

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

"NANORUGOSIDAD Y METILACIÓN  
SUPERFICIAL COMO FACTORES  
MODIFICADORES DEL  
COMPORTAMIENTO OSTEÓBLÁSTICO EN  
TÉRMINOS DE PROLIFERACIÓN,  
DIFERENCIACIÓN Y OSTEÓGÉNESIS"

MIGUEL PADIAL MOLINA

DIRECTORES

PROF. D. PABLO GALINDO MORENO

PROF. D. JUAN LUIS ORTEGA VINUESA

PROF. D. JUAN EMILIO FERNÁNDEZ BARBERO

GRANADA 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Miguel Padial Molina  
D.L.: GR- 2250-2010  
ISBN: 978-84-693-1332-9



# UNIVERSIDAD DE GRANADA

## FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



El trabajo de investigación que se expone en la siguiente Tesis, titulada “**Nanorugosidad y Metilación Superficial como Factores Modificadores del Comportamiento Osteoblástico en Términos de Proliferación, Diferenciación y Osteogénesis**”, ha sido realizado bajo nuestra dirección por Don Miguel Padial Molina durante el periodo de tiempo correspondiente entre los años 2007 y 2009.

Una vez redactada, la presente memoria ha sido revisada y es adecuada para ser presentada y permitir al doctorando aspirar al título de Doctor ante el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, se expide la presente en Granada a 16 de diciembre de 2009,

**Pablo Galindo Moreno**

Profesor Contratado Doctor  
Dpto. de Estomatología  
Facultad de Odontología  
Universidad de Granada

**Juan Luis Ortega Vinuesa**

Profesor Titular  
Dpto. de Física Aplicada  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Granada

**Juan Emilio Fernández Barbero**

Profesor Titular  
Dpto. de Anatomía y Embriología  
Humanas  
Facultad de Medicina  
Universidad de Granada



A mi madre



## AGRADECIMIENTOS

Al **Profesor Don Pablo Galindo Moreno**, director de esta Tesis, trabajador incansable, estudiante perpetuo y amigo incondicional. Su constante esfuerzo, apoyo y afán de mejora son un modelo perfecto a imitar. De muy pocas personas se puede decir que sean verdaderos maestros; él sin duda alguna lo es para mí. Menos personas aún se pueden considerar amigos y él también lo es.

Al **Profesor Don Juan Luis Ortega Vinuesa**, director de esta Tesis, por su apoyo constante e imprescindible para la realización de este trabajo. Es capaz de demostrarte que no todo en física es una compleja fórmula matemática. Sin su apoyo y entusiasmo no habría sido posible desarrollar este trabajo.

Al **Profesor Don Juan Emilio Fernández Barbero**, director de esta Tesis, que con su amplio conocimiento es capaz de hacer fácil lo que parece incomprendible. Las muchas horas compartidas en el laboratorio han hecho posible encontrar en él un buen amigo.

A la **Profesora Doña Elena Sánchez Fernández**, quién despertó en mi el interés por la Cirugía Bucal y que ha mantenido vivo mi afán de mejora y ampliación de conocimientos. Su amistad desde mi formación pregraduada ha sido un gran estímulo para mi avance.

Al Departamento de Anatomía Patológica dirigido por el **Profesor Don Francisco O'Valle Ravassa**, por su ayuda en la realización de las técnicas inmunohistoquímicas.

Al Departamento de Física Aplicada y, en concreto, al **Profesor Don Miguel Ángel Cabrerizo Vílchez** por su apoyo a este proyecto al permitirnos emplear sus laboratorios.

A **Don Pedro Ramón Torregrosa**, Becario del Departamento de Física Aplicada, por su gran ayuda en la realización de las modificaciones superficiales. No me hubiera sido posible entender un microscopio de fuerzas atómicas sin su ayuda.



A la **Profesora Doña Consuelo Melguizo Alonso**, por su inestimable ayuda en el Laboratorio del Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa.

Al personal del **Centro de Investigación Biomédica** por su paciencia y amabilidad.

A **Don Gustavo Ávila Ortiz** por demostrarme con su ejemplo que con trabajo duro se puede conseguir casi todo.

A **Don Antonio Batista** y **Doña Blanca Moreno**, por su amistad impagable. No es fácil encontrar personas tan agradables y cercanas con las que pasar tantas horas y liberar las tensiones del día a día.

A **Doña Ángela Rubio**, **Doña Concha Romero** y **Don Manuel Lora**. Los amigos de verdad son esos que aunque no tengas cerca, sabes que están ahí y cuando por fin los vuelves a ver parece que nunca os habéis separado. Su gran ayuda en los momentos difíciles y nuestras largas conversaciones me enseñaron que cuando no te gusta un camino, debes crearte otro.

A **mi familia**, sin necesidad de explicación alguna. Hay cosas para las que las palabras nunca son suficientes.

# *ÍNDICE*

No hay nada más profundo que la superficie.

Leonard Cohen (1934-). Poeta, novelista y cantante canadiense.



# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
1. Biocompatibilidad, Biomaterial y Toxicidad	8
2. El Tejido Óseo	14
3. Biodinámica del Tejido Óseo	34
4. Factores que afectan a la Osteointegración	39
5. La Sílice como Biomaterial	49
<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	<b>61</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>65</b>
1. Objetivo Primario	65
2. Objetivos Secundarios	65
<b>MATERIALES</b>	<b>69</b>
1. Obleas de Sílice	69
2. Modelo Celular Óseo	72
3. Material para Inmunohistoquímica	73
4. Material para Cultivo y Estudio de Proliferación Celular	78
5. Técnicas de Microscopía	81
<b>METODOLOGÍA</b>	<b>82</b>
1. Modificación de las Superficies de Sílice	82
2. Caracterización de las Superficies de Sílice	84
3. Preparación de Muestras para TEM y SEM	88

4. Cultivo de las Células	91
<b>RESULTADOS</b>	<b>101</b>
1. Caracterización de las Superficies de Sílice	101
2. Caracterización de la Línea Celular MG-63	103
3. Estudio de Proliferación Celular sobre Obleas de Sílice	104
4. Caracterización Morfológica tras Cultivo en Obleas de Sílice	106
5. Caracterización Inmunohistoquímica tras Cultivo en Obleas de Sílice	108
<b>FIGURAS Y TABLAS</b>	<b>113</b>
1. Figuras	113
2. Tablas	146
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>153</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>171</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>175</b>
<b>PRODUCCIÓN CIENTÍFICA GENERADA</b>	<b>205</b>
1. Abstracts de Congresos	205
2. Capítulos de Libros	206
3. Artículos Científicos	206

# ***INTRODUCCIÓN***

Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto y pensar lo que  
nadie más ha pensado.

Albert Szent-Györgi (1893-1986). Bioquímico húngaro-  
estadounidense.



## INTRODUCCIÓN

A pesar del éxito conseguido en todas las aplicaciones en las que se han empleado implantes osteointegrados existen todavía campos de investigación que pretenden obtener mejores respuestas al implante, a corto y a largo plazo. Debido a que este hecho se encuentra directamente relacionado con la respuesta que el tejido ofrezca al implante, así como a las interacciones mecánicas que se producen entre ellos, estas investigaciones se han dirigido fundamentalmente al estudio exhaustivo de la superficie del Ti c.p., el *gold standard* en cuanto a fabricación de implantes se refiere. Esto implica el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas y topográficas de la superficie del material y el desarrollo de nuevos diseños y procesos tecnológicos encaminados a la optimización de la respuesta tisular (Jones 2001). Entre éstos, tienen especial relevancia, por las muchas investigaciones realizadas al respecto que lo avalan, el aumento de la rugosidad y la aplicación de recubrimientos bioactivos u otros cambios en las propiedades fisicoquímicas.

Las propiedades de los implantes dentales pueden modificarse con objeto de mejorar la curación de la herida periimplantaria. Como es lógico pensar, son las propiedades de biocompatibilidad de un material las que determinan los fenómenos de adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular.



# **1. BIOCOMPATIBILIDAD, BIOMATERIAL Y TOXICIDAD**

La biocompatibilidad de un material para uso dental es un tema complejo que se basa en los conocimientos biológicos, en los factores de riesgo del paciente, en la experiencia clínica y en la ingeniería. A pesar de que la biocompatibilidad ha sido ignorada durante muchos años, actualmente se reconoce como requisito fundamental para cualquier material que deba interactuar con un tejido vivo.

## **1.1. CONCEPTO DE BIOCOMPATIBILIDAD**

La idea de verificar los materiales para uso humano con seguridad y eficacia antes de ser empleados es relativamente reciente. A mediados del siglo XIX se comenzaron a probar los nuevos materiales pero sin una verdadera protección del paciente sujeto de investigación, idea que tiene sólo unos 30-40 años. Desde entonces se comienza a exigir la adecuación a protocolos éticos y exámenes del material previos a su aplicación en los seres humanos. Para ello se han desarrollado y protocolizado gran variedad de procedimientos técnicos con el fin de intentar minimizar los riesgos que puedan sufrir los pacientes. Estas pruebas biológicas han evolucionado notablemente a lo largo de los últimos 40 años. Así, a medida que se han desarrollado las técnicas de cultivo celular, la investigación se ha ido centrando en los mecanismos que se encuentran implicados y/o modulan las respuestas biológicas a los materiales *in vitro*. En los últimos años se han comenzado a aplicar también las nuevas técnicas moleculares, genéticas y de imagen con objeto de obtener un conocimiento más profundo de la respuesta biológica frente a los

materiales. Dentro de éstos, y debido al gran avance en los conocimientos bioquímicos, moleculares y genéticos que subyacen en los fenómenos biológicos de proliferación, diferenciación y adhesión celulares, han venido incorporándose multitud de técnicas de análisis de dichos procesos. Actualmente, las pruebas de biocompatibilidad *in vitro* han alcanzado un punto en el que es posible predecir algunas de las propiedades biológicas *in vivo* e incluso es posible estudiar reacciones específicamente modificadas en base a esos materiales.

Una definición amplia de biocompatibilidad incluye una interacción entre el organismo y el material, que normalmente no se produce en otras situaciones y no es estática. La dinámica de interacción entre el material y el organismo va a determinar la respuesta biológica en base a la capacidad del material para resistir la degradación o la corrosión en el organismo, debiendo tenerse la seguridad de que no van a generar reacciones indeseadas. No es posible que un material insertado en el organismo sea inerte debido a que cada interfase biológica está activa dependiendo del material, el tiempo que lleva insertado, sus propiedades y las características propias del paciente en el que se inserta.

## **1. 2. BIOMATERIAL**

En general, un biomaterial es todo aquel material que puede ser utilizado en un organismo y que permite una respuesta celular, microbiana y del huésped que no impida la agregación, división, respuesta y migración celulares. Por tanto, un biomaterial es un compuesto diseñado para ser implantado o incorporado dentro de un sistema vivo. En este sentido el biomaterial se implanta con el objeto de sustituir o regenerar un tejido vivo y sus funciones, siendo sometido a

situaciones adversas dado que está expuesto de modo temporal o permanente a fluidos corporales. El biomaterial debe reaccionar en este ambiente produciendo el efecto deseado.

De este modo, es esencial entender las relaciones existentes entre las propiedades, funciones y estructuras de los biomateriales dado que éstas varían de acuerdo con la aplicación particular en la que se vaya a aplicar. Para nosotros es fundamental el estudio de la biomecánica, como encargada de analizar la mecánica y dinámica de los tejidos y las relaciones que existen entre ellos y los biomateriales.

El éxito de un biomaterial depende, por tanto, de dos factores principales: propiedades y biocompatibilidad del material en sí y condiciones del tejido receptor. Así, un biomaterial debe cumplir una serie de características, como son:

1. Ser biocompatible, es decir, debe ser aceptado por el organismo sin provocar el desarrollo de sistemas de rechazo.

2. No ser tóxico, ni carcinógeno.

3. Ser químicamente estable (no presentar degradación en el tiempo), aspecto que está siendo reconsiderado por la introducción de los conceptos de bioactividad y biomimética.

4. Resistencia mecánica.

5. Resistencia a la fatiga.

6. Densidad y peso adecuados.

7. Barato, reproducible y fácil de fabricar y procesar para su producción en gran escala.

### 1. 3. EFECTOS ADVERSOS A LOS MATERIALES

Existen una gran variedad de posibles reacciones biológicas adversas a los materiales que deben ser estudiadas con el fin de evitarlas. Se dividen en base a los análisis histopatológicos de los tejidos en los que se inserta el material. Pueden clasificarse en fenómenos de origen tóxico, inflamatorio, alérgico y/o mutagénico.

- *Toxicidad*: es uno de los primeros fenómenos que se producen frente a un material y que debe ser estudiado con el fin de evitarlo. Sus efectos se basan en la liberación por parte del material de una cantidad suficiente de sustancias capaces de generar respuestas tóxicas generales.
- *Inflamación*: es una respuesta biológica compleja que implica al sistema inmune, pudiendo ser causa o consecuencia de la toxicidad o de la alergia. Se caracteriza por la aparición de edema en el tejido con infiltración de células inflamatorias como los neutrófilos.
- *Alergia*: es una reacción de hipersensibilidad anormal, inadaptada y exagerada del sistema inmune ante sustancias que comúnmente son bien toleradas y que produce unos síntomas característicos como son una gran cantidad de anticuerpos del tipo IgE. La sucesiva exposición al mismo alérgeno producirá la liberación de mediadores químicos, en particular la histamina, que producirán los síntomas típicos de la reacción alérgica.
- *Mutagenicidad*: definida como la capacidad de un agente físico o químico para alterar o modificar de forma permanente las

características genéticas de un organismo por encima del nivel de aparición de forma natural.

#### **1. 4. PRUEBAS DE BIOCOMPATIBILIDAD**

Entre 1982 y 1987 el Council on Dental Materials, Instruments and Equipment del American National Standards Institute/American Dental Association (ANSI/ADA) aprobó su documento No. 41 indicando las prácticas estándar recomendadas para la valoración biológica de los materiales dentales, reconociendo la necesidad de disponer de métodos normalizados y de pruebas secuenciales de los materiales para reducir el número de productos que habría que probar en la práctica clínica, en base a resultados *in vitro*.

Existen tres tipos básicos de pruebas de biocompatibilidad: pruebas *in vitro* y pruebas *in vivo*, que incluyen pruebas en animales y pruebas en humanos. Otra clasificación es:

1. Pruebas iniciales: Ensayos *in vitro* e *in vivo* de citotoxicidad, hemólisis, prueba de Ames (estudio del potencial de mutación), prueba de Styles (transformación celular), toxicidad sistémica vía oral, toxicidad sistémica vía peritoneal y pruebas de inhalación aguda.

Las pruebas *in vitro* deben ser siempre las primeras pruebas de evaluación de un material nuevo. Consisten en poner en contacto un material con algún sistema biológico que puede consistir en células, orgánulos celulares, tejidos, bacterias, etc. Generalmente las pruebas se hacen por contacto directo, lo que implica la exposición directa del material al sistema biológico. Este tipo de pruebas pueden dividirse en las

que miden la muerte o proliferación celular, las que determinan la función celular y aquellas que evalúan la integridad genética de las células expuestas, estando muchas veces imbricadas todas o algunas de ellas. Las pruebas *in vitro* tienen varias ventajas en comparación con las pruebas en animales. En primer lugar, son relativamente rápidas, baratas y fáciles de estandarizar. Además, pueden utilizarse para la realización de estudios a gran escala y pueden controlarse las condiciones necesarias para realizar las mediciones. La principal desventaja es la dificultad en la extrapolación de resultados a los sistemas *in vivo* ya que no existe la compleja coordinación presente en el organismo entre el sistema inmune, inflamatorio, circulatorio, etc.

2. Pruebas secundarias: Basándose en el resultado de las pruebas iniciales, los materiales que resultan prometedores son sometidos a una o más pruebas en pequeños animales (*in vivo*) para estudiar su potencial inflamatorio, inmunógeno, tóxico, mutagénico o carcinógeno. No es necesario que el material cumpla su función prevista o específica. Incluyen pruebas de irritación mucosa, toxicidad dérmica, implantación subcutánea, implantación en hueso e implantación intramuscular. La ventaja de todas ellas es la capacidad para permitir el estudio de la respuesta al material de un sistema biológico complejo. Sin embargo, estas pruebas son costosas y difíciles de controlar, además de ser controvertidas pero necesarias en cuanto a la ética de estudios posteriores en humanos se refiere. La extrapolación de resultados ha de ser considerada en función de la especie animal empleada.

3. Pruebas de uso: Los materiales que superan las pruebas anteriores son sometidos a estas pruebas de uso *in vivo*, aplicándolos en su contexto

previsto simulado en animales. Estas pruebas permiten identificar todos los efectos de los materiales sobre los tejidos en los que se vayan a utilizar. Se diferencian de las anteriores en que el material debe cumplir en el animal la misma función que tendrá en las personas simulando las condiciones clínicas en las que está previsto emplear el material que se está estudiando. La relevancia de estas pruebas, por tanto, va a depender de la calidad con que se imita la situación clínica en cuanto a tiempo, zona de inserción, medio clínico, etc. Finalmente se procede a su estudio en humanos mediante pruebas y ensayos clínicos, que como es lógico, tienen una serie de requerimientos éticos y legales a veces difíciles de cumplir pero sin duda imprescindibles.

## **2. EL TEJIDO ÓSEO**

El tejido óseo es un tipo especializado de tejido conectivo constituyente principal de los huesos en los vertebrados. El tejido óseo está compuesto por células y componentes extracelulares calcificados que forman la matriz ósea. Se caracteriza por su rigidez y su gran resistencia tanto a la tracción como a la compresión. A pesar de su dureza y resistencia posee cierta elasticidad. Posibilita la acción mecánica de la musculatura como sitio de inserción y sostén del peso para los músculos y le da rigidez al organismo para protegerlo de la fuerza de gravedad. Además, protege órganos vitales y alberga la médula ósea hematopoyética. El hueso sirve también como reservorio de calcio (el 99% del  $\text{Ca}^{2+}$  del organismo), fósforo y otros iones.

## **2. 1. MATRIZ EXTRACELULAR**

### **2. 1. 1. Fase orgánica**

La matriz orgánica representa el 35% del peso óseo deshidratado. Está formada en un 90% por colágeno tipo I incluido en una sustancia fundamental rica en proteoglicanos (Termine 1993).

En el hueso maduro las fibras colágenas se disponen en láminas paralelas (hueso laminar) pero en cada lámina las fibras forman un ángulo agudo con respecto a las de las láminas contiguas. Esta disposición determina que al observar hueso laminar mediante luz polarizada (Imagen 1) se alternen láminas claras de aspecto brillante o birrefringentes (orientadas perpendicularmente a luz) con las oscuras o no birrefringentes (orientadas en ángulo más o menos agudo con respecto a la luz polarizada) (Bullough & Vigorita 1996, Gonzalez Macias & Serrano Figueras 1995, Gurley & Roth 1992). Estudios recientes ponen en duda esta concepción clásica sugiriendo que la alternancia de láminas claras y oscuras podría deberse a diferentes densidades de fibras y no a una distinta orientación de éstas (Crofts y cols. 1994).



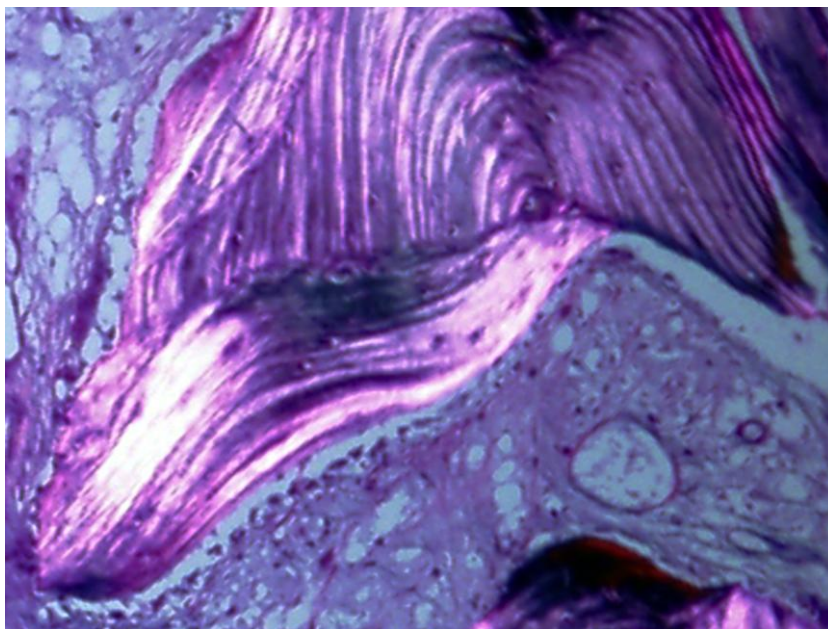


Imagen 1: Láminas birrefringentes de color claro que se alternan con láminas paralelas de color oscuro (PAS 100X). Obsérvese además las diferentes direcciones por grupos de fibras.

En el hueso embrionario o inmaduro las fibras se disponen de manera desordenada (hueso plexiforme). Cuando este tipo de hueso se observa mediante luz polarizada no muestra alternancia de bandas claras y oscuras sino un aspecto finamente fibrilar (Bullough & Vigorita 1996, Gonzalez Macias & Serrano Figueras 1995, Gurley & Roth 1992). Este aspecto es debido a que sólo brillan las escasas fibras colágenas que al azar han quedado dispuestas perpendicularmente a la luz polarizada. En el esqueleto adulto normal el hueso plexiforme prácticamente ha desaparecido, pero puede formarse de nuevo si se acelera la producción de matriz (callos de fractura, tumores óseos...).

Un componente muy importante de la matriz ósea que no se halla mineralizada y constituye menos del 1% en volumen del total se denomina osteoide (Bullough & Vigorita 1996, Gonzalez Macias & Serrano Figueras 1995, Gurley & Roth 1992). El osteoide puede observarse en forma de finos ribetes de unas 10 micras de espesor (Imagen 2) que revisten la superficie de algunas trabéculas y tapizan algunas cavidades intracorticales.

