.

Broberg M, Eriksson C, Nygren H. GpIIb/IIIa is the main receptor for initial platelet adhesion to glass and titanium surfaces in contact with whole blood. *J Lab Clin Med* 2002;139:163-72.

Brunski JB. In vivo bone response to biomechanical loading at the bone/dental-implant interface. *Adva dent rech.* 1999;1:99-119.

Bugea C, Luongo R, Di Iorio D, Cocchetto R, Celletti R. Bone contact around osseointegrated implants: histologic analysis of a dual-acid-etched surface implant in a diabetic patient. *Inte J Periodon & Resto Dent.* 2008;2:145-51.

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

Chappard D, Aguado E, Huré G, Grizon F, Basle MF. The early remodeling phases around titanium implants: a histomorphometric assessment of bone quality in a 3- and 6-month study in sheep. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999;14:189-96.

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;3:240-252.

Collet P, De Coninck J, Dunlop E, Regnant A. Dynamics of the contact line: Contact angle hysteresis. *Physical review letters*. 1997; 10: 3704-3707.

L.F. Cooper, Y. Zhou, J. Takeba, J. Guo, A. Abron, A. Holmén, J.E. Ellingsen, Fluoride modification effects on osteoblast behaviour and bone formation at TiO₂ grit-blasted c.p. titanium endosseous implants, *Biomaterials*. 2006; 27:926-936.

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;1:95-96.

Davies E, Understanding Peri-Implant Endosseous, Healing. *J Dent Edu*. 2003; 8:932-949.

De Gennes P.G. Wetting:statics and dynamics. *Rev mod phys*. 1985; 3:827-863.

Deligianni DD, Katsala N, Ladas S, Sotiropoulou D, Amedee J, Missirlis YF. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials*. 2001;11:1241-51.

Deuel TF, Senior RM, Huang JS, et al. Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor. *J Clin Invest*. 1982;4:1046-9.

Elias CN, Titanium dental implants surfaces. *Matéria (Rio de Janeiro)*. 2010;2: 138-142, DOI 10.1590/S1517-70762010000200008.

Ellingsen J.E. A study on the mechanism of protein adsorption to TiO₂. *Biomaterials*. 1990;593-596.

Ericsson I, Nilner K. Early functional loading using Branemark dental implants. *int J Periodontics Rest Dent*. 2002;1:9-19.

Fini M, Giavaresi G, Torricelli P, Borsari V, Giardino R, Nicolini A, Carpi A. Osteoporosis and biomaterial osteointegration. *Biomed Pharmacother*. 2004;58:487-93.

Franchi M, Fini M, Martini D, Orsini E, Leonardi L, Ruggeri A, Giavaresi G, Ottani V. Biological fixation of endosseous implants. *Micron*. 2005;36:665-71.

E.S. Galdelmawla, M.M. Koura, T.M.A. Maksoud, I.M.I. Elewa, H.H. Soliman, Roughness parameters, *J. Mater. Process. Technol.* 2002;1:133-145.

Gallo JA, García EG, Pons MC, de Arriba CC, Calle GG. Efectos del FGF-1 en la osteointegración de implantes dentales: Estudio piloto en minipigs. *Revista española de cirugía oral y maxilofacial. Soci Espa Ciru Oral y Maxicial.* 2001;6:335-42.

Gapski R, Wang HL, Mascarenhas P, Lang NP. Critical review of immediate implant loading. *clinical oral implants research.* 2003;5:515-27.

Gil FJ, Sanchez LA, Espias A, Planell JA. In vitro corrosion behaviour and metallic ion release of different prosthodontic alloys. *Inter den j.* 1999;6:361-7.

Gomez-Monterrey I, Campiglia P, Carotenuto A, Califano D, Pisano C, Vesci L, Lama T, Bertamino A, Sala M, di Bosco AM, Grieco P. Design, synthesis, and cytotoxic evaluation of a new series of 3-substituted spiro [(dihydropyrazine-2, 5-dione)-6, 3'-(2', 3'-dihydrothieno [2, 3-b] naphtho-4', 9'-dione)] derivatives. *J medici chem.* 2007; 8:1787-98.

Martínez-González JM, Cano Sánchez J, Campo Trapero J, Martínez-González MJ, García-Sabán F. Diseño de los implantes dentales: Estado actual. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral.* 2002;3:129-36.

Gronowicz G, Mc Carthy MB. Response of human osteoblasts to implant materials: integrin-mediated adhesion. *J Orthop Res.* 1996;6:878-887.

Gruber R, Varga F, Fischer MB, et al. Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clin Oral Impl Res.* 2002;13:529-35.

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.

Guo J, Padilla RJ, Ambrose W, De Kok II, Cooper LF. The effect of hydrofluoric acid treatment of TiO₂ grit blasted titanium implants on adherent osteoblast gene expression in vitro and in vivo, *Biomaterials.* 2007;36: 5418-5425.

He F, Zhang F, Yang G, Wang X, Zhao S, Enhanced initial proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells on HF/HNO₃ solution treated nanostructural titanium surface, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.Endod.* 2010;4:13-22.

Hench LL. Bioactive materials: the potential for tissue regeneration. *J Biomed Mater Res.* 1998;4:511-518.

Hotchkiss KM, Reddy GB, Hyzy SL, Schwartz Z, Boyan BD, Olivares-Navarrete R Titanium surface characteristics, including topography and wettability, alter macrophage activation. *Acta Biomater.* 2016;31:425-34.

Hughes DE, Salter DM, Dedhar S, Simpson R. Integrin expression in human bone. *J Bone Miner Res.* 1993;8:527-33.

Johnson R.E, Dettre R.H. Wettability and contact angles. *Sur coll sci I.* 1969;6: 85-151.

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; 3:289-301.

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.

Jones FH. Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and

related biomaterials. Surf Sci Reports. 2001;42:75-205.

Khan R, Kim SW, Kim TJ, Nam CM. Comparative study of the photocatalytic performance of boron–iron Co-doped and boron-doped TiO₂ nanoparticles. Materials Chemistry and Physics. 2008;1:167-72.

Kasemo B. Biological surface science. Surface science. 2002;1:656-77.

Kieswetter K, Schwartz Z, Dean DD, Boyan BD. The role of implant surface characteristics in the healing of bone. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. 1996 ;4:329-45.

Korotin DM, Barkowski S, Kurmaev EZ, Meumann M, Yakushina EB, Valiev RZ, Cholakh, Surface characterization of titanium implants treated in hydrofluoric acid. J. Biomat. Nanobiotech. 2012; 3: 87-91.

Kubiak KJ, Wilson MC, Mathia TG, Carras S. Dynamics of contact line motion during the wetting of rough surfaces and correlation with topographical surface parameters. Scanning. 2011;5:370-7.

Lamolle SF, Monjo M, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Haugen HJ, Titanium implant surface modification by cathodic reduction in hydrofluoric acid: surface characterization and *in vivo* performance, J. Biomed. Mat. Res. 2009;3:581–588.

Lamolle SF, Monjo M, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Haugen HJ, Rubert M, The effect of hydrofluoric acid treatment of titanium surface on nanostructural and chemical changes and the growth of MC3T3-E1 cells, Biomaterials.2009;5: 736-742.

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; 1:99-108.

Larsson C. The interface between bone and implants with different surface oxide properties. Appl Osseointegr Res. 2000;1:9-14.

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. *Sur charact biom*. Am: Elsevier. 1988; 161-74.

Lausmaa J, Hall. Properties of a new porous oxide surface on titanium implants. *Appl Osseo Res* 2001;1:5-8.

Lautenschlager E.P, Monaghan P. Titanium and titanium alloys as dental materials. *Int Dent J*. 1993;43:245-253.

Lawande S A, Lawande G S, Surface Modification of Titanium Endosseous Dental Implants and its Influence on Osseointegration: An Overview, *Bri Bio bul*. 2016;2:44-54.

Lind M. Growth factor stimulation of bone healing: effects on osteoblasts, osteomies, and implant fixation. *Acta Orthop Scand Suppl* 1998;28:32-37.

Lucas PA, Caplan AI. Chemotactic response of embryonic limb bud mesenchymal cells and muscle-derived fibroblasts to transforming growth factor-beta. *Connect Tissue Res* 1988; 1:1-7.

Lumetti, S., Manfredi, E., Ferraris, S. et al. *J Mater Sci: Mater Med*. 2016; 27: 68. doi:10.1007/s10856-016-5678-5.

Mandelbrot BB. *The fractal geometry of nature*. Macmillan; 1983.

Martin, J. Y., et al. "Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J biom mater res* (1995;3: 389-401.