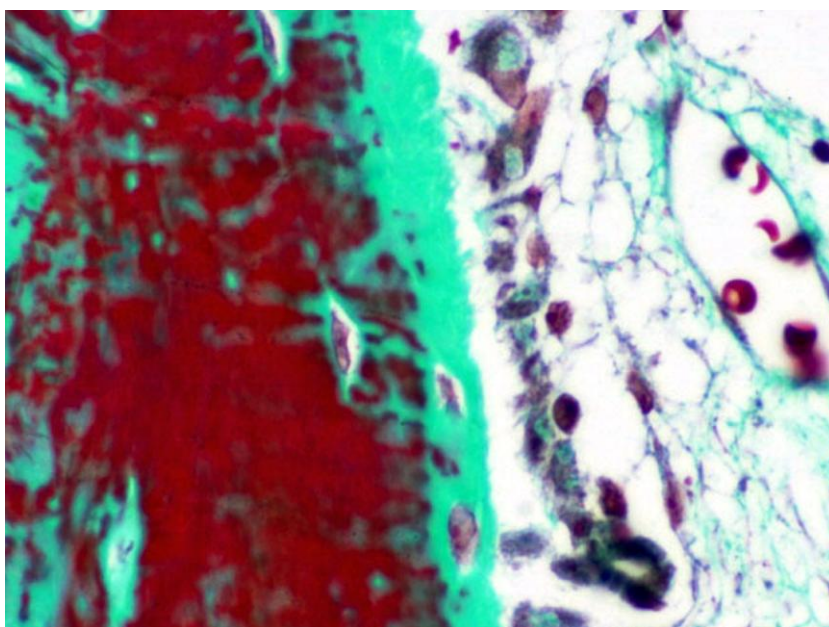


Imagen 2: Ribete de osteoide (franja verde) sobre hueso mineralizado (rojo) (Tricrómico de Masson 200X). Obsérvese la cercanía de un vaso sanguíneo y la disposición del frente de mineralización.

Otra parte de la matriz orgánica, con mayor interés biológico que el propio colágeno, está compuesta por proteínas derivadas del suero (albúmina y alfa<sub>2</sub>-HS glicoproteínas), proteínas con ácido alfa-carboxiglutámico, glicoproteínas y factores de crecimiento. Esta matriz

constituye el almacén para la sedimentación de los cristales de fosfato cálcico y actúa como medio de unión a superficies libres (línea de reabsorción ósea, biomateriales, etc.). En la Imagen 3 se encuentran clasificadas las principales proteínas no colágenas de la matriz extracelular (Torres García-Denche 2006, Tresguerres 1999).

<b>Proteoglicanos</b>	Condroitín-sulfato Decorina Biglicano Hialuronato
<b>Proteínas con ácido <math>\gamma</math>-carboxiglutámico</b>	Osteocalcina
<b>Glicoproteínas</b>	Osteonectina Fosfatasa alcalina Proteínas con RGD: Fibronectina Trombospondina Osteopontina Vitronectina Sialoproteínas óseas
<b>Proteínas del plasma</b>	Albúmina 2-HS-glicoproteína
<b>Factores de crecimiento</b>	IGF-I y II PDGF TGF- $\beta$ FGF

Imagen 3: Proteínas no colágenas de la matriz extracelular ósea.

Las proteínas de la matriz extracelular modulan la mineralización y la unión de las células a la propia matriz. En esta unión, la principal molécula que interviene es la fibronectina, pero también existen otras moléculas de unión como la vitronectina, laminina, osteopontina, osteonectina y trombospondina. La matriz extracelular también proporciona señales reguladoras, ofreciendo una superficie de anclaje para determinadas proteínas como las Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMPs) y otros factores de crecimiento.

De todas las proteínas de la matriz extracelular, las más importantes son:

- La *osteocalcina* es una proteína de la matriz sintetizada por los osteoblastos y plaquetas, dependiente de las vitaminas D y K. Su función es la de ligar calcio durante el proceso de mineralización. Es una proteína específica del hueso pero se produce en etapas finales de la osteogénesis demostrando con su presencia una fase avanzada de la diferenciación celular.
- La *osteonectina* es una glicoproteína con gran afinidad por el colágeno tipo I, por el calcio y por la hidroxiapatita. Se caracteriza por favorecer primero la adhesión y posteriormente la agregación celular.
- La *fosfatasa alcalina* es una enzima que libera el fosfato inorgánico necesario para la mineralización, catalizando la hidrólisis de ésteres de fosfato a pH alcalino.

- Proteínas con el tripéptido RGD: *fibronectina*, *trombospondina*, *osteopontina*, *vitronectina* y *sialoproteínas óseas*. Son glicoproteínas con la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) específica para la unión a las integrinas, receptores celulares de superficie que permiten la adhesión de las células a la matriz extracelular.
  - La *fibronectina* es producida en cartílago, hueso y médula ósea. Participa en la organización de la matriz osteoide una vez sintetizada por los osteoblastos.
  - La *trombospondina* se halla en plaquetas y tejido óseo y sirve para facilitar la adhesión de las células a la matriz extracelular.
  - La *osteopontina* está presente en riñón, hueso, médula ósea y cerebro. Se une fuertemente a la hidroxiapatita (HA).
  - La *vitronectina* es una proteína del hígado que además se sintetiza en el hueso sirviendo como medio de anclaje celular. Es una de las proteínas más relevantes en la adhesión a superficies biocompatibles.
  - La *sialoproteína ósea* se combina con la hidroxiapatita y permite el anclaje de las células óseas a la matriz.
- *Proteoglicanos*: condroitín-sulfato, biglicano, decorina, queratán-sulfato y ácido hialurónico. Se localizan en la matriz extracelular y la mantienen hidratada pudiendo generar geles con poros de diferente tamaño, por lo que pueden intervenir como filtro selectivo en la regulación del tráfico de moléculas y de células,

seleccionándolas en función de su tamaño, su carga o ambas propiedades. Además se pueden asociar entre sí y con otros elementos de la matriz extracelular como el colágeno y con redes proteicas de la lámina basal formando enormes complejos poliméricos. En la membrana plasmática pueden actuar como correceptores colaborando con otros receptores de la superficie celular, tanto en la unión celular a la matriz extracelular como iniciando las respuestas de las células a algunas proteínas de señalización, pudiendo modular esta respuesta. Los proteoglicanos desempeñan un papel importante en la señalización celular. También se unen y regulan las actividades de otros tipos de proteínas de secreción, como enzimas proteolíticas y sus inhibidores.

### **2. 1. 2. Fase inorgánica**

Supone el 65% del peso del hueso en seco. Su síntesis es un proceso organizado, mediante el cual se deposita fosfato cálcico, que se encuentra en el medio extracelular en forma de solución sobresaturada sobre la malla osteoide.

Esta parte del tejido óseo está formada sólo por sales minerales entre las que se encuentran el calcio, fosfato y carbonato (10:6:1) en forma de pequeños cristales hexagonales de hidroxiapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ . También se han encontrado iones nitrato, magnesio y sódico. El fosfato cálcico se deposita primero como fosfato cálcico amorfo, para posteriormente ser reorganizado a nivel molecular con lo que se convierte en hidroxiapatita. En su forma final forma placas que se disponen paralelas y asociadas a las fibras colágenas. El proceso está favorecido

por la actuación de diversas proteínas con capacidad adhesiva, principalmente la fosfatasa alcalina que inicia la cristalización del calcio y el fósforo. También intervienen otras proteínas secretadas por los osteoblastos como la osteopontina, la osteonectina y la sialoproteína ósea.

Las propiedades físicas de dureza, resistencia, elasticidad y poco peso se deben a la combinación de esta fase inorgánica con la parte orgánica. Si del hueso eliminamos la materia inorgánica (descalcificación del hueso), pierde su dureza pero se mantiene flexible. Si se elimina la materia orgánica (calcinación del hueso), mantiene la forma pero es muy frágil. De la matriz inorgánica depende, por tanto, la dureza y de la orgánica la resistencia y la elasticidad. Independientemente de su fuerza y resistencia, el hueso es un material vivo que se renueva continuamente y experimenta una permanente remodelación, gracias, en parte, a los componentes celulares presentes tanto en su porción mineralizada como no mineralizada.

## **2. 2. COMPONENTES CELULARES**

En el tejido óseo podemos distinguir cinco tipos celulares principales (Applegate 1995, Van de Graaff 1998):

### **2. 2. 1. Células osteoprogenitoras**

Son células de origen mesenquimal no especializadas, como en todos los tejidos conectivos. A partir de estas células mesenquimales, que se comprometen hacia una diferenciación en células formadoras de hueso, se forma una colonia celular con potencial más limitado para proliferar y diferenciarse, constituyendo las células osteoprogenitoras. Estas células osteoprogenitoras tienen potencial para diferenciarse hacia condroblastos,

osteoblastos y adipocitos en base a estimulaciones específicas. Persisten hasta la vida postnatal encontrándose en casi todas las superficies libres de los huesos (endostio, capa interna del periostio, canales de Havers y trabéculas de cartílago calcificado). Suelen tener forma de huso y sus orgánulos Retículo endoplásmico rugoso (RER) y Aparato de Golgi están poco desarrollados. Poseen un núcleo oval y ribosomas libres.

Durante la fase de crecimiento de los huesos, las células osteoprogenitoras son más activas, aunque también aumenta su actividad ante el fenómeno de reparación de lesiones óseas.

### **2. 2. 2. Osteoblastos**

Son células cuya función principal es la formación del tejido óseo. Se encuentran en contacto directo con las superficies óseas formando grupos compactos de una sola capa de espesor. De manera característica el núcleo de estas células se sitúa en el extremo más alejado de la superficie ósea sobre la que asientan. Son células grandes de unas 40  $\mu\text{m}$  de diámetro de forma poliédrica, con un gran RER, citoplasma basófilo y ricas en una isoenzima específica de la fosfatasa alcalina. A medida que segregan los materiales de la matriz ósea y ésta se mineraliza, quedan atrapados en la misma convirtiéndose en osteocitos.

Los osteoblastos proceden de células osteoprogenitoras provenientes del periostio y la médula ósea que se transforman en preosteoblastos y son inducidos a la diferenciación a través de distintos factores de crecimiento, principalmente las proteínas morfogenéticas óseas, la hormona paratiroidea y la vitamina D. Otros factores del crecimiento como el factor del crecimiento fibroblástico, el PDGF y el



TGF- $\beta$  pueden promover también el fenómeno de osteogénesis. El factor sistémico que de manera más potente induce *in vivo* la diferenciación y proliferación de las células del linaje osteoblástico es la hormona paratiroidea (PTH). Los osteoblastos poseen receptores para la PTH, pero algunos de los efectos de la hormona sobre éstas células son probablemente mediados por factores locales. La PTH actuaría sobre las células del linaje osteoblástico estimulando la producción de factor de crecimiento relacionado con la insulina tipo I (IGF-I) (Pfeilschifter y cols. 1995, Watson y cols. 1995). Este factor local a su vez estimularía la proliferación de los osteoblastos y sus precursores por un mecanismo autocrino. Además de la PTH, otros factores sistémicos como la 1-25 dihidroxivitamina D<sub>3</sub> y numerosos factores locales (IL-1, TNF y TGF- $\beta$  entre otros) afectan *in vitro* la función de los osteoblastos (Puzas 1993).

Además de secretar diversos componentes de la matriz como el colágeno tipo I, proteoglicanos, osteocalcina, fosfatasa alcalina, osteonectina y osteopontina, los osteoblastos también pueden producir factores de crecimiento que dan lugar a importantes efectos autocrinos y paracrinos sobre el crecimiento óseo. A través de la síntesis de citoquinas específicas median en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos (RANK-L) y en la hematopoyesis [Factor Estimulante del Crecimiento de colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-C SF) y de Macrófagos (M-C SF)] (Jilka 1998, Torres García-Denche 2006).

Durante el depósito activo de matriz los osteoblastos se disponen formando el borde osteoide o frente de mineralización. Estos osteoblastos son células cúbicas o prismáticas que emiten prolongaciones cortas y finas que se unen entre sí mediante uniones íntimas o de tipo nexo. A

microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Imagen 4) se observa que los osteoblastos presentan gran cantidad de ribosomas libres, un RER dilatado, un Aparato de Golgi muy desarrollado y gran cantidad de mitocondrias que acumulan los gránulos de fosfato cálcico. Estos gránulos al salir al exterior de la célula se transforman en la vesícula de calcificación, que al unirse a las fibras de colágeno provocan la mineralización de la matriz. Estas células contienen además gran cantidad de enzimas como la glucosa-sintetasa y la collagenasa.

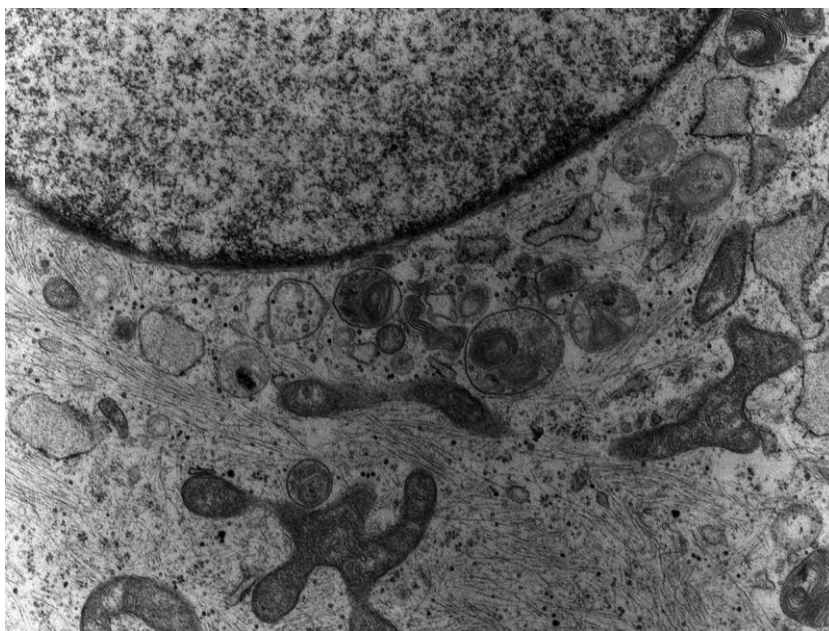


Imagen 4: Detalle de un osteoblasto. Cercano al núcleo, se observa el Aparato de Golgi de contenido gris claro. El resto del citoplasma está ocupado por el RER y vesículas diversas (TEM 9100X).

Tanto *in vivo* como *in vitro* los osteoblastos pasan sucesivamente por tres estadios funcionales (Lian & Stein 1992, Owen y cols. 1990, Stein & Lian 1992):

a) Proliferación celular y síntesis de los componentes orgánicos de la matriz ósea. Coincide con la expresión de los genes c-fos, c-jun, histona H4, colágeno tipo I, fibronectina y TGF- $\beta$ .

b) Maduración de la matriz ósea promoviendo cambios en la composición y organización de la matriz que la hacen susceptible de ser mineralizada. Éste es el momento de actividad de la fosfatasa alcalina.

c) Depósito de mineral. Durante esta fase se expresan la sialoproteína ósea, la osteopontina y la osteocalcina.

### **2. 2. 3. Osteocitos**

Los osteoblastos que quedan en el espesor de la matriz adquieren aspecto estrellado y pasan a denominarse osteocitos (Imagen 5). Estas células se hallan en contacto entre sí y con las células de la superficie (células de revestimiento y osteoblastos) mediante finas prolongaciones tubulares de su citoplasma que recorren la matriz ósea en diversas direcciones. La cavidad de la matriz ósea que contiene el cuerpo celular del osteocito se denomina laguna osteocitaria y los diminutos canalículos que albergan sus prolongaciones citoplásmicas reciben el nombre de conductos calcóforos. Los conductos calcóforos forman un sistema lleno de líquido intersticial que proporciona vías de intercambio de metabolitos entre las células y el espacio perivascular más próximo donde deberá existir un vaso sanguíneo a menos de 100  $\mu\text{m}$  que permita su supervivencia. Su función es la de mantener las actividades celulares del tejido óseo, como el intercambio de nutrientes y productos de desecho, así como medio de intercomunicación con el resto del tejido óseo a través de las prolongaciones que atraviesan la matriz mineralizada. Los osteocitos

no intervienen en la síntesis de matriz, pero sí en su mantenimiento. Además liberan calcio a la sangre participando en la regulación del calcio en los líquidos orgánicos.

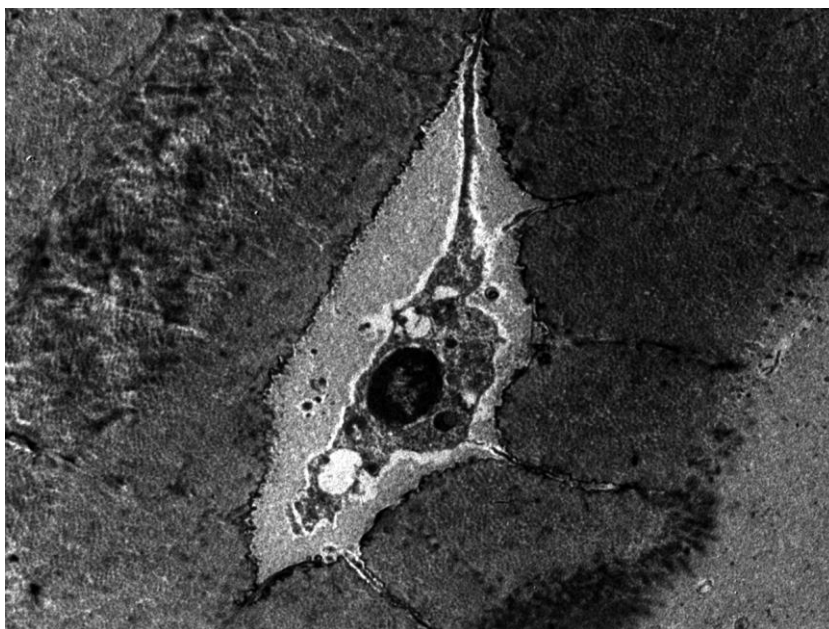


Imagen 5: Osteocito en el interior de una laguna. La matriz ósea mineralizada es oscura. Se observan las prolongaciones del cuerpo celular penetrando en el interior de varios conductos calcóforos (TEM 5500X).

El estudio ultraestructural de los osteocitos revela que presentan un Aparato de Golgi y un RER menos desarrollado que los osteoblastos. Estas organelas se concentran en el cuerpo celular alrededor del núcleo. En los puntos de contacto entre las prolongaciones citoplásmicas se observan uniones tipo "gap" en las que existen pequeños canales intercelulares que permiten el paso de una a otra célula de iones inorgánicos y moléculas hidrosolubles como aminoácidos, azúcares, nucleótidos y vitaminas que posibilitan la comunicación intercelular.

Morfológicamente pueden presentarse en tres estados funcionales: latentes (incluidos en la matriz calcificada), formativos y resorptivos (eliminando matriz ósea, mecanismo conocido como osteolisis osteocítica).

La situación de los osteocitos es ideal para detectar el estrés mecánico y las microlesiones de la matriz pudiendo transmitir señales a las células de revestimiento que utilizarían la información recibida para modular localmente el remodelado (Aubin y cols. 1993).

#### **2. 2. 4. Osteoclastos**

Son células multinucleadas (Imagen 6). Presentan un citoplasma acidófilo con numerosas vesículas (Gonzalez Macias & Serrano Figueras 1995). Se disponen sobre las superficies óseas de manera aislada o en grupos poco numerosos.

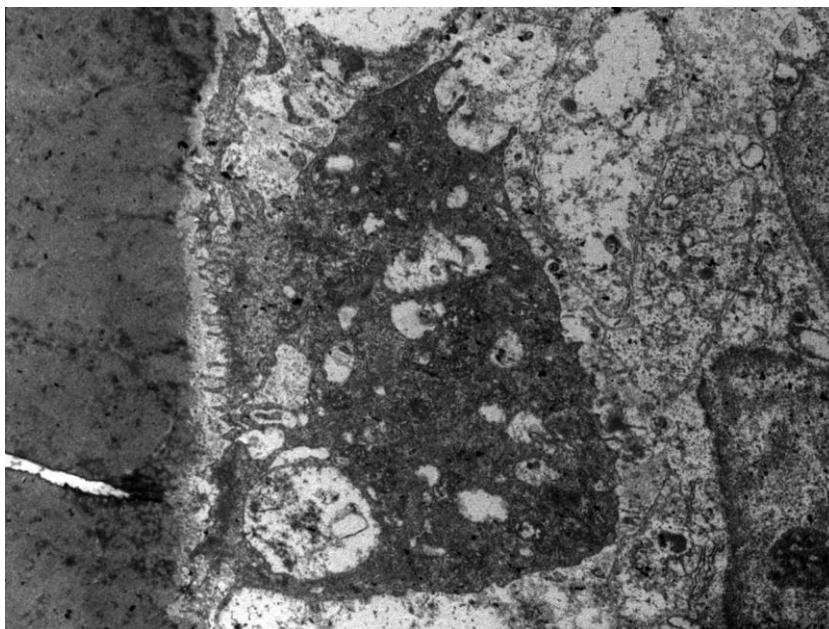


Imagen 6: Osteoclasto activo. Obsérvese el borde en cepillo en la parte central y la zona de sellado en ambos márgenes (TEM 4500X).

Constituyen el sistema fagocítico (macrófago específico) del hueso. Se pensaba que procedían de la fusión de células osteoprogenitoras de la sangre, aunque hoy se sabe que proceden de la unión de monocitos que se fusionan y emigran al tejido óseo. Derivan de las células madre hematopoyéticas a través de células formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos (CFU-GM). La proliferación de estas células es activada por el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). Los preosteoclastos son células dotadas de un solo núcleo que se adhieren a las superficies óseas y al fusionarse entre sí dan lugar a los osteoclastos (Parfitt 1994) gracias a la expresión en su membrana de moléculas de adhesión pertenecientes a la familia de las caderinas. Desde la médula ósea pueden pasar también a la circulación, de forma que para que puedan

regresar por diapédesis al microambiente óseo deben adherirse a las células endoteliales, gracias a que los osteoclastos y sus precursores expresan en su membrana una proteína denominada anexina II (Parfitt 1994). Es probable que los osteoclastos que intervienen en la remodelación del hueso cortical procedan de precursores circulantes que hayan emigrado del interior de los capilares sanguíneos de los conductos de Havers dado que en el hueso cortical no existe médula ósea.

La actividad reabsortiva de los osteoclastos y la osteoclastogénesis parecen ser activadas por la IL-1, IL-6 e IL-11, producidas por células de estirpe osteoblástica (Elias y cols. 1995, Manolagas & Jilka 1995). La producción de estas interleuquinas sería a su vez estimulada por hormonas (PTH, 1-25 dihidroxivitamina D<sub>3</sub>) y por factores locales (TNF). Este modelo ofrece amplias posibilidades tanto para la regulación sistémica de la actividad reabsortiva como para la regulación local del acoplamiento entre reabsorción y formación óseas. Además de los descritos, existen otros mecanismos de regulación local de la actividad funcional de los osteoclastos. Por ejemplo, el calcio liberado durante la reabsorción puede penetrar en el interior del osteoclasto a través de canales de Ca<sup>++</sup> situados en la membrana plegada e inhibir la actividad reabsortiva de estas células (Alberts y cols. 1994). Los factores de crecimiento de origen osteoblástico enterrados en la matriz y liberados durante la reabsorción parecen ser también importantes para el mantenimiento de la actividad funcional de los osteoclastos. Otros factores que afectan la funcionalidad de los osteoclastos son los glucocorticoides y las prostaglandinas.

La adhesión de los precursores de los osteoclastos a la matriz ósea tiene lugar en aquellos puntos donde ésta queda expuesta porque se separan entre sí las células de revestimiento al modificarse la conformación de su citoesqueleto por acción de la PTH. La adhesión de las células de estirpe osteoclástica a la matriz es posible porque expresan en su membrana moléculas de adhesión de la familia de las integrinas. Así, la integrina  $\alpha_2\beta_1$  interacciona con el colágeno y la integrina  $\alpha_v\beta_3$  con la vitronectina, osteopontina y sialoproteína ósea (Parfitt 1994).

Es característico de estas células que la zona de su membrana que entra en relación con la matriz ósea se halle fruncida. A ambos lados de la zona de plegamiento la membrana se aplanada y se adhiere más íntimamente a la matriz constituyendo la zona de sellado. En las tres dimensiones del espacio este segmento aplanado corresponde a un rodete que adhiere al osteoclasto a la superficie ósea de manera parecida a como lo haría el borde de una ventosa. Así, el espacio comprendido entre la membrana fruncida y la matriz ósea queda convertido en un microambiente que se halla aislado del intersticio medular. El segmento de citoplasma adyacente a esta zona aplanada se halla libre de organelas por lo que se denomina zona clara (Gurley & Roth 1992, Mundy 1993). Esta zona contiene abundantes microfilamentos de actina que probablemente se relacionan con la capacidad de traslación de la célula. De hecho los osteoclastos a medida que reabsorben el hueso realizan un movimiento de vaivén parecido al que efectúa el cepillo de un carpintero (Mundy 1993). El territorio sobre el que se desplaza un osteoclasto durante el proceso de reabsorción es varias veces superior al de la superficie de la célula y se denomina dominio osteoclástico. La TRAP



(Fosfatasa Ácida Resistente al Tártaro) es capaz de desfosforilar la osteopontina y la sialoproteína ósea por lo que podrían ser factores determinantes de los movimientos de la célula.

Los osteoclastos reabsorben el hueso en dos fases. Primero solubilizan el mineral y luego digieren la matriz orgánica (Gurley & Roth 1992, Mundy 1993). El mineral se solubiliza acidificando el microambiente creado entre la matriz ósea y la membrana fruncida del osteoclasto. La acidificación ( $\text{pH}=4$ ) se logra bombeando hacia el hueso los iones  $\text{H}^+$ . En el citoplasma de los osteoclastos la anhidrasa carbónica cataliza la reacción entre el  $\text{CO}_2$  y el  $\text{H}_2\text{O}$  dando lugar a  $\text{CO}_3\text{H}_2$  que se disocia en  $\text{CO}_3\text{H}^-$  y  $\text{H}^+$ . El  $\text{H}^+$  es bombeado activamente hacia la matriz ósea a través de la membrana plegada mediante una bomba de protones dotada de una ATP-asa específica. El  $\text{CO}_3\text{H}^-$  es expulsado fuera de la célula a través de la superficie opuesta donde es intercambiado activamente por  $\text{Cl}^-$  (Mundy 1993). El  $\text{Cl}^-$  no se acumula en el interior del osteoclasto puesto que es vehiculizado hacia la matriz ósea a través de canales específicos situados en la membrana plegada. Una vez eliminado el mineral, la matriz orgánica es digerida por colagenasas ácidas y otras enzimas proteolíticas de origen lisosómico del grupo de las cisteín-proteasas como la catepsina y, sobre todo, la TRAP (utilizada como marcador del fenotipo osteoclástico) (Imagen 7). Las enzimas lisosomales sólo son liberadas en la zona clara en las proximidades del borde rugoso produciéndose en esta área las reacciones de degradación de la matriz que deben producirse antes de que el medio ácido disuelva las sales minerales del hueso.

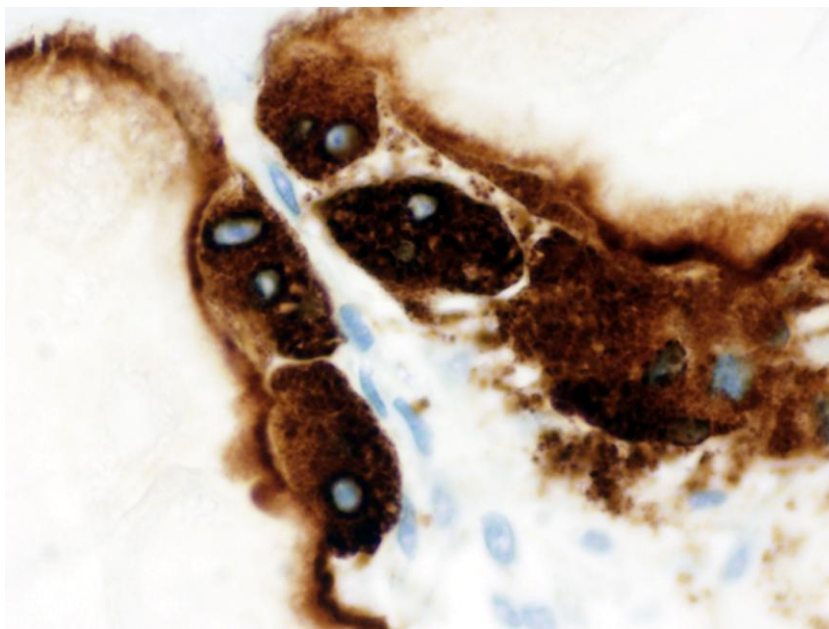


Imagen 7: Expresión de TRAP en células multinucleadas actuando frente a partículas de hueso bovino anorgánico.

### 2. 2. 5. Células “*bone-lining*” o limitantes

Proviene de los osteoblastos y se encuentran a lo largo de las superficies de la mayoría de los huesos en el adulto. Se piensa que regulan el intercambio de iones calcio y fósforo desde y hacia el hueso, además de poder ser activadas para transformarse en osteoblastos. La retracción o eliminación de estas células a través de la producción de factores locales (IL-6, IL-11) es un paso imprescindible para el inicio de la actividad osteoclástica sobre el hueso (Chambers *y cols.* 1985, Jones & Boyde 1976, Zambonin-Zallone *y cols.* 1984), desarrollando así un papel determinante en el control del remodelado óseo (Elias *y cols.* 1995, Manolagas & Jilka 1995).

<b>TIPO CELULAR</b>	<b>FUNCIÓN</b>
<b>Osteoblasto</b>	Reorganización interna del hueso Crecimiento óseo Curación de fracturas Síntesis de la matriz y depósito de sales
<b>Osteoclasto</b>	Reabsorción no mineral Reabsorción mineral
<b>Osteocito</b>	Mantenimiento de la matriz Reabsorción mediante osteolisis osteocítica

Imagen 8: Resumen de las funciones de las principales células del tejido óseo.

### 3. BIODINÁMICA DEL TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo, a pesar de estar constituido en su mayor parte por matriz extracelular, es uno de los sistemas más dinámicos del organismo y presenta fenómenos de crecimiento, modelado, remodelado y reparación.

Para el presente estudio, las fases más relevantes son aquellas relacionadas con el remodelado y la reparación ósea.

### 3. 1. REMODELADO ÓSEO

En el adulto, cerca de un 8% del tejido óseo es renovado anualmente. Esta cifra es superior en el joven e inferior en el anciano (Serrano & Mariñoso 1990). La adaptación del hueso a las cargas y el mantenimiento de la homeostasis fosfocálcica son las causas de que el hueso sufra un continuo proceso de remodelado. Difiere del denominado modelado o formación de hueso hasta su total desarrollo en que éste es general y continuo y el remodelado es local y cíclico.

A nivel microscópico el remodelado óseo se produce en las Unidades Básicas Multicelulares (o basic multicellular units, BMU), formadas por un osteoclasto, un osteoblasto, un preosteoblasto y un macrófago (Eriksen y cols. 1994). En dichas unidades se produce primero la activación de los osteoclastos para a continuación y en el mismo lugar activarse los osteoblastos. Cada ciclo de remodelado consta, por tanto, de tres fases: reabsorción, reposo o inversión y formación. En la fase de reabsorción, un grupo de osteoclastos se diferencia a partir de sus precursores y erosiona una superficie ósea dando lugar a imágenes en sacabocados conocidas como lagunas de Howship (Serrano & Mariñoso 1990). Una vez finalizada la reabsorción, los osteoclastos son eliminados por apoptosis. La fase de reposo o inversión es un periodo de aparente inactividad. El límite entre el hueso preexistente y el nuevo es identificable morfológicamente como una línea ondulada y recibe el nombre de superficie de inversión o de cemento (Imagen 9). Durante la fase de formación un grupo de osteoblastos se diferencia a partir de sus precursores y rellena con hueso nuevo la zona excavada por los osteoclastos. Los osteoblastos depositan en primer lugar matriz ósea no

mineralizada que forma una capa de unas 10 micras de espesor denominada ribete de osteoide (Imagen 2). Entre el depósito de osteoide y su mineralización existe un tiempo de demora de unos 10 a 20 días (Mineral Lag Time) (Serrano & Mariñoso 1990). Durante este periodo la matriz ósea sufre cambios en su composición y estructura que la hacen apta para el depósito de mineral que se inicia en la interfase entre el osteoide y el hueso preexistente y avanza hacia la superficie a lo largo de un plano de barrido de 2 a 3 micras de espesor. Este plano, integrado en parte por mineral amorfo, se denomina frente de mineralización (Serrano & Mariñoso 1990). A medida que este frente se desplaza va dejando tras de sí matriz ósea mineralizada.

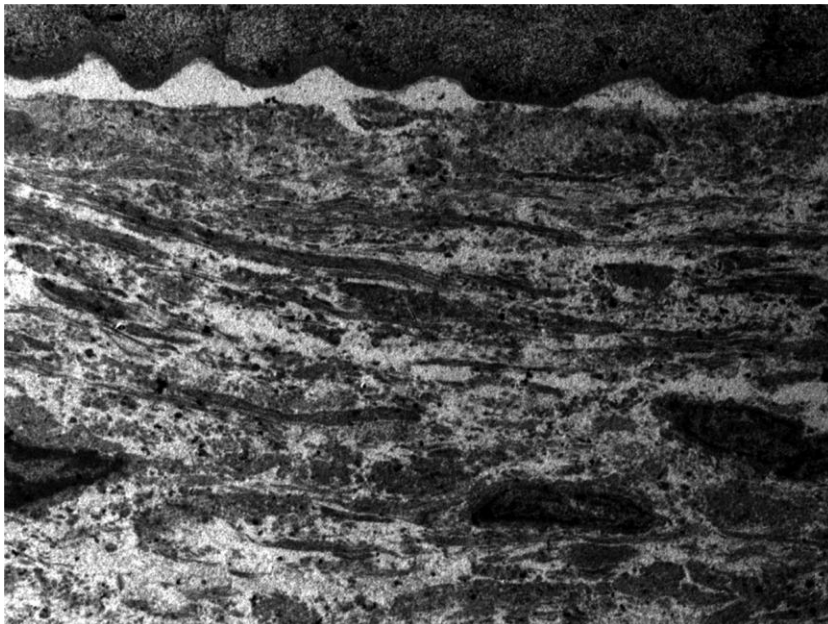


Imagen 9: Microscopía electrónica de transmisión en la que se observa la superficie de inversión.

### 3. 2. REPARACIÓN ÓSEA

El tejido óseo es el único tejido capaz de repararse a sí mismo de manera completa consiguiendo su *restitutio ad integrum* a través de la reactivación de los procesos que tienen lugar durante su embriogénesis. Cuando de manera brusca un hueso es sometido a fuerzas que superan su resistencia mecánica aparece una línea de fractura. En primer lugar, en esta zona se produce un hematoma que es reabsorbido por macrófagos. A continuación, aparecen células formadoras de hueso, procedentes de ambos lados de la línea de fractura, que establecen puentes de tejido óseo inmaduro sin orientación espacial definida (callo de fractura) que unen entre sí los extremos del hueso fracturado. En una fase posterior este hueso, a través de un proceso de modelado, es sustituido por otro de tipo laminar orientado según las líneas de fuerza que actúan sobre la zona (Bullough & Vigorita 1996).

### 3. 3. FACTORES REGULADORES

La vascularización es fundamental para un desarrollo óseo, remodelación y reparación normales. Permite el aporte de células sanguíneas, oxígeno, minerales, iones, glucosa, hormonas y factores de crecimiento. Por tanto, la neoformación vascular es el hecho fundamental del proceso de curación ósea. Está mediada por VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular), entre otros. Además, el remodelado óseo está sometido a un control sistémico (hormonas) y a un control local (factores locales).

Los mecanismos de control de acción sistémica regulan el ritmo de activación de las BMU y la actividad funcional de las células que las

integran. Son especialmente importantes la hormona paratiroidea (PTH) y la vitamina D pero intervienen también las hormonas tiroideas, los esteroides sexuales, los glucocorticoides, la insulina y la hormona del crecimiento. Aunque la calcitonina *in vitro* es capaz de modular la función de las células óseas, parece que *in vivo* carece de importancia fisiológica. Algunas de estas hormonas tienen una acción directa sobre las células óseas; otras actúan de manera indirecta modulando la síntesis o la actividad de factores locales (Manolagas & Jilka 1995).

El control local del remodelado óseo se lleva a cabo a través de una serie de factores de crecimiento (insulin-like, factores de crecimiento transformantes de la familia  $\beta$ , fibroblásticos, derivados de las plaquetas) y citoquinas (IL-1, IL-6, IL-11, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$ , factores estimuladores de colonias monocito-macrófago) de acción autocrina o paracrina (Elias y cols. 1995, Manolagas & Jilka 1995, Pfeilschifter y cols. 1995, Watson y cols. 1995), además de osteocalcina, factor inhibidor de leucemia, oncostatina M y otras menos definidas como los metabolitos del ácido araquidónico. Estos factores locales son producidos por las células óseas y las células medulares adyacentes (células hematopoyéticas, linfocitos y macrófagos). Los factores locales intervienen en el control de la actividad funcional de las células de las BMU y son clave para el acoplamiento entre osteoclastos y osteoblastos. Las células de linaje osteoblástico a través de la producción de factores locales (IL-6, IL-11) son capaces de activar la proliferación, diferenciación y fusión de los precursores de los osteoclastos, así como la actividad y supervivencia de los osteoclastos maduros y de esta manera contribuir al inicio de los ciclos de remodelado (Elias y cols. 1995,

Manolagas & Jilka 1995). A su vez, ciertos factores liberados por los osteoclastos o por la matriz ósea bajo la acción de estas células son capaces de activar a los osteoblastos. Es probable que este fenómeno constituya el sustrato molecular para el acoplamiento entre la reabsorción y la formación dentro de los ciclos de remodelado.

#### **4. FACTORES QUE AFECTAN A LA OSTEOINTEGRACIÓN**

Fueron propuestos por Albrektsson y cols. (Albrektsson y cols. 1981):

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

Actualmente la investigación en Implantología a nivel del implante en sí se centra en conseguir superficies con capacidad bioactiva que aceleren y mejoren la reacción por parte del tejido óseo en el que se insertará el implante. En este sentido, la modificación superficial de un dispositivo biomédico para aplicación dental u ortopédica debe promocionar una óptima respuesta que ofrezca unos óptimos resultados clínicos (Kim & Ramaswamy 2009, Schwarz y cols. 2009). Para ello,



deben proveer señales epigenéticas a las células de los tejidos periimplantarios que provoquen respuestas biológicas adecuadas para favorecer la curación ósea, la osteoconducción y, en definitiva, la osteointegración.

#### **4. 1. REPARACIÓN DE LA HERIDA PERIIMPLANTARIA**

La reparación de la herida generada durante la inserción de un implante puede producirse, de acuerdo con Davies y cols. (Davies 2003), por dos mecanismos básicos: osteogénesis a distancia y osteogénesis de contacto.

En la osteogénesis a distancia el hueso nuevo se forma en la superficie del hueso antiguo desde donde crece hasta alcanzar la superficie del implante. Este tipo de osteogénesis es la clásica descrita para los implantes maquinados y se basa en la remodelación por parte de los osteoclastos de la superficie ósea lesionada y, por tanto, necrótica. Es un proceso claramente lento.

Por el contrario, en la osteogénesis de contacto el hueso inicia su formación directamente sobre la superficie del implante. Aunque por definición no hay hueso sobre la superficie del implante, ésta sí es capaz de atraer células óseas que serán adsorbidas y comenzarán a depositar matriz ósea, de forma similar a lo que ocurre cuando se produce la remodelación de una porción de tejido óseo, ya que el osteoclasto deja una superficie rica en proteínas detectable por el osteoblasto. Como resultado la interfaz hueso/implante se comporta exactamente igual que un *cement line* (Davies 2007).

Según este modelo, la sangre que se libera en el “gap” entre el hueso y el implante inunda todo este espacio. Las plaquetas, una vez activadas, liberan una gran variedad de mediadores biológicos con funciones diversas. Algunos de ellos (tromboxano, trombospondina y otros factores de la coagulación) inician la estabilización del coágulo sanguíneo, de forma que, aproximadamente una hora después de la colocación del implante, se forma una matriz provisional constituida principalmente de fibrina y que se ancla al implante en función a sus propiedades superficiales. Otras moléculas de señalización regulan a partir de este momento la migración, adhesión, proliferación y maduración de las células implicadas en las fases iniciales de la curación, iniciando la fase inflamatoria. En las horas siguientes al daño tisular, las células inflamatorias (neutrófilos y monocitos) migran a través del coágulo estabilizado para iniciar la eliminación de restos necróticos mediante fagocitosis y liberación de enzimas específicos (metaloproteinasas entre otras) y productos tóxicos oxigenados (radicales libres), que participan en la remodelación de la matriz extracelular primordial. Durante la fase tardía de la reacción inflamatoria, aproximadamente 3-4 días después del daño tisular, comienza la formación de tejido de granulación. Las células predominantes en esta fase son los macrófagos, que migran hacia la herida para coordinar la respuesta inflamatoria secundaria y la proliferación vascular. La población de neutrófilos/monocitos es sustituida por macrófagos en unos pocos días. Estos macrófagos secretan polipéptidos proinflamatorios y factores de crecimiento que promueven el proceso de curación. Estos factores de crecimiento (TGF- $\beta$  y PDGF, entre otros) y algunas citoquinas inflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) liberadas por los macrófagos

están implicados en la proliferación y migración de fibroblastos y osteoblastos así como de células endoteliales hacia la herida. Las células proliferan alrededor de la herida desarrollando interacciones célula-célula y célula-matriz determinadas por moléculas reguladoras exocrinas y autocrinas. Una semana después del inicio del daño tisular, el tejido en curación está principalmente constituido por tejido de granulación.

La angiogénesis se inicia simultáneamente junto con el inicio de la formación de tejido de granulación. Esto permite la migración celular con el necesario aporte de nutrientes y oxígeno. Esta angiogénesis está regulada por varios mediadores, entre los que destacan el factor de crecimiento vasculo-endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF). Las células endoteliales, responsables de la angiogénesis, migran hacia la matriz provisional para formar una red vascular inicial. Sin embargo, con la maduración de esta matriz, las células endoteliales sufren procesos apoptóticos y el número de unidades vasculares se reducen, aunque éstas son de mayor diámetro.

Después de 7-14 días se inicia la fase de maduración. La maduración de la matriz extracelular es una fase cuya duración varía en función del tejido en el que nos encontremos. En los procesos de osteogénesis, los osteoblastos son los encargados de producir una nueva matriz rica en colágeno a partir de la matriz extracelular provisional y desorganizada presente durante la fase de granulación. Una vez que esta matriz rica en colágeno ha sido sintetizada, se inicia la deposición de fosfato cálcico así como sus sales y otros componentes inorgánicos, proceso que se conoce como mineralización ósea. Durante este proceso, aumenta la concentración en el medio de varios marcadores, como la

fosfatasa alcalina (ALP), la sialoproteína ósea (BSP), la osteocalcina y la osteopontina. Dentro de las 4-6 semanas siguientes a la colocación del implante es posible observar un hueso inmaduro alrededor del mismo. Después de las 6 semanas, ese hueso inmaduro va siendo sustituido gradualmente por hueso lamelar bien organizado. Una gran variedad de factores locales y sistémicos pueden determinar los procesos de remodelación y maduración ósea. En condiciones normales, la reabsorción del hueso es de igual proporción a su formación. Esta remodelación ósea se realiza por agrupaciones osteoblasto-osteoclasto (BMUs).

Por tanto, aunque la osteogénesis a distancia y de contacto se producen de forma simultánea en todos los procesos de curación ósea alrededor de un implante dental, el significado biológico de sus diferencias es un factor crítico en el diseño de nuevas superficies. Así, el objetivo ha de ser favorecer la aparición de osteogénesis de contacto.

#### **4. 2. LA SUPERFICIE DEL IMPLANTE**

La calidad superficial del implante dental depende de sus propiedades fisicoquímicas y topográficas:

<b>Composición química</b>	Composición atómica Estado químico de los elementos
<b>Estructura: Orden-Desorden</b>	Cristalinidad Inclusiones Vacantes Límites de grano
<b>Morfología Textura Rugosidad</b>	Forma superficial 2D y 3D Área específica Porosidad
<b>Energía superficial</b>	Humectabilidad Adsorción Energía superficial
<b>Eléctrica</b>	Potencial de superficie Cargas superficiales
<b>Mecánica</b>	Elasticidad/plasticidad Tensiones residuales

Imagen 10: Propiedades e información necesaria para describir la calidad de la superficie de un implante (Aparicio Bádenas 2004).

La interacción entre el ambiente biológico y la superficie del material en las fases iniciales es de vital importancia en los procesos posteriores como son el contacto con la sangre, la adsorción de proteínas y otras moléculas, la adhesión celular, etc. Concretamente, la adhesión celular a un biomaterial está determinada por sus características de humectabilidad, rugosidad, textura, carga superficial y funcionalidad química (Arima & Iwata 2007). Por tanto, el estudio y optimización de las

propiedades de superficie de un material son determinantes en el desarrollo y mejora de los materiales a emplear en organismos vivos (Davies 2000, Davies 2003, Davies 2007).

### **4. 3. TRATAMIENTOS DE SUPERFICIE SOBRE IMPLANTES DENTALES**

En función del efecto que persiguen los diferentes tratamientos de superficie empleados sobre los implantes dentales, se distinguen tres grandes grupos:

- a) Limpieza de la superficie y/o eliminación de la capa superficial.
- b) Modificación de la estructura y topografía (lisa, rugosa, porosa).
- c) Modificación de la composición y la estructura de la capa de óxido o la formación controlada de un nuevo recubrimiento en la superficie que le confiera carácter bioactivo.