Martínez-Ferrero E, Sakatani Y, Boissière C, Grosso D, Fuertes A, Fraxedas J, Sanchez C. Nanostructured Titanium Oxynitride Porous Thin Films as Efficient Visible-Active Photocatalysts. *Adv Fun Mater*. 2007;16:3348-54.

Meyer U, Joos U, Mythili J, Stamm T, Hohoff A, Fillies T, Stratmann U, Wiesmann HP. Ultrastructural characterization of the implant/bone interface of immediately loaded dental implants. *Biomaterials*. 2004;25:1959-67.

Misch CE, Perel ML, Wang HL, Sammartino G, Galindo-Moreno P, Trisi P, Steigmann M, Rebaudi A, Palti A, Pikos MA, Schwartz-Arad D. Implant success, survival, and failure: the International Congress of Oral Implantologists (ICOI) pisa consensus conference. *Implant dentistry*. 2008;1:5-15.

Monjo M, Lamolle SF, Lyngstadaas SP, Ronold HJ, Ellingsen JE. In vivo expression of osteogenic markers and bone mineral density at the surface of fluoride-modified titanium implans. *Biomaterials*. 2008; 29:3771-3780.

Mosser A, Speisser C, Muster D. Surface physics method for biometerials characterisation. *Biomaterials: Hard tissue repair and replacement*. Amsterdam: Elsevier science publishing. 1992.

Murai K, Takeshita F, Ayukawa Y, Kiyoshima T, Suetsugu T, Tanaka T. Light and electron microscopic studies of bone-titanium interface in the tibiae of young and mature rats. *J Biomed Mater Res*. 1996;30:523-33.

Nahringbauer I. Dynamic surface tension of aqueous polymer solution, I: Ethyl(hydroxyethyl)cellulose (Bermocoll cst- 103). *J coll inter sci*. 1995;176: 318-328.

M. Nakagawa, S. Matsuya, K. Udoh. Corrosion behavior of pure titanium and titanium alloys in fluoride-containing solutions, *Dent. Mater. J*. 2001; 20:305-314.

Nanci A, McKee M.D, Zalzal S, Sakkal S. Ultrastructural and immunocyto chemical 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: Harv Society adva orth. 1998; 487-500.

H Naujokat, B Kunzendorf an, J Wiltfang. Dental implants and diabetes mellitus—a systematic review. *Int J Imp Dent*. 2016;1:1.

Neumann A.W. and Good R.J. Techniques of measuring contact angles. *Surface and colloid science*. 1979;11: 31-91.

Neumann A.W. y Spelt J.K. *Applied surface thermodynamics*. Marcel Dekker Inc. 1996.

Nikkhah M, Edalat F, Manoucheri S, Khademhosseini A. Engineering microscale topographies to control the cell–substrate interface. *Biomaterials*. 2012;21:5230-46.

Park JY, Davies JE. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clin Oral Imp Res* 2000;11:530-9.

Park JH, Gu L, Von Maltzahn G, Ruoslahti E, Bhatia SN, Sailor MJ. "Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications." *Nature materials* . 2009;4:331-336.

Pfeilschifter J, Wolf O, Naumann A, Naumann A, Minne HW, Mundy GR, Ziegler R. Chemotactic response of osteoblast like cells to transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res*. 1990; 8:825-30.

Pontoriero, R., S. Nyman, and J. Lindhe. "The angular bony defect in the maintenance of the periodontal patient. *J clinical perio*. 1988;3: 200-204.

Probst A, Spiegel HU. Cellular mechanisms of bone repair. *J Invest Surg*. 1997;10:77-86.

Puleo D.A, Bizios R. RGDS tetrapeptide binds to osteoclasts and inhibits fibronectin mediated adhesion. *Bone* 1991;12:271-6.

Puleo DA, Nanci A. "Understanding and controlling the bone–implant interface." *Biomaterials*.1999;23: 2311-2321.

M. Rauscher,, S. Dietrich. Wetting Phenomena in Nanofluidics. *Ann Rev. Mat Resch*. 2008; 38: 143-172.

Reigosa DD, Garcia P, Raca D, Briz F, Lorenzo RD. Measurement and Adaptive Decoupling of Cross-Saturation Effects and Secondary Saliencies in Sensorless Controlled IPM Synchronous Machines. *Tra ind*. 2008;6:1758-1767.