<b>MÉTODO</b>	<b>EFEECTO</b>
<b>Granallado, Arenado, Granallado de pretensión</b>	Desincrustar restos sólidos de contaminantes Eliminar capas nativas Aumentar la rugosidad superficial Mejorar la adhesión en el enlace Introducir tensiones residuales
<b>Grabado ácido</b>	Desincrustar restos sólidos de contaminantes Eliminar capa nativas Modificar la rugosidad superficial Eliminar tensiones residuales
<b>Grabado alcalino</b>	Hidroxilar la superficie Mejorar la formación de apatita Aumentar la rugosidad
<b>Pasivado en ácido o térmico</b>	Oxidar la superficie Minimizar la liberación de iones
<b>Tratamiento con fosfatos de calcio y/u otros iones</b>	Precipitar capas de apatita Modificar la composición superficial
<b>Electropulido</b>	Eliminar tensiones Obtener superficies lisas y uniformes
<b>Anodizado, oxidación anódica</b>	Modificar la estructura y composición del óxido superficial Mejorar la resistencia a la corrosión Disminuir la liberación de iones Aumentar la rugosidad superficial Obtener superficies porosas

<b>Descargas eléctricas</b>	Aumentar la rugosidad
<b>Implantación iónica</b>	Modificar la composición superficial Mejorar la resistencia a la corrosión y al desgaste
<b>Recubrimiento sol-gel</b>	Recubrir con material bioactivo
<b>Recubrimiento por proyección por plasma de fosfatos de calcio</b>	Recubrir con material bioactivo Aumentar la rugosidad
<b>Recubrimiento por proyección por plasma</b>	Aumentar la rugosidad Generar estructura microporosa
<b>Ablación láser</b>	Aumentar la rugosidad
<b>Adsorción fisicoquímica de moléculas biológicas</b>	Interaccionar selectivamente con las proteínas Bioactividad
<b>Enlace covalente de moléculas biológicas</b>	Interaccionar selectivamente con las proteínas Bioactividad
<b>Recubrimiento de moléculas biológicas por inclusión en materiales portadores</b>	Interaccionar selectivamente con las proteínas Bioactividad

Imagen 11: Diferentes tratamientos superficiales sobre el titanio para aplicaciones biomédicas (Aparicio Bádenas 2004, Bagno & di Bello 2004, Lausmaa 2001).



Uno de los primeros tratamientos superficiales propuestos fue la sustracción mediante chorreado para eliminar cualquier sólido remanente y capas nativas de óxido, para aumentar la rugosidad y para mejorar la capacidad adhesiva. Posteriormente se comenzó a emplear el grabado ácido con los mismos objetivos pero además con la capacidad de minimizar la tensión superficial generada por el proceso de chorreado. El grabado alcalino o hidroxilación superficial fue propuesto a continuación. Éste fue uno de los primeros intentos por otorgar bioactividad a la superficie del implante mediante un aumento de su rugosidad. Otra modificación posible consiste en la pasivación en ácido o por calor con objeto de oxidar la superficie y minimizar la liberación de iones. En este contexto, pronto aparecieron investigaciones sobre la adición de fosfato cálcico u otros iones para modificar la composición superficial y mejorar además la resistencia a la corrosión. Así, la adición de hidroxiapatita es considerada como el primer recubrimiento bioactivo sobre el titanio. A raíz de esto, los recubrimientos en fase sol-gel, la ablación láser y la adsorción físico-química o por enlaces covalentes de biomoléculas no tardaron en aparecer. La intención de estos recubrimientos es la consecución de una interacción selectiva entre las proteínas del medio y la superficie del implante, constituyendo los primeros pasos en la conocida biomimética.

El recubrimiento de la superficie de un implante con agentes biomiméticos para cambiar sus propiedades puede inducir una modulación positiva de la respuesta biológica (Avila y cols. 2009). Un agente biomimético es capaz de replicar o imitar una estructura anatómica o bien un comportamiento fisiológico. Una de las ventajas del empleo de

agentes biomiméticos es la capacidad para aumentar la velocidad de curación de la herida, reduciendo así el tiempo total del tratamiento con implantes al acelerarse su osteointegración. Estas respuestas se producen como consecuencia de las interacciones específicas entre el agente biomimético superficial y la matriz extracelular. Los agentes biomiméticos deben cumplir además una serie de requisitos, como son (Golec & Krauser 1992):

- Habilidad para inducir la diferenciación de células con capacidad de formación o inducción del tejido óseo.
- Facilidad de síntesis que elimine en la medida de lo posible la extracción de aloinjertos reduciéndose así la posibilidad de transmisión de enfermedades.
- Reabsorción durante el proceso de remodelado óseo para minimizar los problemas de pérdida del implante por delaminación del recubrimiento.
- No inducción de reacciones inmunes en el receptor.
- Estabilidad química hasta la colocación del implante en el lecho.
- Ratio coste-efectividad adecuada.

## **5. LA SÍLICE COMO BIOMATERIAL**

Muchos estudios se han centrado en el estudio de la interacción entre el titanio y las células osteogénicas (Bachle & Kohal 2004) ya que

este material representa el *gold standard* en los procesos de osteointegración (Branemark y cols. 1977). Existen estudios publicados en los que se intentan facilitar los procesos metabólicos óseos mediante la deposición previa de apatita (Chong y cols. 2008), fosfato cálcico (Ning y cols. 2005, Vaahtio y cols. 2006) o mediante procesos biomiméticos de adsorción de proteínas (Soumetz y cols. 2008) sobre la superficie del titanio.

Sin embargo, el titanio no es el único biomaterial disponible para la consecución de una interacción biológica entre el hueso y la superficie del material. Otros biomateriales han demostrado su capacidad para proporcionar una adecuada respuesta al contacto con el hueso como pueden ser el tantalio (Kato y cols. 2000), niobio (Johansson & Albrektsson 1991), aleaciones cromo-cobalto (Peterson y cols. 1980) o zirconio (Hisbergues y cols. 2009). Como paso previo a la adhesión del hueso sobre la superficie de cualquiera de ellos en condiciones fisiológicas es necesaria la formación de una capa biológicamente activa que contenga hidroxiapatita (Anderson y cols. 1998). Es por esto que tras los estudios de Hench y cols. en los que describía la capacidad de los biocristales, materiales con un alto contenido en sílice, para estimular el depósito de apatita sobre él sin interfase alguna se propuso el empleo de la sílice como biomaterial de regeneración ósea (Hench y cols. 1971, Hench & Wilson 1984, Hench & Wilson 1986). Estos biocristales proporcionan un ambiente donde las proteínas de la matriz extracelular ósea son adsorbidas dando como resultado que la adhesión y proliferación de los osteoblastos sea más rápida que con otros materiales (Ducheyne & Qiu 1999, Stevens y cols. 2008).

El empleo de la sílice como material de recubrimiento para implantes se basa en su capacidad para unirse directamente al hueso. Es lo que se conoce *bone-bonding* o unión directa al hueso a nivel químico mediante intercambio iónico, siendo los biocristales o cristales bioactivos los únicos materiales capaces de promover esta reacción de estimulación y desarrollo de las células óseas para la reparación del tejido óseo (Ducheyne & Qiu 1999, Vallet-Regi y cols. 2006). Sin embargo, otros autores como Davies (Davies 2003, Davies 2007) rechazan esta idea proponiendo que la adhesión del hueso a una superficie requiere la formación previa del *cement line*, definida como una matriz no colágena mineralizada que se invagina, interdigita y traba con la matriz de colágeno desmineralizada dejada por el osteoclasto o con la superficie del material. Refiere que la unión a los biocristales no se produce por un intercambio iónico real sino por la formación de una red de retención micromecánica entre el *cement line* y la superficie del material.

Una de las características más importantes de estos biomateriales es su capacidad para modificar sus propiedades físico-químicas a nivel superficial de forma aislada mediante reacciones químicas relativamente simples (Dotto & Kleinke 2001), lo que nos permite estudiar la influencia de estas propiedades sobre la respuesta celular de forma independiente.

## **5. 1. ADSORCIÓN PROTEICA**

El proceso de adsorción de distintos tipos de proteínas a la superficie del biocristal determina las posteriores etapas celulares (Keselowsky y cols. 2003). Se realiza por medio de integrinas, cuya unión a determinadas moléculas presentes en la matriz extracelular y las láminas basales modifica la actividad celular. Las integrinas también participan en

la diferenciación y multiplicación celular mediada por factores de crecimiento, ya que para que las células normales proliferen en respuesta a tales factores, es indispensable que estén ancladas a una matriz específica activándose determinadas integrinas. Además, las integrinas originan señales intracelulares como resultado de la activación de moléculas asociadas a su extremo intracitoplasmático en las placas de adhesión, como son las enzimas de la familia de tirosín-quinasas Src y las quinasas de adhesión focal (FAK), efecto éste que puede ser modulado por las características superficiales del biomaterial (Imagen 12).

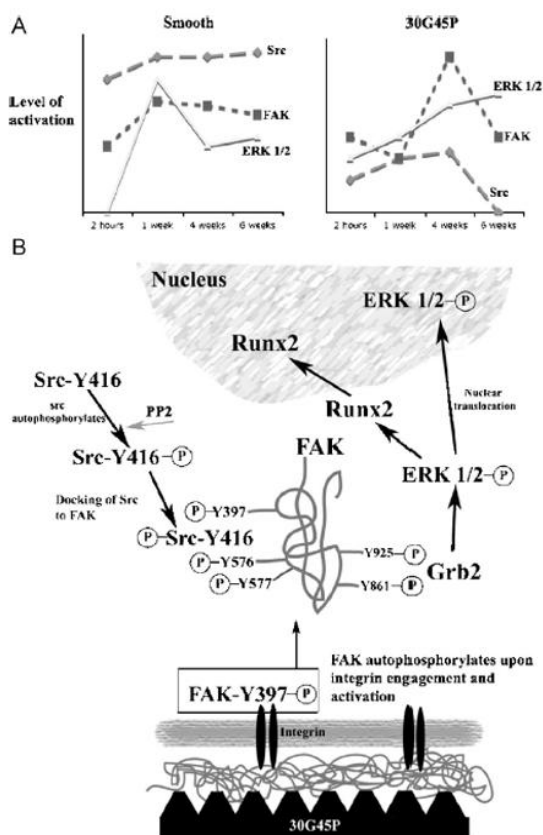


Imagen 12: Diagrama representativo de la transducción de señales al interior de la célula (Hamilton & Brunette 2007).

## 5. 2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE SUPERFICIE

Es bien sabido que los procesos iniciales de adhesión celular están determinados por las propiedades físicas y químicas de la superficie, como son la humectabilidad, carga superficial y funcionalidad química así como por las características de las propias células que interactúan con ella (Arima & Iwata 2007, Schweikl y cols. 2007). Además, la adhesión inicial de una célula a la superficie de un material determinará los procesos subsiguientes de dispersión, morfología, migración, proliferación y diferenciación (Anselme 2000). Posteriormente, tras la adsorción celular sobre la superficie, se produce la formación de capas de apatita. La formación de esta capa de apatita está determinada por la textura y funcionalidad superficiales, incluyendo la humectabilidad (Condie y cols. 2007), por la orientación cristalina del sílice superficial (Chong y cols. 2008), y por la carga negativa en superficie (Li & Zhang 1990, Zhao y cols. 2005).

Por tanto, es imprescindible determinar de forma aislada el rol que juega cada una de estas propiedades superficiales. Sin embargo, una superficie generalmente posee un alto grado de heterogeneidad, incluyendo distintos tipos y densidades de grupos químicos funcionales, áreas hidrofílicas e hidrofóbicas, textura y rugosidad. El estudio del efecto causado por cada uno de estos factores es complejo, teniendo en cuenta además que numerosos procesos de modificación de alguna de estas propiedades suelen tener efectos en alguna otra. Por ejemplo, modificaciones topográficas suelen llevar acompañado modificaciones en cuanto a la humectabilidad.

La humectabilidad de la superficie y su efecto en distintos aspectos de la reacción biológica puede ser controlada mediante modificaciones topográficas que por condicionantes exclusivamente físicos modifican esa humectabilidad, o bien mediante modificaciones químicas en la capa funcional del material. En este sentido, Ortega-Vinuesa y cols. (Ortega-Vinuesa y cols. 1998), propusieron la modificación de la superficie de la sílice mediante la adición de grupos metilo a la superficie del mismo. Esto da lugar a una superficie con una nueva capa superficial saturada en mayor o menor medida de grupos metilo ( $-\text{CH}_3$ ) terminales que serán los que intervengan en las relaciones biológicas posteriores, en el aspecto físico-químico. En la Imagen 13 podemos observar una representación de la nueva capa metilada formada en superficie tras el tratamiento químico.

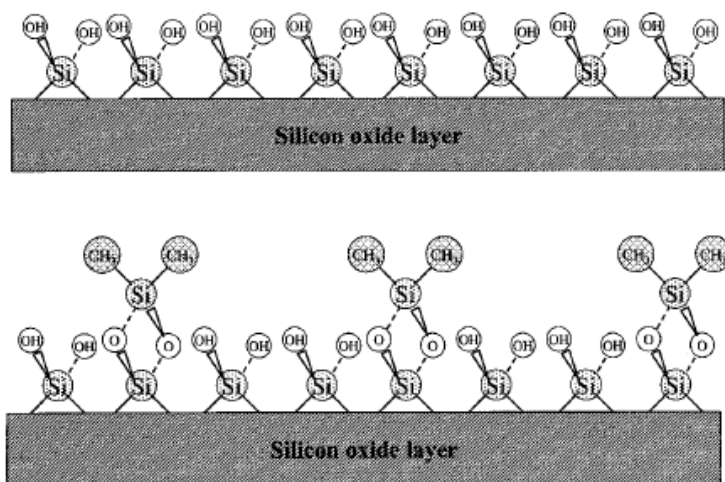


Imagen 13: Representación esquemática a escala molecular de la rugosidad y grosor de la capa metilada sobre la superficie de sílice (Ortega-Vinuesa y cols. 1998).

### 5. 3. BIOACTIVIDAD DE LA SÍLICE

En los últimos años, se ha propuesto que los efectos más destacados de los materiales con sílice se basan en su tasa de liberación desde el material a un ritmo adecuado y en asociación con otros componentes, como el  $\text{Na}_2\text{O}$  y el  $\text{P}_2\text{O}_5$ , necesarios para la deposición de fosfato cálcico (Valimaki & Aro 2006). El mecanismo se basa en la hidrolización por la fosfatasa alcalina del  $\beta$ -glicerofosfato, el agente mineralizador óseo más común (Boccaccini & Blaker 2005).

Así, diferentes estudios concluyen que la sílice disuelta desde el material a una tasa adecuada aumenta la expresión de determinados genes relacionados con la diferenciación y proliferación celulares (Allen y cols. 2003). No sólo se trata de un mecanismo de respuesta por parte de las células a la superficie en función de su topografía y química superficial por medio de sus receptores de superficie sino que existe además una respuesta directa a la sílice disuelta en el ambiente extracelular por un posible mecanismo de toxicidad, similar al descrito para la silicosis (Areva y cols. 2007), que resulta en un aumento de la producción de diversos factores implicados en la osteogénesis, como son, entre otros la fosfatasa alcalina, sialoproteína ósea, osteopontina, osteocalcina, osteonectina, BMP-2 y Cbfa1/Runx2 (Gao y cols. 2001, Gupta y cols. 2007, Jell & Stevens 2006).

En base a estas propiedades, se ha propuesto también el uso de sílice en forma soluble como recubrimiento para implantes. En este sentido, algunos autores refieren una pobre adhesión y proliferación celular al disolverse rápidamente (Areva y cols. 2007). Además, Meretoja y cols. (Meretoja y cols. 2005, Meretoja y cols. 2007) concluyen que la



capacidad osteogénica y de mineralización de distintos recubrimientos es mayor con las formulaciones sol-gel de titanio que con la mezcla titanio-sílice en proporción 30-70, lo que haría innecesaria la introducción de un nuevo material en el proceso aunque sí deba optimizarse el ya conocido, como es el titanio.

En un intento por analizar el efecto de los recubrimientos de sílice puro y desligarlo de los demás componentes de los biocristales, Anderson y cols. (Anderson y cols. 1998) concluyeron que la topografía por sí sola no es capaz de explicar la mineralización temprana en estas superficies, que liberaban una cantidad diaria de 1 ppm/ml de sílice que era absorbida por los osteoblastos aumentando la formación de nódulos mineralizados, que se produjo una mayor adsorción de colágeno y que la sílice soluble podía influir en la expresión de osteocalcina y otras proteínas implicadas en el proceso de mineralización, coincidiendo con otros autores (Areva y cols. 2007, Valerio y cols. 2004).

Sin embargo, el uso más extendido de los materiales con alto contenido en sílice en forma soluble es como injerto óseo inorgánico (Amato y cols. 2003, Chan y cols. 2002, Chen y cols. 2006, Conejero y cols. 2007, El-Ghannam 2005, El-Ghannam y cols. 2004a, El-Ghannam y cols. 2007, El-Ghannam y cols. 2001, El-Ghannam & Ning 2006, El-Ghannam y cols. 2004b, El-Ghannam 2004, Elshahat y cols. 2004, Galindo-Moreno y cols. 2008, Gosain 2004, Govindaraj y cols. 1999). Es de destacar el reciente trabajo publicado por Galindo-Moreno y cols. (Galindo-Moreno y cols. 2008), en el que realizó un estudio clínico comparativo entre injertos para elevación de seno mediante hueso bovino anorgánico (Bio-Oss®) o aloinjerto de cristales de fosfosilicato cálcico

(Novabone®, compuesto en alrededor de un 50 % por sílice soluble), ambos mezclados al 50 % con hueso autógeno cortical obtenido mediante rascador óseo según la técnica descrita por el mismo autor (Galindo-Moreno y cols. 2007). Los resultados clínicos fueron excelentes en ambos casos. Cabe destacar que el análisis histomorfométrico de las muestras tomadas durante la colocación de implantes 6 meses después de la intervención para elevación de seno, mostró un menor porcentaje de partículas remanentes y un mayor porcentaje de hueso vital y tejido conectivo en las muestras obtenidas de las zonas injertadas con Novabone®. Además, este material ha mostrado su capacidad para acelerar la actividad osteogénica y la expresión temprana de fosfatasa alcalina en estudios *in vitro* (Gatti y cols. 2008). Las posibles implicaciones biológicas de las características de este tejido regenerado junto con su capacidad estimuladora osteogénica y proteica son muy interesantes dada la importancia en el metabolismo óseo no sólo del propio hueso vital sino también, y más relevante, del tejido no mineralizado.

Por tanto, considerando, por un lado, las características físicas de la sílice y la relativa facilidad con la que es posible modificar su humectabilidad sin variar su topografía y, por otro, la importancia de estos parámetros en la integración del material en el tejido óseo, nos planteamos el desarrollo del presente trabajo de investigación básica multidisciplinar que se centrará en el estudio de la modificación de la topografía o de la humectabilidad de una superficie de sílice de forma independiente y la respuesta de una línea celular de estirpe ósea a dichas modificaciones.



# *HIPÓTESIS*

Si tu experimento necesita un amplio análisis estadístico, deberías  
haber hecho uno mejor.

Ernest Rutherford (1871-1937). Físico británico.



## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

La nanorugosidad y los cambios de humectabilidad que ésta conlleva influyen sobre los fenómenos de adhesión, proliferación, dispersión y diferenciación celular ósea sobre superficies de sílice, aunque en menor medida que los cambios en el grado de humectabilidad que se producen cuando se transforman químicamente los grupos superficiales, siendo el aumento de la hidrofilia a través de estos cambios químicos la variable más determinante.



# ***OBJETIVOS***

Me lo contaron y lo olvidé; lo vi y lo entendí; lo hice y lo aprendí.

Confucio (551-479 a. C.). Filósofo chino.





## **OBJETIVOS**

### **1. OBJETIVO PRIMARIO**

Estudiar el comportamiento de la línea celular de estirpe ósea MG-63 cultivada sobre superficies de sílice con distintos grados de humectabilidad y nanorugosidad en términos de modulación de la morfología, proliferación y expresión de distintos marcadores de diferenciación mediante técnicas inmunohistoquímicas.

### **2. OBJETIVOS SECUNDARIOS**

Analizar la topografía de las superficies de sílice modificadas mediante AFM (Microscopía de Fuerzas Atómicas) determinando cómo influye el grabado alcalino sobre su rugosidad superficial.

Analizar los cambios de humectabilidad en relación con el tratamiento químico superficial mediante la determinación del ángulo de contacto de gotas de agua por el método ADSA-P (Axisymmetric Drop Shape Analysis – Profile).



# ***MATERIALES***

# ***Y MÉTODOS***

Si quieres hacer una tarta de manzana partiendo de cero, primero  
tienes que crear el universo.

Carl Sagan (1934-1996). Astrónomo estadounidense.



# MATERIALES

## 1. OBLEAS DE SÍLICE

Se emplearon un total de 93 obleas de sílice (Si-Mat®, Landsberg, Alemania) de 525  $\mu\text{m}$  de grosor, tipo *p* y de 1 a 30  $\Omega\text{cm}$  de resistividad. Se cortaron en piezas cuadradas de 1 x 1 cm empleando una sierra especial para este propósito.

Un primer grupo de 48 obleas se dividió en dos subgrupos iguales de 24 obleas cada uno para cada destino (estudio de proliferación celular o caracterización mediante microscopía electrónica), es decir, 3 muestras para cada una de las 8 modificaciones superficiales a realizar por duplicado para cada tipo de observación. Las modificaciones realizadas fueron: 4 grados de rugosidad (a los que llamamos R1, R2, R3 y R4) y 5 grados de humectabilidad (a los que llamamos H0, H1, H2, H3 y H4; las muestras H0 coinciden con R1 puesto que no se realizó ninguna modificación sobre ellas).

Tras una primera experimentación en la que se realizó el estudio de proliferación y caracterización morfológica de los cultivos de MG-63 sobre obleas de sílice, se consideró oportuna la caracterización inmunohistoquímica de las células cultivadas sobre las superficies de mayor interés como fueron las H4, R1 y R4. Para ello se repitió el experimento con 3 obleas para cada una de estas modificaciones.

La experimentación con cada uno de estos grupos fue la misma durante todo el proceso salvo la fase final, dependiendo de si se hizo

estudio de proliferación celular, análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) o caracterización inmunohistoquímica.

Adicionalmente se confeccionaron otras 3 muestras de cada una de las modificaciones topográficas para el análisis cuantitativo de rugosidad y otras 3 muestras de cada una de las 8 modificaciones para el estudio de su humectabilidad.

Para diferenciar cada oblea, se empleó la nomenclatura “A-T-xy” donde *A* indica el grupo al que pertenece (*C* = obleas para contaje; *M* = obleas para microscopía; *I* = obleas para inmunohistoquímica), *T* el tratamiento de superficie realizado (*R* = rugosidad; *H* = hidrofobización), *x* el grado de modificación superficial (de 1 a 4) e *y* el número de muestra (de 1 a 3).

## **1. 1. MATERIALES PARA EL LAVADO, LIMPIEZA Y MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE**

- Solución básica de peróxido [ $\text{H}_2\text{O} : \text{H}_2\text{O}_2$  (30% v/v) :  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25% v/v), ratio 5:1:1 (v/v)].
- Estufa.
- Agua desionizada MilliQ.
- Solución ácida de peróxido [ $\text{H}_2\text{O} : \text{H}_2\text{O}_2$  (30% v/v) :  $\text{HCl}$  (37% v/v), ratio 6:1:1 (v/v)].
- Gas  $\text{N}_2$ .
- Etanol.

- Tricloroetileno (TCE) (Fluka, Schnelldorf, Alemania).
- Dimetildiclorosilano (DDS) [ $\text{Cl}_2(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ; Fluka, Schnelldorf, Alemania].
- Solución básica de NaOH 0.1 M.

## **1. 2. MATERIALES PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERFICIE DE SÍLICE**

Equipamiento para técnica ADSA-P de determinación del ángulo de contacto ( $\theta$ ):

- Mesa antivibratoria Vibraplane (Kinetic System, Boston, MA, EE.UU.).
- Microposicionador de superficies y gotas (Narishige, Tokio, Japón).
- Microscopio Apo-Zoom Wild 400076 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).
- Fuente de luz halógena anular modelo GLS 150 (Leica Instruments GMBH, Nussloch, Alemania).
- Cámara de video CCD monocroma modelo SSC-M370CE (Sony, Tokio, Japón).
- Retícula de calibración de 0,25 mm de lado (Graticules Limited, Tonbridge, Reino Unido), plomada y calibre circular de 0,3 cm.



- Instrumental para depósito y creación de gotas:
  - Dos microjeringas (Labsystems Oy, Helsinki, Finlandia; Gilmont, Barrinton, IL, EE.UU.).
  - Micropipeta de puntas desechables (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).
  - Microinyector Microlab 500 (Hamilton, Reno, NV, EE.UU.) con jeringa de 0,025 ml (Hamilton, Reno, NV, EE.UU.).
  - Equipo informático tipo PC y software frame-grabber (DT 3155, Data Translation GmbH, Bietigheim-Bissingen, Alemania).

Para la determinación de la rugosidad a nivel nanométrico se empleó un Microscopio de Fuerzas Atómicas digital Nanoscope IV MultiMode® (Digital Instruments, Santa Bárbara, Ca, EE.UU.).

## 2. MODELO CELULAR ÓSEO

Se empleó como modelo celular óseo la contrastada línea celular MG-63 (Billiau y cols. 1977). Dicha línea fue suministrada por el Banco de Células del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada y cuyo número de referencia de la ATCC es CRL-1427. MG-63 es una línea derivada de osteosarcoma humano, concretamente varón, caucásico de 14 años. Esta línea celular requiere actuar en cultivo con un nivel 1 de bioseguridad.

### **3. MATERIAL PARA INMUNOHISTOQUÍMICA**

- Shandon Cytospin® 4 Cyto centrifuge (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EE.UU.).
- Solución de glicoles y resinas para sección en frío (OCT, Sakura Tissue, TekR, Japón).
- Criostato (Microm HM500, Walldorf, Alemania).
- Poli-L-lisina al 0.02%, adhesivo para secciones de tejidos.
- Kit MASVISION Universal para la detección y revelado de anticuerpos primarios mono y policlonales (Master Diagnostica, Granada, España).

#### **3. 1. ANTICUERPOS PARA EL TIPAJE DE LA LÍNEA CELULAR MG-63**

- HLA-ABC (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EE.UU.): Se empleó como control positivo ya que se expresa en todas las células nucleadas. Juega un papel importante en la respuesta inmune y la vigilancia tumoral.
- CD14 (Becton Dickinson Biosciences): Se empleó como control negativo. Es una proteína de membrana observada en macrófagos. Su función es la unión a lipopolisacáridos de origen bacteriano.
- CD45 (Becton Dickinson Biosciences): También conocido como antígeno común de leucocitos, también se empleó

como control negativo. Se trata de una proteína transmembrana de tipo I presente en todas las células hematopoyéticas excepto en eritrocitos.

- CD10 (Becton Dickinson Biosciences): Es una metaloendopeptidasa que funciona como una enzima de superficie. Está encargada de reducir la respuesta celular frente a hormonas peptídicas regulando la concentración local de péptidos mediante su degradación. Puede tener importancia en los fenómenos de remodelación de la matriz extracelular.
- CD20 (Becton Dickinson Biosciences): Es una proteína de transmembrana de tipo III que forma un canal que permite el flujo de calcio hacia el interior de la célula. Se expresa casi exclusivamente en leucemias y linfomas.
- CD38 (Becton Dickinson Biosciences): Es una ectoenzima multifuncional que se encuentra expresada en una amplia variedad de células y tejidos. Se encarga de mediar en la adhesión celular y la transducción de señales intracitoplasmáticas inducidas por el calcio.
- CD55 (Becton Dickinson Biosciences): También se conoce como DAF (Complement Decay-Accelerating Factor). Es un factor regulador de una de las tres vías del sistema del complemento.

- CD56 (Immunotech, Marsella, Francia): También denominada N-CAM. Su expresión está asociada con células de origen linfóide, sobre todo linfocitos NK, aunque se puede encontrar en otros tipos celulares. Es una proteína que media en la adhesión intercelular y como señalizador celular, interviniendo en el proceso de activación del receptor para FGF.
- CD59 (Immunotech): También conocido por las siglas MACIF (Membrane attack complex inhibition factor). Al igual que CD55 es un factor regulador de la cascada del sistema del complemento.
- CD95 (Becton Dickinson Biosciences): También llamado Apo-1 o receptor Fas, es miembro de la superfamilia de los receptores para factores de necrosis tumoral.
- CCR5 (Becton Dickinson Biosciences): Es un receptor de membrana presente en macrófagos, entre otros tipos celulares.
- CXCR3 (Becton Dickinson Biosciences): También conocido como CD183, es el receptor para algunas quimioquinas. Su activación induce la activación de integrinas, cambios en el citoesqueleto y la migración quimiotáctica asociada a procesos inflamatorios.
- CXCR4 (Becton Dickinson Biosciences): También conocido como CD184. Es el receptor para la quimioquina

de tipo CXC SDF-1. Dentro del desarrollo embrionario, está implicado en la linfopoiesis y mielopoiesis, la cardiogénesis, la formación de vasos sanguíneos y el desarrollo del cerebelo.

- HLA-DR (Becton Dickinson Biosciences): Es una glicoproteína de transmembrana, que forma parte del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II. Juega un papel imprescindible en el inicio de la respuesta inmune.

### **3. 2. EXPRESIÓN DE MARCADORES TRAS CULTIVO SOBRE OBLEAS DE SÍLICE**

Tras el cultivo sobre las obleas de sílice seleccionadas, las células fueron liberadas para determinar la expresión de:

- Actina (Master Diagnostica): La actina es una familia de proteínas globulares que forman los microfilamentos, uno de los tres componentes fundamentales del citoesqueleto de las células de los organismos eucariotas. Formando microfilamentos en un proceso dinámico proporciona un andamiaje que dota a la célula de una forma con posibilidad de remodelarse rápidamente aumentando la superficie celular para la absorción o proporcionando soporte a la adhesión de otras células. Contribuye a procesos como el transporte intracelular de vesículas y orgánulos y la migración celular.

- Caldesmón (Master Diagnostica): Es una proteína de unión a calmodulina que inhibe la actividad de la actín-tropomiosín MgATPasa. Además se une al calcio y a la actina intracelulares. La isoforma I es la que se encuentra en células no musculares.
- CD10 (Master Diagnostica).
- CD56 (Master Diagnostica).
- COX-2 (Master Diagnostica): Es una proteína proinflamatoria indetectable en tejidos normales pero que se expresa ampliamente en macrófagos activados y otras células en sitios de inflamación.
- Ki67 (Master Diagnostica): Su expresión se asocia con los fenómenos de proliferación celular ya que se expresa en todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y M) excepto en la fase de reposo G0. En numerosos tumores, una expresión mayor del 10% se puede correlacionar con malignidad. Se emplea, por tanto, como determinante principal de la proporción proliferativa.
- Osteocalcina (Master Diagnostica): La osteocalcina es una hormona peptídica lineal formada por 49 aminoácidos y producida por los osteoblastos durante la formación ósea, incorporándose dentro de la matriz del hueso. Este péptido tiene una vida media muy corta. Puede unirse a la hidroxiapatita. Alrededor del 20% de la osteocalcina

sintetizada no se incorpora al hueso, pasando a la circulación sanguínea y pudiendo ser medida en suero. Los niveles de osteocalcina se correlacionan positivamente con el cociente de formación ósea. Se observan incrementos de osteocalcina en aquellas patologías donde hay un incremento en la actividad osteoblástica. En estos casos las concentraciones de osteocalcina se correlacionan bien con otros marcadores como la fosfatasa alcalina y la histomorfometría ósea.

- TRAP (Fosfatasa ácida tártaro-resistente) (Master Diagnostica): Se puede encontrar de forma normal en linfocitos B y osteoclastos.
- Vimentina (Master Diagnostica): Es uno de los filamentos intermedios más abundantes en todas las células mesenquimales. Se expresa en tejidos originados tanto del ecto como mesodermo.

#### **4. MATERIAL PARA CULTIVO Y ESTUDIO DE PROLIFERACIÓN CELULAR**

Las técnicas de descongelación, cultivo y cocultivo de las células óseas en material de sílice fueron realizadas en el laboratorio del Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada/Junta de Andalucía, concretamente en el Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa.

- Centrifugadora modelo Eppendorf Centrifuge 5810 R.

- 
- Campana de flujo modelo Aura Vertical S.D.4 (Bio Air Instruments, Siziano, Italia).
  - Estufa de cultivo Steri Cult CO<sub>2</sub> Incubator – HEPA Class 100 (Thermo Electro Corporation, NY, EE.UU.), siempre mantenida a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>.
  - Pipetas Nichipet EX (Japón) con distintos intervalos de aspiración.
  - Material para estudio de proliferación celular:
    - Cámara de Neubauer.
    - Cubreobjetos de cristal.
    - Microscopio Nikon Labophot HFX-IIA (Nikon Corporation, Tokyo, Japón).
    - Azul trypan.
  - Material Fungible:
    - Puntas de pipetas Neptune Barrier Tips; presentan un filtro de seguridad y son adaptables al tipo de pipeta descrito anteriormente.
    - Tubos Eppendorf y tubos universales de laboratorio.
    - Frascos de cultivo de 250 ml (Falcon, Labware, Oxford, Reino Unido).



- Microplacas estériles de poliestireno de 24 pocillos de 16 mm de diámetro (Iwaki, Asahi Techno Glass, Japón).
- Porta y cubre objetos Menzel-Glaser (Braunschweig, Alemania).
- Medios de cultivo y soluciones:
  - Medio Esencial Mínimo de Eagle (EMEM) (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.) con BSS de Earle junto con 2.0 mM de glutamina modificado conteniendo: 1.0 mM de piruvato sódico, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (NEAA), 1.5 g/l de bicarbonato sódico, suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado.
  - Medio Esencial Dulbecco Modificado (DMEM) (Sigma) conteniendo 4,5 g/l de glucosa, L-glutamina, piruvato sódico y bicarbonato sódico.
  - Suero bovino fetal (FBS) (Sigma).
  - Tampón fosfato salino (PBS) (Sigma) sin cloruro cálcico ni cloruro magnésico.
  - Solución de Tripsina-EDTA (Sigma).

## **5. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA**

### **5. 1. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO**

Las imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de alta resolución fueron obtenidas con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) LEO modelo 1530-GEMINI (Zeiss/LEO, Oberkochen, Alemania) con una intensidad de 5Kv y una amplitud de onda de 3mm.

### **5. 2. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN**

Para la obtención de imágenes de los distintos preparados biológicos analizados en este trabajo mediante la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) se empleó un microscopio electrónico Zeiss modelo DSM 950 (Berlín, Alemania).

### **5. 3. MICROSCOPIO ÓPTICO**

Las imágenes de microscopía óptica presentadas se obtuvieron empleando un microscopio Nikon Phase contrast – 2 ELWD 0.3 (Nikon Corporation) que llevaba acoplada una cámara NIKON Coolpix 5400 (Nikon Corporation) con 5.5 Megapíxeles de resolución.

## METODOLOGÍA

### 1. MODIFICACIÓN DE LAS SUPERFICIES DE SÍLICE

El proceso de lavado y limpieza de las obleas de sílice previo al tratamiento de superficie se realizó mediante inmersión durante 5-10 min en solución básica de peróxido [ $\text{H}_2\text{O} : \text{H}_2\text{O}_2$  (30% v/v) :  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25% v/v), ratio 5:1:1 (v/v)] a 80° C. Posteriormente, se lavó en agua desionizada MilliQ. Se realizó la inmersión durante 5 min en solución ácida de peróxido [ $\text{H}_2\text{O} : \text{H}_2\text{O}_2$  (30% v/v) :  $\text{HCl}$  (37% v/v), ratio 6:1:1 (v/v)] a 80° C, a concentraciones finales de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{HCl}$  de 1.5 M. Finalmente, se lavó en agua desionizada y se secó con gas  $\text{N}_2$ .

Este proceso, como demostró Ortega-Vinuesa y cols. (Ortega-Vinuesa y cols. 1998), crea una capa oxidada con grupos hidroxilo haciendo la superficie extremadamente hidrófila.

#### 1. 1. MODIFICACIÓN DE LA HUMECTABILIDAD

Para la obtención de diferentes grados de humectabilidad, seguimos el protocolo descrito por Ortega-Vinuesa y cols. (Ortega-Vinuesa y cols. 1998) mediante la cual se consigue la metilación de la superficie de la sílice en distinta gradación en función de la concentración de las soluciones empleadas. El protocolo consistió en:

1. Lavado por dos veces en etanol y una en TCE (Fluka).
2. Incubación a temperatura ambiente durante 10 min en solución no agitada de DDS (Fluka) a diferentes concentraciones según el grado de metilación deseado (en

nuestro caso fueron soluciones de 0.003%, 0.006%, 0.012% y 0.062% en 40 ml de TCE).

3. Lavado en etanol, TCE y etanol, en este orden.
4. Lavados con agua.
5. Secado con gas N<sub>2</sub>.

## **1. 2. MODIFICACIÓN DE LA RUGOSIDAD**

Para la modificación de la rugosidad, tras el lavado y secado con gas N<sub>2</sub>, las muestras se introdujeron en soluciones acuosas de NaOH a concentración 0.1 M durante diferentes tiempos a temperatura ambiente; en nuestro estudio se realizaron a 0, 22, 60 y 165 minutos. Tras este proceso y con el fin de eliminar el exceso de solución alcalina se introdujeron las muestras en agua desionizada MilliQ para posteriormente secarlas con gas N<sub>2</sub>.

La superficie original de sílice sin tratamiento de metilación fue denominada H0; ésta coincide con la que denominamos R1, puesto que tampoco tenía ningún tratamiento de modificación de rugosidad superficial. Igualmente, todas las muestras del grupo H fueron R1 en cuanto a su rugosidad puesto que no se modificó esta propiedad.

## **2. CARACTERIZACIÓN DE LAS SUPERFICIES DE SÍLICE**

Se realizó sobre muestras que no serían utilizadas posteriormente para cultivo celular sobre ellas para así evitar el posible daño de la superficie que pudiera afectar a las fases posteriores.

### **2.1. DETERMINACIÓN DE LA RUGOSIDAD**

Para la determinación cuantitativa de la rugosidad superficial de las obleas de sílice se empleó el Microscopio de Fuerzas Atómicas (AFM). Se realizó únicamente sobre las muestras del grupo R, puesto que como hemos dicho anteriormente, todas las del grupo H presentan una rugosidad R1 por las características del experimento.

Se analizaron 3 piezas de cada una de las muestras, y se realizaron 3 lecturas de rugosidad para cada una de las mismas.

La muestra se montó en un tubo cerámico piezoeléctrico que permite movimientos en los tres ejes del espacio con precisión subnanométrica. Se pone en contacto con la punta con una fuerza no superior a los 10 N y, mediante un barrido de la superficie, realiza un mapa topográfico. La resolución vertical es de aproximadamente 0,1 nm. Se realizó el escaneo de áreas cuadradas cuyos lados medían entre 5 y 2 mm. El instrumento fue calibrado periódicamente empleando un disco estándar con surcos de 180 nm de profundidad y depresiones de 10 x 10 mm.

Se calcularon los valores de los siguientes parámetros para caracterizar la rugosidad y textura superficial (Gadelmawla y cols. 2002):

*Mínimo*: altura mínima o profundidad máxima respecto a la línea de referencia.

*Máximo*: altura máxima con respecto a la línea de referencia.

*Ra* (Media aritmética de las desviaciones del perfil): es la media aritmética del valor absoluto de las distancias desde la línea de referencia. Es el parámetro habitual para cuantificar la rugosidad de una superficie.

*Rq* o *RMS* (media cuadrática de rugosidad): representa la desviación estándar de la distribución estadística de las alturas de los picos y valles en superficie con respecto al valor *Ra*. Tanto *Ra* como *Rq* son parámetros ampliamente empleados en Implantología (Brault y cols. 1998, Schweikl y cols. 2007).

*r*: ratio entre el área de superficie estudiada por el método de triangulación simple y el área proyectada de esa superficie (Nečas & Klapetek 2008). Este parámetro se emplea para describir explícitamente la humectabilidad y los fenómenos de adhesión entre superficies. En Implantología se emplea al ofrecer información sobre la cantidad de superficie expuesta para la aposición de hueso (Donoso y cols. 2007).

*Dimensión fractal (Df)*: proporciona información sobre la complejidad estructural de la superficie. En la práctica, los objetos poseen una rugosidad aleatoria pero a su vez con autosimilitud en una escala determinada, que es la característica más significativa de los fractales. Es decir, existe un patrón que se repite a diferentes escalas, extremo éste que se da también en las superficies de sílice sometidas a grabado alcalino (Brault y cols. 1998, Dotto & Kleinke 2001). Para su determinación se

empleó el método del espectro de potencia (Mannelquist y cols. 1998, Van Put y cols. 1994, Zahn & Zösch 1997), que se basa en el estudio de su autodependencia siguiendo un patrón de movimiento fraccional de tipo Browniano.

Con este método, todos los perfiles de altura que forman la imagen son transformados por el método de Fourier (operación matemática que transforma una función compleja con valores de una variable real en otra). A continuación se determina la media de todo el espectro y se calcula la  $Df$  a partir de la pendiente  $\beta$  del ajuste de mínimos cuadrados de la línea de regresión a los puntos de datos en una gráfica doble logarítmica.

*Skew*: caracteriza el grado de asimetría de la distribución de los valores alrededor de la media. Valores positivos indican la tendencia de los valores a superar la media. Valores alrededor de 0 indican una distribución normal.

*Kurtosis*: analiza el grado de concentración que presentan los valores alrededor de la zona central de la distribución. Junto con el valor *Skew* indica la normalidad de la distribución de los valores.

## 2. 2. DETERMINACIÓN DE LA HUMECTABILIDAD

Se realizó midiendo el ángulo de contacto estático ( $\theta$ ) mediante el método ADSA-P (Axisymmetric Drop Shape Analysis – Profile) en un ambiente controlado termostáticamente a 20°C (Rodríguez-Valverde y cols. 2002).

Para ello, tras el secado de la muestra con gas  $N_2$ , se depositó una gota de agua desionizada de 5  $\mu$ l de volumen sobre la muestra situada en

el microposicionador en posición horizontal. A través de los sistemas digitales de captura (cámara de video CCD monocroma adosada al microscopio) se obtuvieron las imágenes que se analizaron marcando los puntos necesarios para que el software (DT 3155) realizara los cálculos solicitados en base a unos parámetros matemáticos establecidos.

Mediante el análisis ADSA-P se puede evaluar de la tensión superficial y el ángulo de contacto a partir de la geometría de la gota depositada sobre una superficie. Se puede evaluar el ángulo de contacto de avance y de retroceso de gotas en movimiento, o como en nuestro caso, el ángulo de contacto estático, obtenido tras depositar una gota sobre la superficie y esperar un tiempo determinado a que ésta se estabilice.

El método persigue ajustar las coordenadas del perfil de la gota, medidas sobre una imagen, a la ecuación teórica de Laplace:

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

donde  $Y$  es la tensión interfacial,  $R_1$  y  $R_2$  representan los radios principales de curvatura de la gota y  $\Delta P$  es la diferencia de presiones a través de la interfase.

El software calcula el ángulo de contacto a partir de los puntos marcados sobre el perfil de la gota, la densidad del líquido y la aceleración local de la gravedad. Para conseguir datos realistas es muy importante tomar la imagen en el momento en que el perfil de la gota a analizar posea una geometría simétrica.



Los datos de ángulo de contacto ( $\theta$ ) reportados fueron obtenidos realizando la media aritmética de 6 mediciones diferentes para cada una de las 3 muestras de cada tipo de modificación superficial.

### **3. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA TEM Y SEM**

Estos procesos se llevaron a cabo en la Unidad de Preparación de Muestras Biológicas del Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

#### **3.1. PROTOCOLO PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN**

1. Fijación con glutaraldehído al 2.5% en una solución 0.1 M de tampón de cacodilato de sodio (pH 7.4) durante una hora a temperatura ambiente.

2. Lavado 3 veces en tampón cacodilato 0.1 M con pH 7.4 con intervalos de 10 minutos entre cada lavado a temperatura entre 0°C y 4°C.

3. Postfijación en una solución de agua destilada con tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 1% y ferricianuro potásico al 1% durante 60 minutos en oscuridad, a temperatura entre 0°C y 4°C.

4. Lavado 3 veces en agua destilada con intervalos de 5 minutos a temperatura entre 0°C y 4°C.

5. Aplicación de ácido tánico al 0.15% en tampón cacodilato durante un minuto a temperatura ambiente.

6. Inmersión en solución tampón cacodilato durante 5 minutos a temperatura ambiente.

7. Lavado 2 veces con agua destilada con un intervalo de tiempo de 5 minutos a temperatura ambiente.

8. Inmersión en una solución de agua bidestilada con acetato de uranilo al 2%, en oscuridad y a temperatura ambiente durante 120 minutos.