Rigo ECS, Boschi AO, Yoshimoto M, Allegrini S Jr, Konig B Jr, Carbonari MJ. Evaluation *in vitro* and *in vivo* of biomimetic hydroxyapatite coated on titanium dental implants. *Mater Sci Eng C*. 2004;24:647-51.

Rodríguez-Ríus D, García-Sabán FJ. Physico-chemical characterization of the surface of 9 dental implants with 3 different surface treatments. *Med. Oral. Patol.Oral. Cir. Bucal* 2005;10:58-65.

Rodríguez-Valverde, M A., Francisco J. Ruiz-Cabelloa M, Pedro M. Gea-Jódara, Helmut K, Cabrerizo-Vílchez MA "A new model to estimate the Young contact angle from contact angle hysteresis measurements." *Coll Sur A: Physicochem Eng Aspects*. 2010;1: 21-27.

Rosales Leal JI, Rodríguez Valverde MA, Mazzaglia G, Ramón Torregrosa PJ, Díaz Rodríguez L, García Martínez O, Vallecillo Capilla M, C. Ruiz, M.A. Cabrerizo Vílchez, Effect of roughness, wettability and morphology of engineered titanium surfaces on osteoblast-like cell adhesion. *Coll Sur A, Physicochem. Eng. Aspects*. 2010; 365:222-229.

Rupp F, Scheideler L, Rehbein D, Axmann D, Geis-Gerstorfer J. Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications. *Biomaterials*. 2004; 25: 1429–1438.

Schwartz L, Garoff S. Contact angle hysteresis and the shape of the three-phase line. *J coll interf sci*. 1985;2: 422-437.

Schwartz Z, Braun G, Kohavi, Brooks B, Amir D, Sela J, Boyan B. Effects of hydroxyapatite implants on primary mineralization during rat tibial healing: biochemical and morphometric analyses. *J Biomed Mater Res*. 1993;8:1029-1038.

Seppa H, Grotendorst G, Seppa S, Schiffmann E, Martin GR. Platelet-derived growth factor is chemotactic for fibroblasts. *J Cell Biol*. 1982;2:584-8.

Shelton RM, Rasmussen AC, Davies JE. Protein adsorption at the interface between charged polymer substrata and migrating osteoblasts. *Biomaterials*. 1998;9:24-9.

Soballe K. Hydroxyapatite ceramic coating for bone implant fixation. Mechanical and histological studies in dogs. *Acta Orthop Scand Suppl*. 1993;255:1-58.

Sorokin DV, Mizotin MM, Krylov AS. Gauss-laguerre keypoints extraction using fast hermite projection method. *Intern Confe Image Analy Recogn*. 2011; 22: 284-293.

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.

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.

Sul, Y T; Byon, E; Wennerberg, A. Surface Characteristics of Electrochemically Oxidized Implants and Acid-Etched Implants: Surface Chemistry, Morphology, Pore Configurations, Oxide Thickness, Crystal Structure, and Roughness. *Int J Oral & Max Imp.* 2008;4:631-640.

Thomas, B.J., Zavitz, K.H., Dong, X., Lane, M.E., Weigmann, K., Finley, R.L., Brent, R., Lehner, C.F., Zipursky, S.L. roughex down-regulates G2 cyclins in G1. *Genes Dev.* 1997;10: 1289-1298.

Urist M R. Bone Formation by Autoinduction. *Science, New Series.* 1965; 3698:893-899.

Webster, JG, Phalen P F, Lichty LW, Ratings analysis: The theory and practice of audience research, 3rd edn. Mahwah, NJ: Lawrence Erlbaum. 2006.

A. Wennerberg, T. Albrektsson, C. Johansson, B. Andersson, Experimental study of turned and grit-blasted screw-shaped implants with special emphasis on effects of blasting material and surface topography, *Biomaterials.* 1996; 17: 15–22.

Wenzel R.N. Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Ind Eng Chem* 1936;8:988-994.

Weyant R J, Burt B A. An Assessment of Survival Rates and Within-patient Clustering of Failures for Endosseous Oral Implants. *J Den Res.* 1993;1:2-8 .

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.

Yukna RA, Callan DP, Krauser JT, Evans GH, Aichelmann Reidy ME, Moore K, Cruz R, Scott JB (1998) 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.* 69:655–663

Zigmond S.H. Signal transduction and actin filament organization. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:66-73.