9. Lavado 3 veces con agua bidestilada, a intervalos de 5 minutos a temperatura ambiente.

10. Deshidratación con un gradiente de concentraciones crecientes de etanol a temperatura entre 0°C y 4°C, siguiendo este protocolo:

- a) Etanol al 50% durante 5 minutos.
- b) Etanol al 75% durante 5 minutos.
- c) Etanol al 90% durante 5 minutos.
- d) Etanol al 95% durante 5 minutos.
- e) Etanol al 100% durante 5 minutos.
- f) Etanol al 100% durante 5 minutos.
- g) Etanol al 100% durante 5 minutos.
- h) Etanol al 100% durante 5 minutos.

11. Infiltración en Epon-etanol 1:2 durante 60 minutos a temperatura ambiente.

12. Infiltración en Epon-etanol 1:1 durante 60 minutos a temperatura ambiente.

13. Infiltración en Epon-etanol 2:1 durante 60 minutos a temperatura ambiente.

14. Infiltración en Epon completo durante toda una noche a una temperatura de entre 0°C y 4°C.

15. Separación de las muestras del recipiente con óxido de propileno.

16. Corte de secciones ultrafinas, con un grosor de 500 a 700  $\mu\text{m}$ , que se montan sobre rejillas de cobre.

17. Por último y para dejar las muestras listas para observación, se contrastó con acetato de uranilo y citrato de plomo.

### **3. 2. PROTOCOLO PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO**

1. Fijación de las muestras en una solución de glutaraldehído al 2.5% en PBS, pH=7.4, durante 24 horas a 4°C.

2. Lavado en el mismo tampón en el que va el fijador (3 cambios de 20 minutos a 4°C).

3. Postfijación con  $\text{OsO}_4$  al 1% en oscuridad durante 2 horas, a temperatura ambiente.

4. Lavado en agua desionizada para eliminar los restos del tetróxido de osmio (3 cambios de 20 minutos cada uno).

5. Deshidratación en un gradiente de concentraciones crecientes de Etanol, con los siguientes pasos:

a) Etanol al 50% durante 15 minutos.

b) Etanol al 70% durante 15 minutos.

c) Etanol al 90% durante 15 minutos.

d) Etanol al 100%, dos cambios de 15 minutos.

6. Deseccación por el método por Punto Crítico (Anderson 1951) con dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en un secador de Punto Crítico (Polaron CPD7501).

7. Montaje de la muestra en pletina portamuestras.

8. Recubrimiento de la muestras por evaporación de carbón.

9. Montaje y recubrimiento con oro/paladio de 250 Å de grosor para proporcionarle conductividad eléctrica a la muestra.

#### **4. CULTIVO DE LAS CÉLULAS**

Inicialmente, las células fueron sometidas a un proceso de descongelación en el cual la ampolla en la que se almacenan en congelación se dejó a temperatura ambiente durante 1 minuto y posteriormente se transfirió a un baño de agua a 37°C durante 1 o 2 minutos, sin sumergir totalmente la ampolla, hasta la descongelación. La

ampolla se limpió con alcohol al 70% antes de abrirla. Se pipetearon 0.5 ml de medio previamente calentado a 37°C y se transfirió todo el contenido a un tubo Eppendorf estéril. Se rellenó de medio de cultivo y se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 80-100 G.

El cultivo fue resuspendido y distribuido en un frasco de cultivo de 250 ml (Falcon). A este frasco se añadió la cantidad adecuada de medio de cultivo. El medio de cultivo empleado consistió en EMEM con BSS de Earle junto con 2 mM de glutamina modificado conteniendo 1.0 mM de piruvato sódico, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (NEAA), 1.5 g/L de bicarbonato sódico y suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado.

Los cultivos se introdujeron en la estufa de cultivo a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>. El medio fue renovado cada 2 ó 3 días.

Una vez obtenida la cantidad suficiente de células se procedió a la realización de las siguientes fases experimentales.

#### **4. 1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LA LÍNEA CELULAR MG-63**

Antes de ser cultivada sobre las obleas de sílice, la línea celular fue caracterizada morfológicamente por técnicas de microscopía óptica y electrónica de transmisión y de barrido, tanto de alta como de baja resolución, siguiendo los protocolos de preparación de muestras descritos anteriormente.

## **4. 2. CULTIVO DE CÉLULAS MG-63 SOBRE OBLEAS DE SÍLICE**

Una vez conseguidos cultivos confluentes de células de la línea MG-63, indicativo de un número adecuado de células, éstas fueron separadas del frasco de cultivo depositando en el frasco de cultivo (Falcon) 10 ml de una solución de Tripsina-EDTA (Sigma) durante 10 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se neutralizó la actividad enzimática con 10 ml de medio DMEM (Sigma). La suspensión celular obtenida se depositó en un frasco universal y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos. El botón celular obtenido se resuspendió en medio de cultivo. De esta suspensión se tomó una muestra y se realizó una observación en cámara de Neubauer. Mediante este conteo celular se determinó la densidad de la suspensión. Se realizó un nuevo centrifugado y se depositó el botón celular en la cantidad adecuada de medio de cultivo para conseguir una densidad de 5000 células/ml.

Por otro lado, cada una de las obleas de sílice modificadas se depositó en un pocillo debidamente identificado de una microplaca estéril (Iwaki) de 24 pocillos.

A continuación se depositó sobre cada oblea la cantidad de 100 µl de la suspensión celular, asegurando así una cantidad inicial de células conocida sobre cada oblea, 500 células/oblea. Se completó cada pocillo con una cantidad de 2 ml de medio de cultivo, vertido muy suavemente para evitar la dispersión de las células. Cada 2-3 días se renovó el medio de cultivo. El medio empleado en este caso fue DMEM (Sigma) suplementado con suero bovino fetal.

Finalmente, las placas se incubaron a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> (5%) en la estufa de cultivo durante 21 días. El medio de cultivo fue renovado cada 48 horas.

La experimentación descrita hasta este punto se realizó por triplicado de forma que dispusiéramos de un grupo de muestras para estudio de proliferación celular, otro grupo para observación mediante microscopía electrónica de barrido y otro para caracterización inmunohistoquímica.

#### **4.3. ESTUDIO DE PROLIFERACIÓN CELULAR DE MG-63 TRAS CULTIVO SOBRE OBLEAS DE SÍLICE**

Una vez transcurrido el periodo de incubación, se extrajeron las obleas de la placa de cultivo. Cada oblea se trató con 2 ml de una solución de Tripsina-EDTA (Sigma) a 37°C durante 10 minutos con agitación. Transcurrido este tiempo, se neutralizó la actividad enzimática con 2 ml de medio de cultivo DMEM (Sigma). La suspensión celular obtenida se depositó en un frasco universal y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante, dejando sólo el botón celular que se resuspendió en 0.5 ml. De aquí se tomaron 50 µl, se depositaron en tubos Eppendorf y se añadieron otros 50 µl de azul trypan. De esta suspensión se tomó la muestra para contaje en cámara de Neubauer.

Por cada suspensión, se realizó el contaje de cuatro campos y se hizo la media aritmética. Al conocer las diluciones de la suspensión, se pudo calcular el número de células por ml que fueron despegadas de cada oblea de sílice.

#### **4. 4. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE MG-63 TRAS CULTIVO SOBRE OBLEAS DE SÍLICE**

Tras los cultivos sobre las muestras de sílice, éstas fueron procesadas para su observación al FESEM en la Unidad de Preparación de Muestras Biológicas del Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

#### **4. 5. CARACTERIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE MG-63**

Las células fueron caracterizadas mediante estudio inmunohistoquímico tanto de forma previa a su cultivo sobre las obleas de sílice como posteriormente.

Para ello las células MG-63 fueron separadas mediante una solución de Tripsina-EDTA (Sigma). Se procedió a la citocentrifugación para posteriormente descartar el sobrenadante, lo que nos ofreció un botón celular que fue incluido en OCT (Sakura Tissue), para posteriormente ser congelado a  $-40^{\circ}\text{C}$ . Se obtuvieron diversos cortes de  $3\ \mu\text{m}$  que fueron colocados en portaobjetos de vidrio con poli-L-lisina al 0.02%. Posteriormente se siguió el procedimiento de tinción para inmunohistoquímica siguiente:

- 1.- Bloqueo de la peroxidasa endógena mediante inmersión en solución de peróxido de hidrógeno durante 10-15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, para después aclararlas en TBS 3 veces durante 5 minutos.



2.- Incubación del anticuerpo primario cubriendo las secciones con el anticuerpo correspondiente siguiendo las instrucciones del fabricante de cantidad y tiempo de aplicación para cada uno de los anticuerpos seleccionados, descritos anteriormente para cada una de las caracterizaciones. Posteriormente se lavaron las muestras con TBS 3 veces durante 5 minutos cada vez.

3.- Incubación del polímero conjugado con peroxidasa y fracción de inmunoglobulina F (ab') aplicando 100 µl del Reactivo A del kit MASVISION (Master Diagnostica) a cada una de las muestras a temperatura ambiente durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se lavaron las muestras de nuevo con TBS 3 veces durante 5 minutos.

4.- Realización del revelado de inmunotinción añadiendo 50 µl del Reactivo B del kit MASVISION (Master Diagnostica) a 1 ml de agua destilada, 50 µl del Reactivo C y 50 µl del Reactivo D para obtener finalmente la solución sustrato/cromógeno. Esta mezcla se añadió a cada una de las muestras hasta cubrirla completamente. Este preparado se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se aclaró con agua destilada 3 veces durante 5 minutos.

5.- Intensificación de la tinción aplicando el Reactivo E del kit MASVISION (Master Diagnostica) cubriendo las muestras entre 1 y 2 minutos a temperatura ambiente.

6.- Contraste de la muestra cubriéndola con el Reactivo F del kit MASVISION (Master Diagnostica) durante 1-2 minutos. Posteriormente se lavaron las muestras con agua bidestilada.

7.- Aclarado y montaje deshidratando las muestras por pasos sucesivos en soluciones de alcohol de concentración creciente.

8.- A continuación las muestras se montaron con Bálsamo de Canadá y su correspondiente cubreobjetos.

8. Finalmente se procedió a la observación de las muestras y toma de imágenes para su análisis.



# ***RESULTADOS***

Prefiero entender un porque que ser el rey de Persia.

Demócrito de Abdera. (460-370 a. C.). Filósofo griego.



## RESULTADOS

### 1. CARACTERIZACIÓN DE LAS SUPERFICIES DE SÍLICE

#### 1.1. DETERMINACIÓN DE LA RUGOSIDAD

Se realizó el estudio de la superficie del grupo R mediante AFM empleando un área de  $2,5 \times 2,5 \mu\text{m}$  para la obtención de datos. Estos datos fueron medidos en nm, no en  $\mu\text{m}$  puesto que la resolución del AFM alcanza una mayor resolución, siendo éste uno de los objetivos del empleo de este tipo de microscopía. Con la caracterización de la superficie en nm pudimos observar si la rugosidad a esta escala influye en la proliferación celular.

Los datos del análisis de superficie se encuentran expresados en la Tabla 1. En ella podemos observar un aumento progresivo en todos los valores de interés en el presente estudio (*Mínimo*, *Máximo*, *Ra*, *Rq*, *r* y *Df*). Los valores mínimos aumentan hacia una mayor negatividad, indicando la mayor profundización del grabado erosionando la superficie de forma que se aleje más de la línea de referencia.

Los valores de *Ra* (entre 0.33 y 16.6 nm) así como de *Rq* (entre 0.61 y 20.7 nm) aumentaron con el tiempo de grabado. El análisis más preciso de los datos indicó que los valores *Ra* y *Rq* alcanzaron un nivel de saturación para los tiempos de grabado superiores. Esto quedó demostrado con el análisis de los valores *r* (entre 1.00 y 1.39) y *Df* (entre 2.22 y 2.53), los cuáles aumentaron inicialmente a tiempos de grabado inferiores 60 min. A partir de ese tiempo de tratamiento, los valores

comenzaron a estabilizarse, entre 1.35 y 2.5 para  $r$  y  $Df$ , respectivamente. La tendencia de todos los parámetros de rugosidad reflejó un modelo de evolución que permite trazar una curva Sigmoidal acumulativa de Boltzmann (Figura 1).

Los valores *Skew* y *Kurtosis* en las superficies R2-R4 fueron relativamente cercanos a 0 lo que indicó la distribución normal de los valores de rugosidad. En R1, sin embargo, éstos valores fueron altos lo que significa que en la superficie no tratada, los valores de rugosidad presentan una alta aleatoriedad.

Por tanto, como podemos observar, existió correlación entre los valores medidos y el tiempo de tratamiento con el NaOH, confirmando que esta solución es capaz de crear modificaciones en la superficie del material empleado. Esto se pudo confirmar visualmente a partir de las imágenes obtenidas por AFM, como puede comprobarse en la Figura 2 hasta la Figura 5. En la Figura 6 podemos observar a escala nanométrica mediante imágenes SEM la topografía obtenida tras el grabado. Como puede confirmarse, la escala es extremadamente pequeña, con magnificaciones del orden de las 30.000X; 120.000X en el detalle (Figura 7).

## 1. 2. DETERMINACIÓN DE LA HUMECTABILIDAD

En la Tabla 2 podemos observar los datos obtenidos de las mediciones de los ángulos de contacto sobre las diferentes muestras. En ella comprobamos un aumento progresivo del ángulo de contacto estático desde valores mínimos por debajo de  $7^\circ$  (indicando una gran hidrofilia) hasta los más altos alrededor de  $95^\circ$  (lo que indica una alta hidrofobia). La

obtención de estas medidas se realizó sobre las imágenes tomadas sobre cada una de las superficies mediante el método ADSA-P, siendo extremadamente difícil la determinación exacta del ángulo de contacto en algunas de ellas, especialmente R1 y R2 (Figura 8 en adelante).

Relacionando estos valores con la concentración de DDS en la solución empleada para el tratamiento superficial (en superficies H) se pudo observar una relación en curva sigmoideal (Figura 16). Este aumento del ángulo de contacto indicó que la metilación de la superficie se produjo de forma efectiva.

## **2. CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR MG-63**

### **2. 1. MICROSCOPIA ÓPTICA**

En primer lugar se realizó una observación al microscopio óptico para la visualización y seguimiento de células en cultivo. El cultivo se desarrollaba en monocapa y de forma confluyente con células pleomórficas predominantes aunque se pudieron observar formas estrelladas con amplio citoplasma. De algunas de ellas partían numerosas y extensas prolongaciones citoplasmáticas. En menor proporción se observaron también células de morfología fusiforme o redondeada (Figura 17).

### **2. 2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y DE TRANSMISIÓN**

El análisis por SEM mostró que las células presentaban una morfología similar a la observada mediante microscopía óptica en cultivo (Figura 18). Pudieron observarse también células esferoidales abundantes



cuya superficie era muy irregular (Figura 19). También detectamos células fusiformes y con grandes prolongaciones citoplasmáticas (Figura 20).

Mediante el análisis con TEM de las células MG-63 aisladas del cultivo celular se observó la morfología propia de células resuspendidas con un núcleo de contorno irregular, múltiples nucleolos y un amplio citoplasma (Figura 21). En él se observaron numerosas vesículas (Figura 22) y organelas incluyendo un gran número de mitocondrias, un RER amplio dispuesto alrededor del núcleo y que se continúa con cisternas del REL (Figura 23).

### **2. 3. TIPAJE MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA**

El análisis de la expresión de marcadores mostró una marcada positividad para CD10, CD55, CD56, CD59 y CD95 así como para el control positivo HLA-ABC. El marcador CXCR3 se expresó más levemente. La expresión de los marcadores CD14/CD45, CD20, CD38, CCR5, CXCR4 y HLA-DR fue negativa. Los resultados se recogen en la Tabla 3.

## **3. ESTUDIO DE PROLIFERACIÓN CELULAR SOBRE OBLEAS DE SÍLICE**

Los datos obtenidos de los diferentes estudios de proliferación celular mediante cámara de Neubauer tras despegar las células adheridas sobre las distintas obleas de sílice se expresan en la Tabla 4, donde aparecen únicamente las medias de todos los contajes realizados en cada una de las muestras.

### 3. 1. PROLIFERACIÓN CELULAR Y HUMECTABILIDAD

El cultivo de las células MG-63 sobre las superficies de sílice con modificación de la humectabilidad (con un rango de ángulos de contacto entre  $<7^\circ$  y  $95^\circ$ ) mostró una relación sigmoideal entre las células liberadas de la superficie y la concentración de DDS empleada en la modificación superficial. Se observó el mismo tipo de correlación que al estudiar el ángulo de contacto en función de la concentración de DDS en la solución (Figura 16). La elevada similitud entre las dos curvas sugiere una fuerte correlación entre el número de células adheridas y el ángulo de contacto de la superficie. De hecho, se observó una relación lineal entre la proliferación celular y el ángulo de contacto, mostrando un coeficiente de correlación lineal muy cercano a 1 ( $r = 0.98775$ ) (Figura 24).

### 3. 2. PROLIFERACIÓN CELULAR Y NANORUGOSIDAD

El análisis de la correlación entre la rugosidad superficial a escala nanométrica ( $Ra$ ) y la proliferación celular indicó que ésta aumenta al aumentar el valor  $Ra$ , especialmente entre 0 y 3 nm (Figura 25). A pesar de que en la relación entre  $Ra$ ,  $Rq$  y  $r$  se observó un *plateau* a partir de ciertos valores, la relación con la complejidad estructural, determinada por la  $Df$ , se comportó de forma diferente (Figura 26). En este último caso no se observó un *plateau* tan marcado, lo que demostró que en la proliferación celular tuvo una mayor importancia este parámetro estructural que el resto.

## **4. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA TRAS CULTIVO EN OBLEAS DE SÍLICE**

La caracterización morfológica realizada de los cultivos sobre las obleas de sílice se realizó mediante el estudio de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

### **4.1. CULTIVO SOBRE OBLEAS DE SÍLICE “R”**

En las muestras R, a pesar de existir un mayor número de células en correlación con el aumento de la rugosidad, con la observación del cultivo en su conjunto se pudo determinar cómo el crecimiento en las superficies menos rugosas se produjo de forma más confluyente (Figura 27), es decir, las células tendían a agruparse en las superficies menos rugosas y más hidrofílicas, mientras que en las muestras más rugosas, el cultivo se encontraba más disperso (Figura 29).

De igual forma, en las superficies menos rugosas se pudo observar un gran número de células de morfología esférica (Figura 28), lo que indicó que no se encontraban adheridas a la superficie pero sí probablemente a células de un estrato inferior. Esto es característico de un crecimiento por capas.

Con el mismo patrón ascendente se observó el aumento de prolongaciones a modo de lamelopodios emitidos por los osteoblastos al aumentar la rugosidad (Figura 30). Estas prolongaciones, a diferencia de las encontradas en cultivo sobre otras superficies e incluso en el cultivo original, fueron más finas y alargadas. Partían generalmente de regiones polarizadas de la célula que actuarían a modo de anclaje principal

sustentado por múltiples anclajes de menor tamaño pero mayor número. Se trataba de unas estructuras cilíndricas, de superficie irregular y de apenas unos nanómetros de diámetro (Figura 31). En la Figura 32 y siguientes podemos observar el mecanismo de interacción celular mediante estas prolongaciones o lamelopodios y las pequeñas oquedades existentes en la superficie tratada.

A diferencia de los cultivos realizados sobre las muestras H, en las R no observamos un patrón claro de excrecencias de material ni vesículas superficiales.

En todos los casos, las células pueden definirse como pleomórficas, con variaciones en la forma y en el tamaño. En general, se trataba de células más o menos regulares a pesar de esas variaciones individuales. La comparación de estos cultivos con la caracterización morfológica mediante SEM mostró grandes similitudes, si bien, como mencionamos anteriormente, observamos un mayor número de prolongaciones celulares.

#### **4. 2. CULTIVO SOBRE OBLEAS DE SÍLICE “H”**

Los cultivos sobre superficies metiladas mostraron una clara tendencia a la dispersión y adhesión celular a la placa (Figura 35): a mayor hidrofobicidad superficial, mayor concentración de células en superficie, incluyendo algunas capas de células superpuestas (Figura 36).

En los cultivos sobre las muestras H se observó un mayor número aún de prolongaciones, siendo éstas además de mayor longitud y complejidad (Figura 37). La polarización hacia estas regiones de emisión

de mayor número de prolongaciones también fue más marcada pudiendo hablar en este caso de prolongaciones primarias o principales de las que parten un gran número de ramificaciones en forma de prolongaciones secundarias. Pudimos detectar gran cantidad de “nudos” o engrosamientos en el trayecto de estas emisiones citoplasmáticas.

Sobre las células adheridas a estas muestras sí pudieron observarse claramente excrescencias sobre la membrana celular (Figura 38). Pensamos que pudiera tratarse de material calcificado y vesículas de secreción. Del mismo modo se pudo observar la calcificación inicial de la matriz extracelular, especialmente en las superficies más hidrófobas (Figura 39). Esta actividad celular indicaba cierta diferenciación en el cultivo, que fue capaz de generar y liberar material al medio extracelular.

Por tanto, el hecho de que existiese, por un lado, un crecimiento en capas y, por otro, la presencia de estructuras de secreción o ya secretadas sobre las células en las superficies con mayor hidrofobicidad en base a las modificaciones realizadas aumentando la concentración de grupos metilo terminales, pareció indicar que la hidrofobicidad influye en la evolución positiva del cultivo celular.

## **5. CARACTERIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA TRAS CULTIVO EN OBLEAS DE SÍLICE**

Una vez cultivadas sobre las diferentes superficies modificadas, se estudió la expresión de los diferentes marcadores mediante técnicas de inmunohistoquímica (Tabla 5).

Así, vimentina y COX-2 se expresaron fuertemente en todas las muestras. La expresión de caldesmón también fue positiva en todas las muestras salvo en H4 donde pareció ser algo menor. La expresión de CD10, CD56 y actina fue prácticamente negativa en todas las muestras, al igual que la expresión de TRAP. El aumento en la expresión tanto de Ki67 como de osteocalcina se produjo de forma concordante con el aumento de la hidrofobicidad (Figura 40 y siguientes).



# ***FIGURAS Y TABLAS***

El que quiere interesar a los demás tiene que provocarlos.

Salvador Dalí (1904-1989). Pintor, escultor, diseñador, escritor y cineasta español.





## FIGURAS Y TABLAS

### 1. FIGURAS

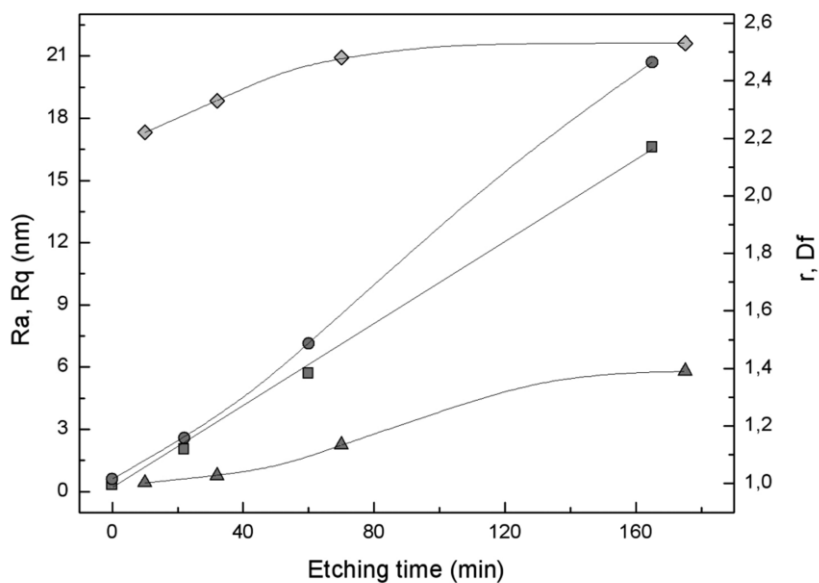


Figura 1: Relación entre los distintos parámetros de rugosidad analizados y el tiempo de grabado con NaOH. *Ra*: ■; *Rq*: ●; *r*: ▲; *Df*: ◆.

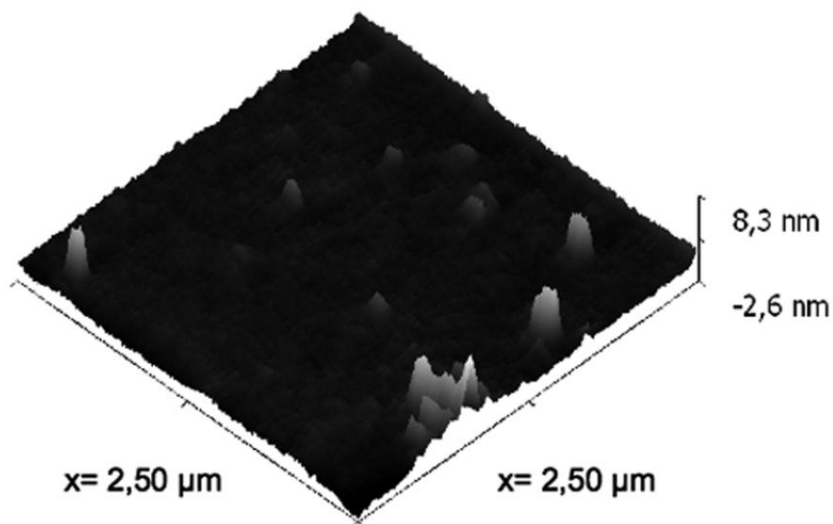


Figura 2: Imagen AFM de la superficie R1. A pesar de no haber realizado ningún tratamiento superficial, ésta no es perfectamente lisa.

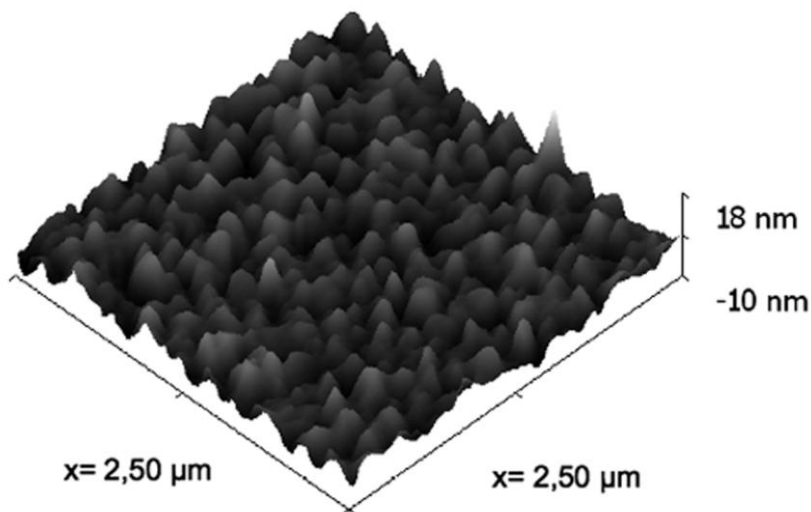


Figura 3: Imagen AFM de la superficie R2.

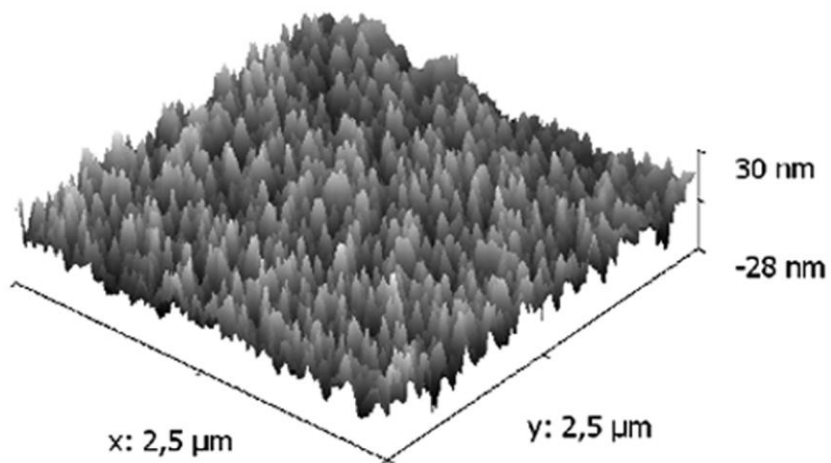


Figura 4: Imagen AFM de la superficie R3.

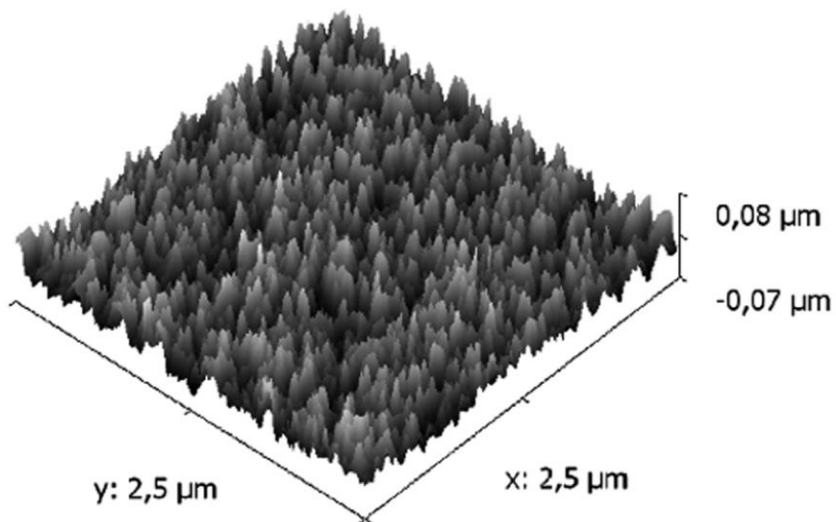


Figura 5: Imagen AFM de la superficie R4.

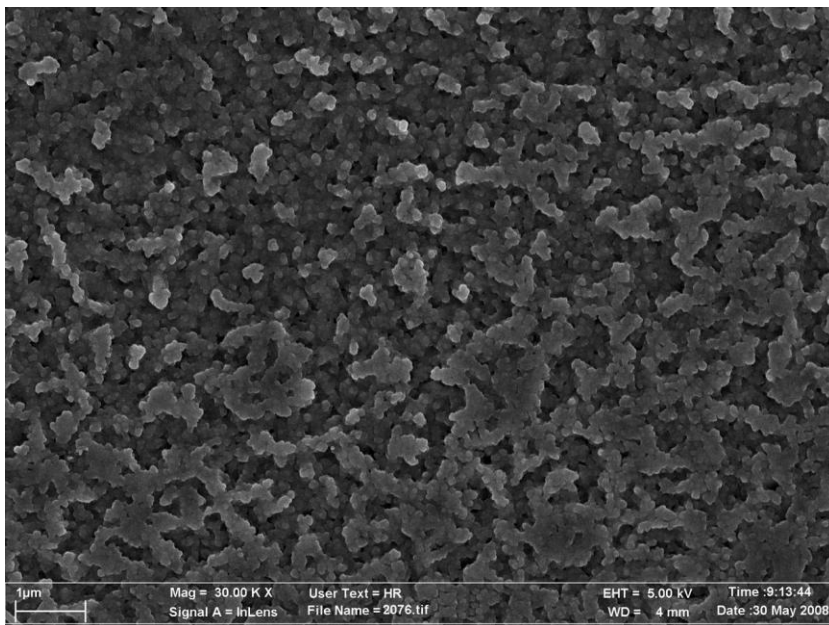


Figura 6: Topografía a escala nanométrica observada mediante SEM en una muestra R4 (30000X).

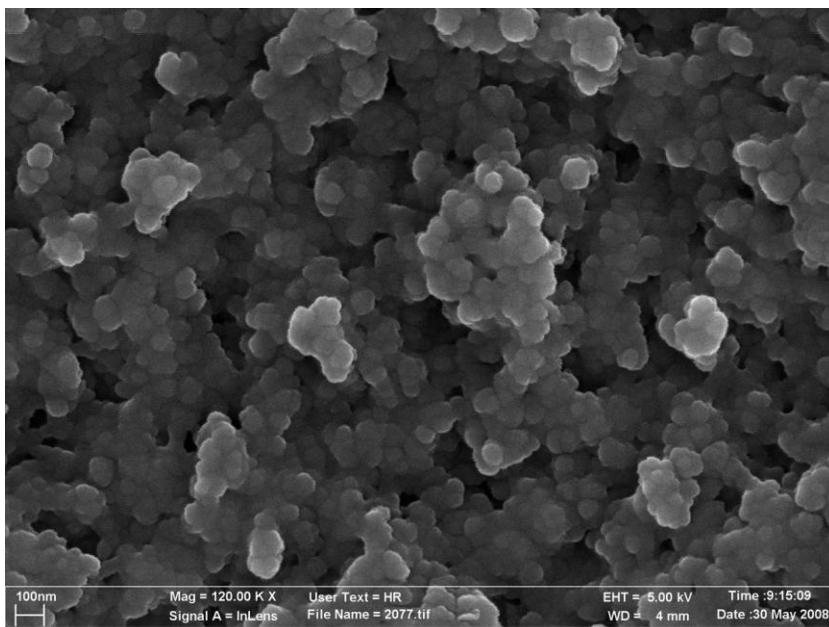


Figura 7: Detalle de la topografía a escala nanométrica de una muestra R4 (SEM 120000X).

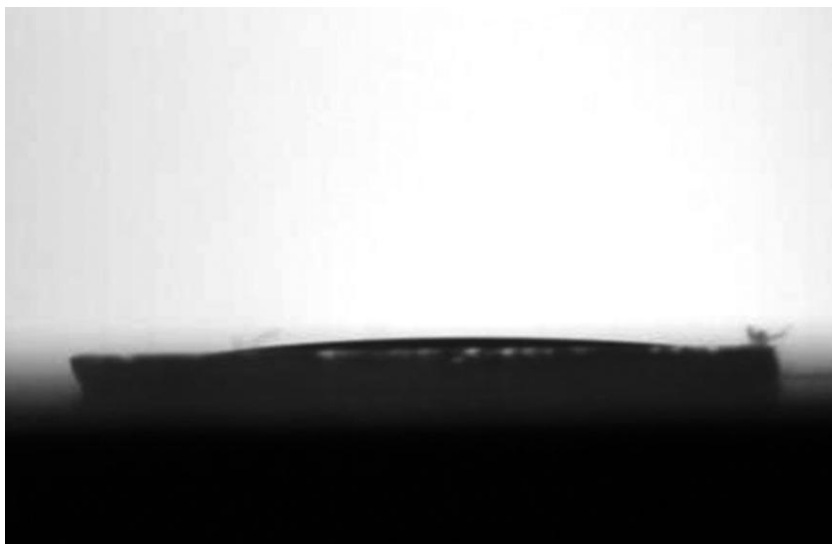


Figura 8: Imagen para medición del ángulo de contacto sobre R1.

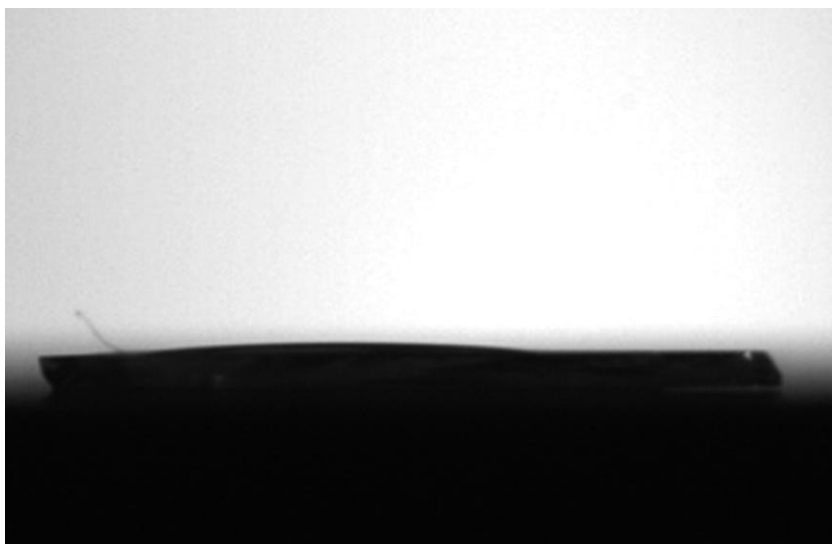


Figura 9: Imagen para medición del ángulo de contacto sobre R2.

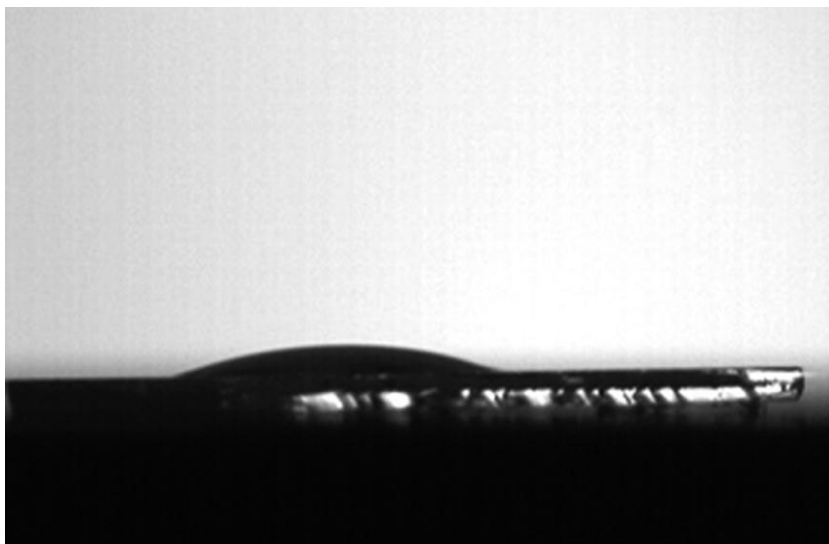


Figura 10: Imagen para medición del ángulo de contacto sobre R3.

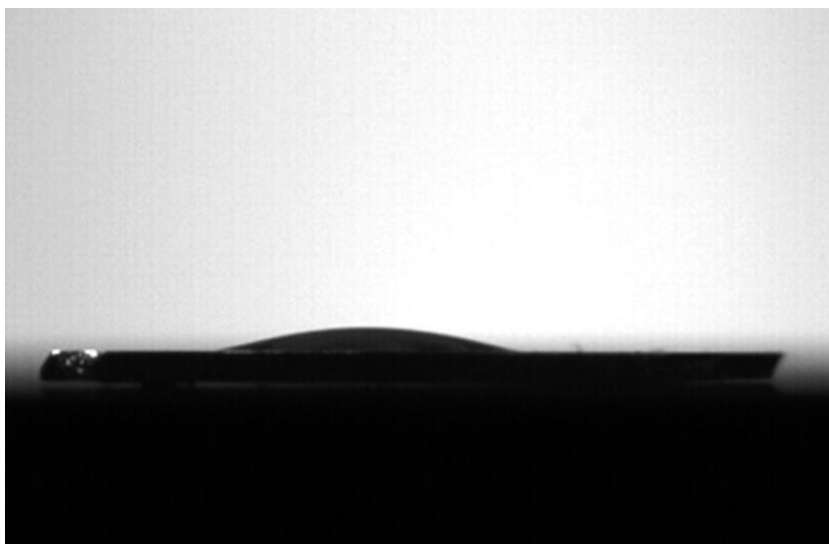


Figura 11: Imagen para medición del ángulo de contacto sobre R4.

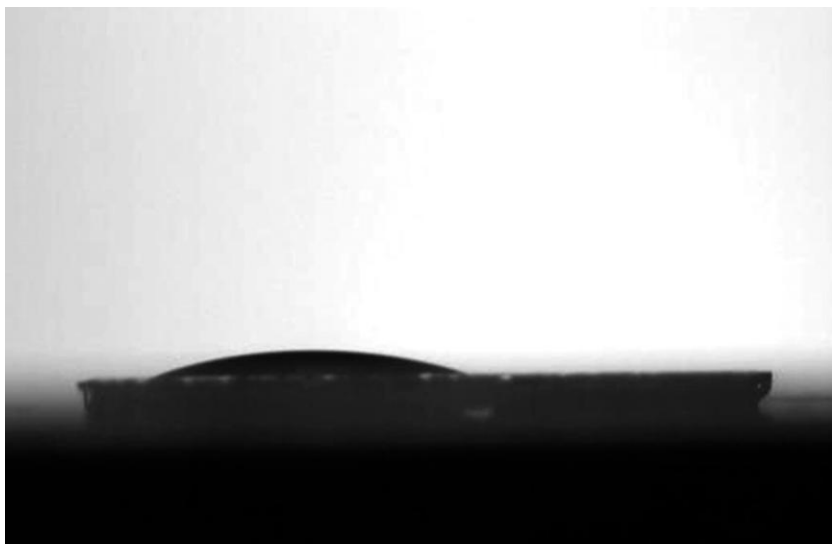


Figura 12: Imagen para medición del ángulo de contacto sobre H1.

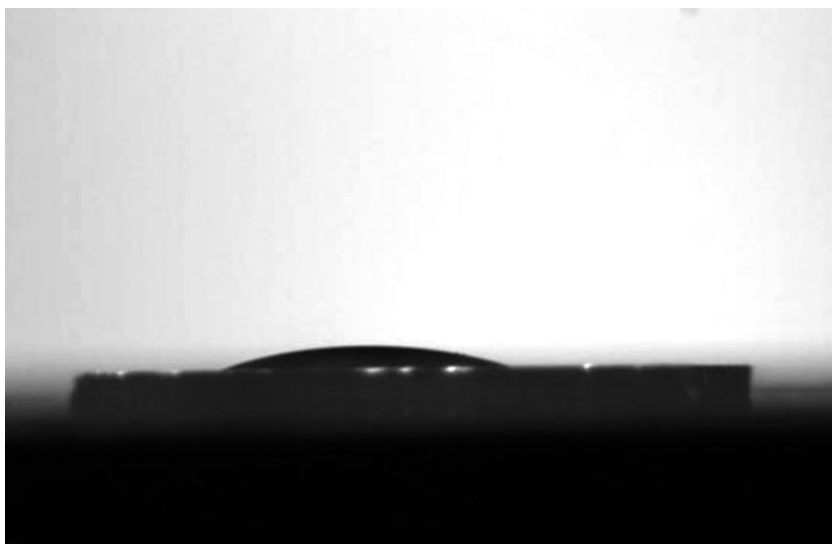


Figura 13: Imagen para medición del ángulo de contacto sobre H2.



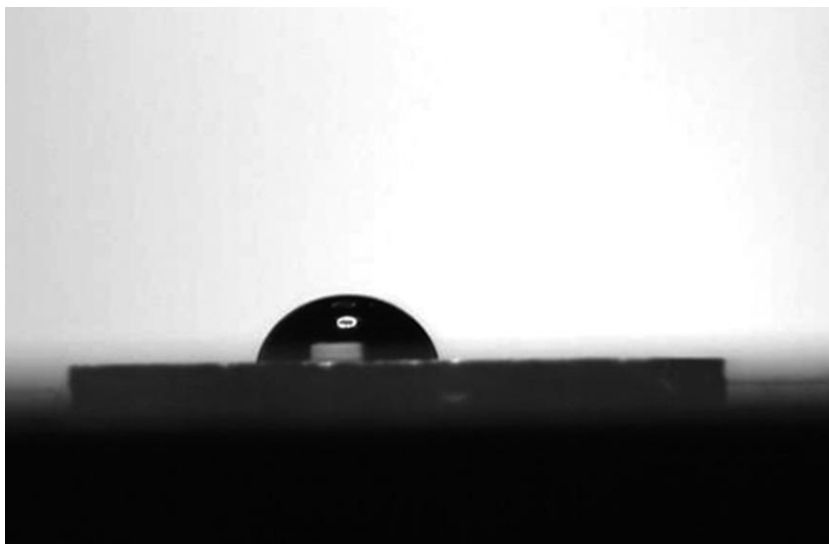


Figura 14: Imagen para medición del ángulo de contacto sobre H3.

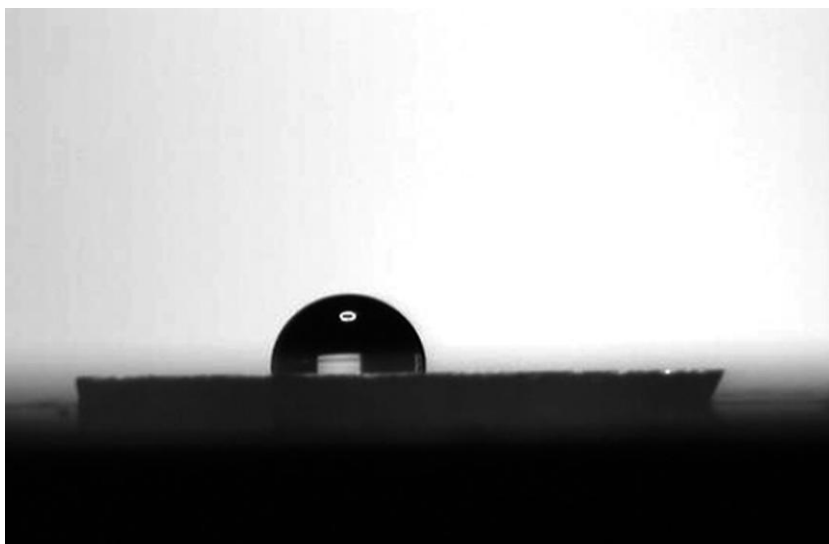


Figura 15: Imagen para medición del ángulo de contacto sobre H4.

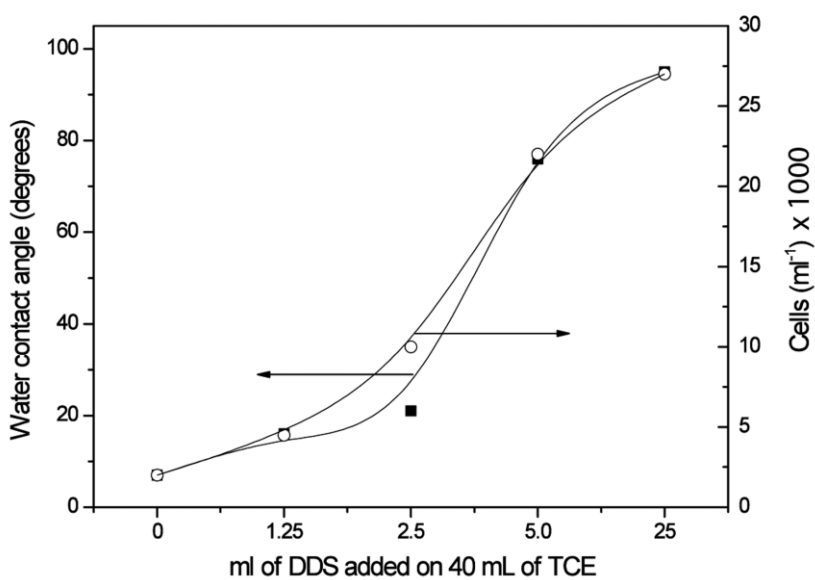


Figura 16: Ángulo de contacto estático (■) y células/ml x 1000 liberadas en muestras H (○) en función al DDS añadido a 40 ml de TCE.

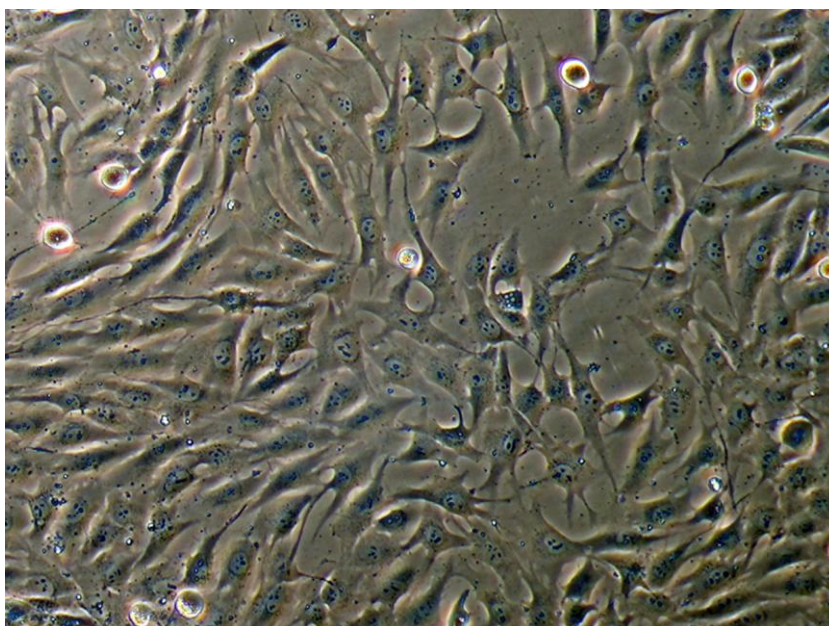


Figura 17: Imagen de microscopía óptica del cultivo de MG-63 (100X).

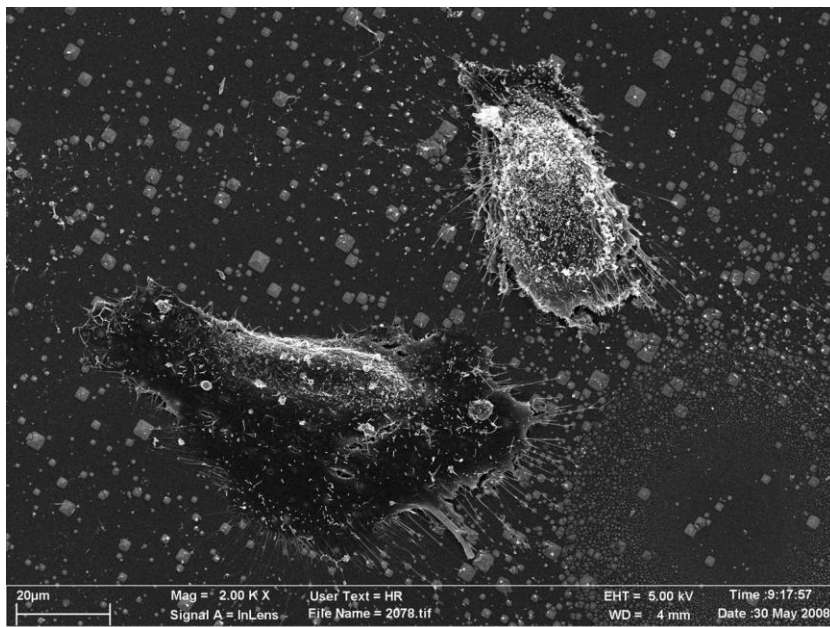


Figura 18: Microscopía de MG-63 en cultivo (SEM 2000X).

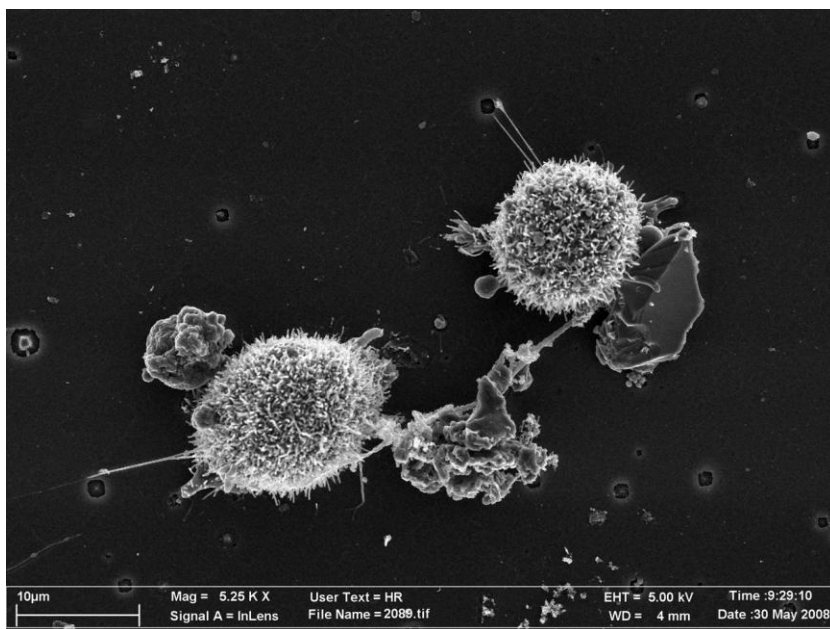


Figura 19: Caracterización morfológica por SEM de células MG-63 en cultivo (5250X). Obsérvese la morfología redondeada representativa de la ausencia de adhesión a pesar de la presencia de aparentes puentes en forma de prolongaciones citoplasmáticas.

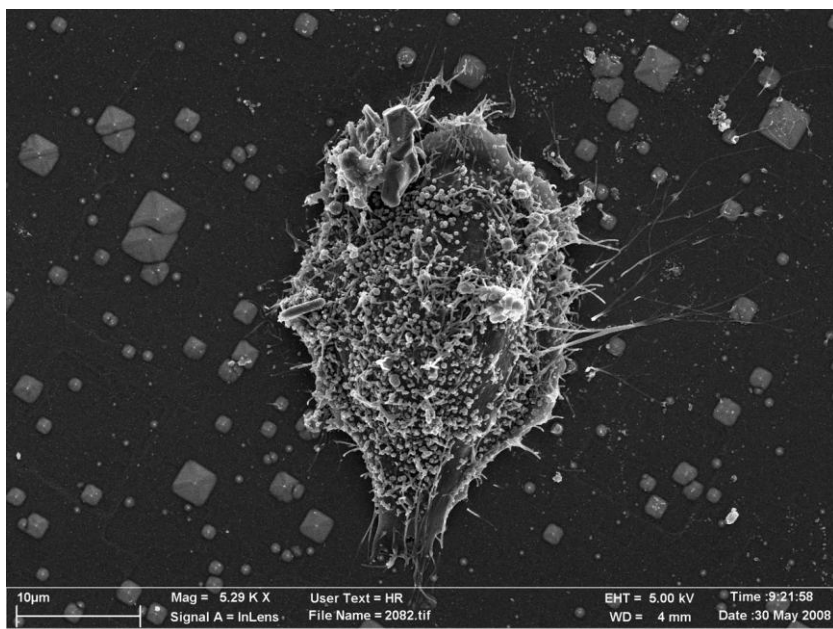


Figura 20: Caracterización morfológica de una célula MG-63 aislada (SEM 5290X). Se demuestran una gran cantidad de prolongaciones e irregularidades superficiales.

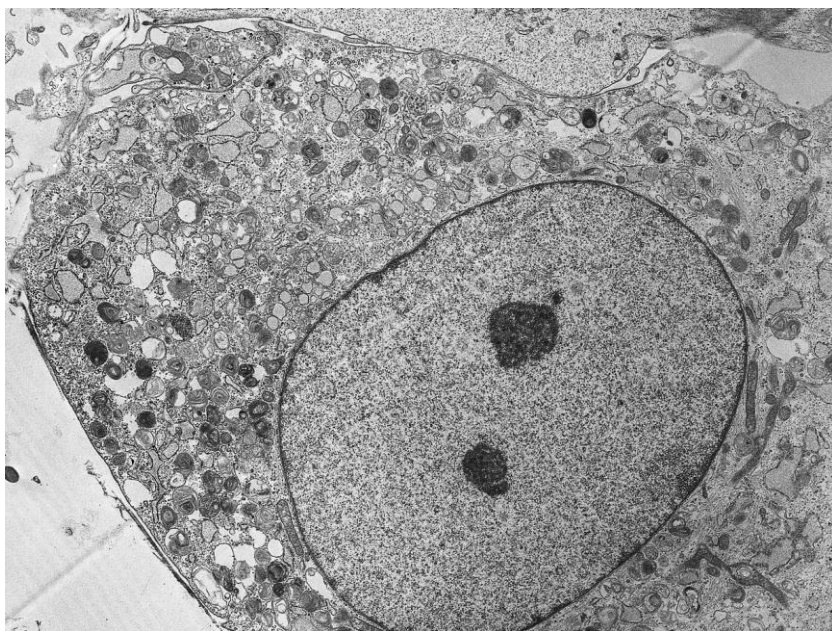


Figura 21: Caracterización morfológica por TEM de una célula MG-63 aislada (5150X).

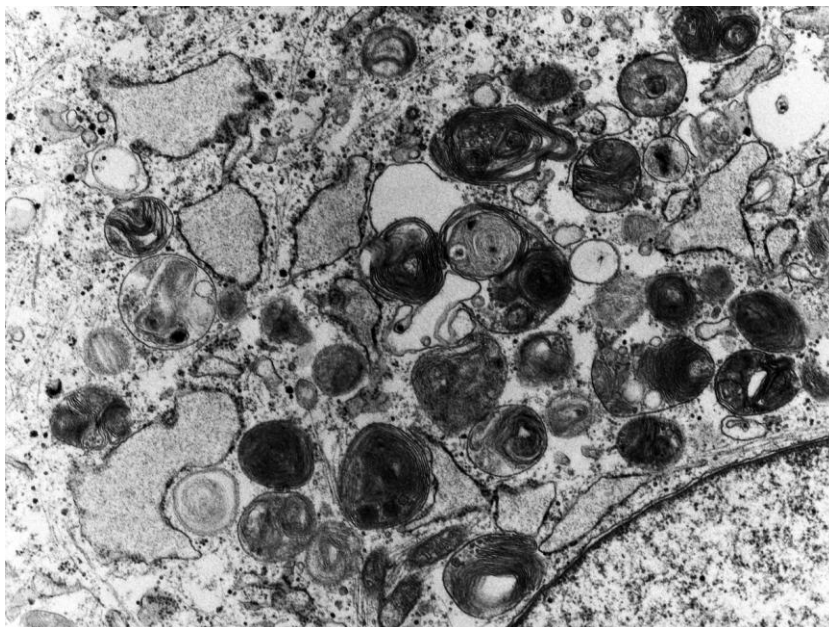


Figura 22: Detalle de las vesículas intracitoplasmática en MG-63 de diferentes densidades (6500X).

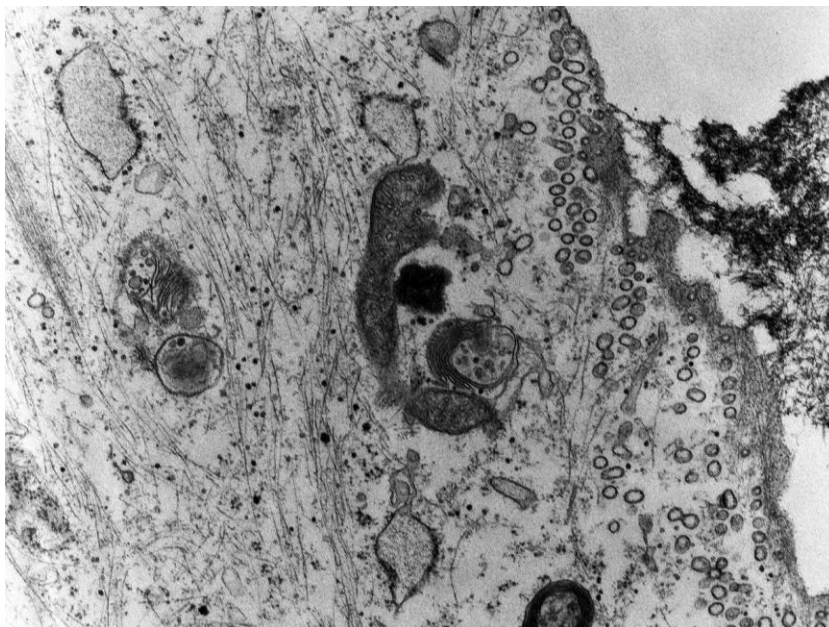


Figura 23: Detalle del citoplasma de MG-63 (6500X). Se pueden apreciar diversas vesículas y organelas además del citoesqueleto.

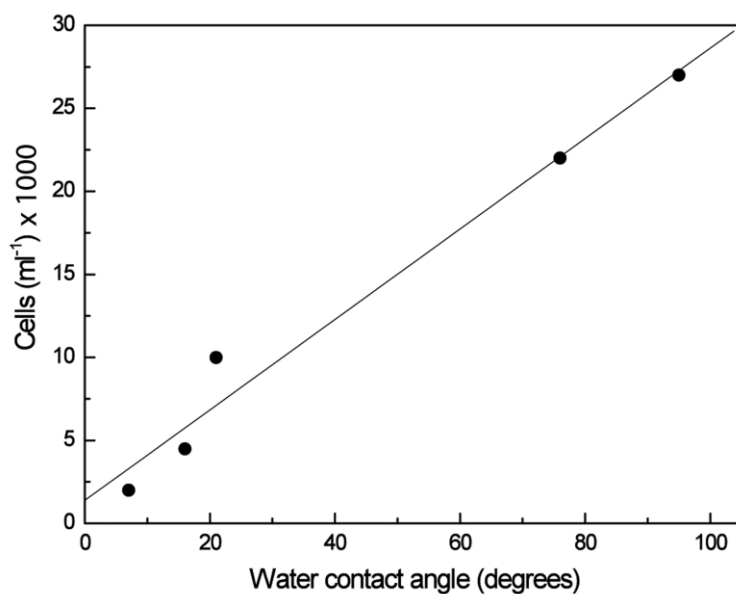


Figura 24: Número de células liberadas de las superficies H en función al ángulo de contacto. Coeficiente de correlación de 0.98775.

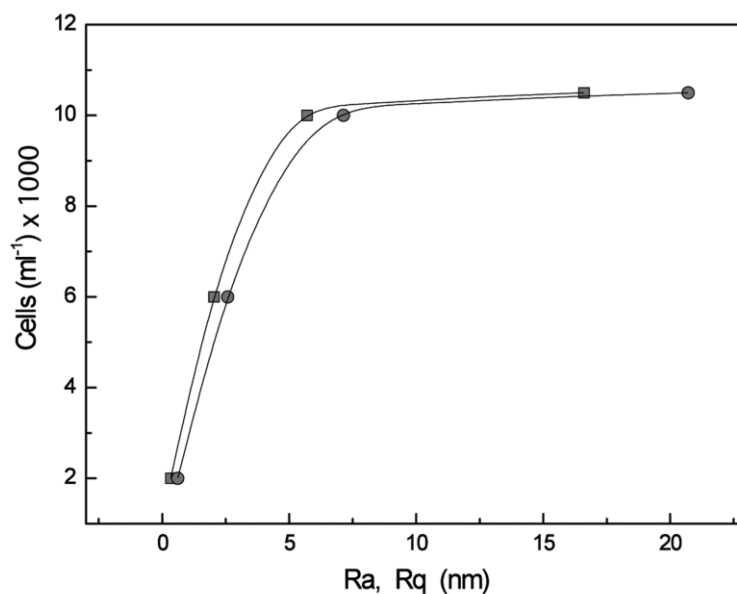


Figura 25: Relación entre las células liberadas de las superficies R y la rugosidad superficial descrita por los parámetros  $Ra$  (■) y  $Rq$  (●).

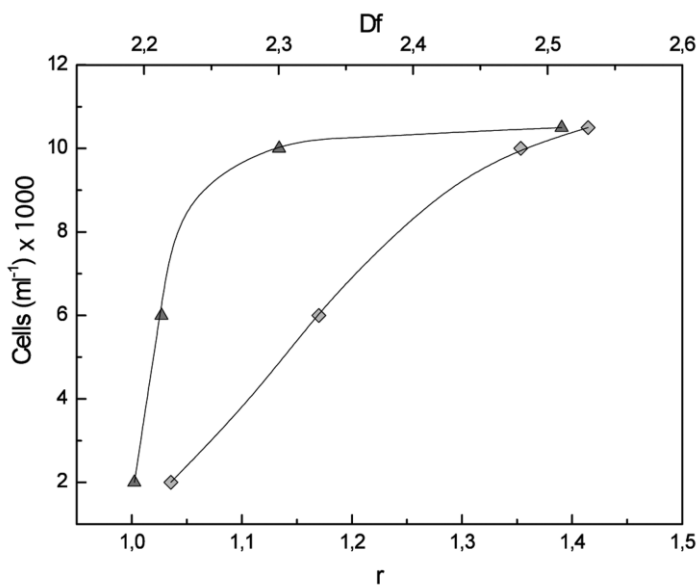


Figura 26: Relación entre las células liberadas de las superficies R y la rugosidad superficial descrita por los parámetros  $r$  (▲) y  $Df$  (◆).

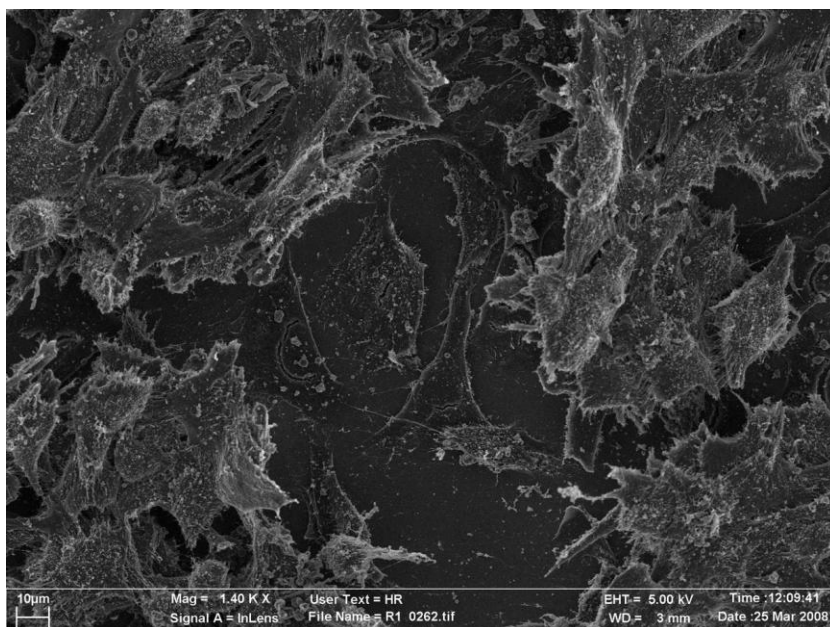


Figura 27: Cultivo sobre R1 (SEM 1400X). Se puede observar la gran cantidad de células superpuestas.



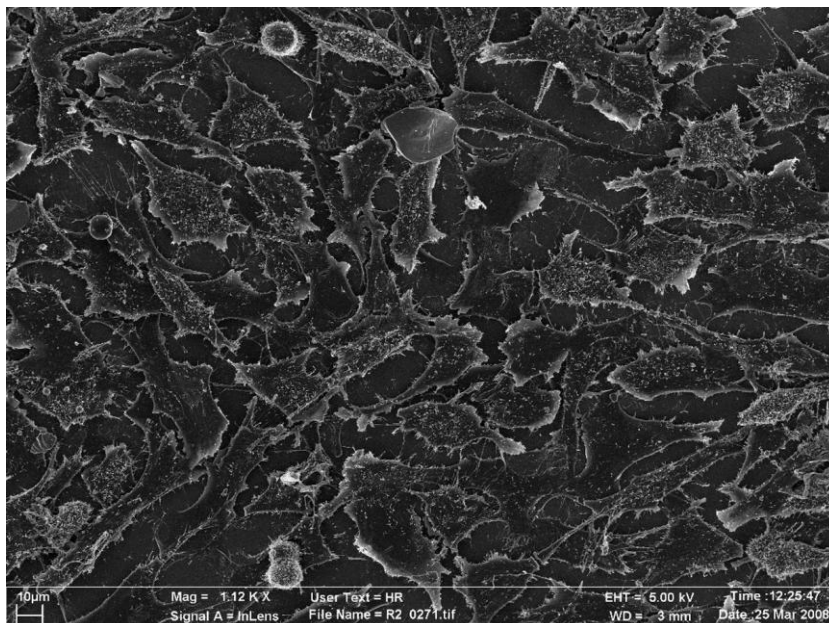


Figura 28: Cultivo sobre R2 (SEM 1120X). Se observan algunas células esféricas y un mayor número de prolongaciones.

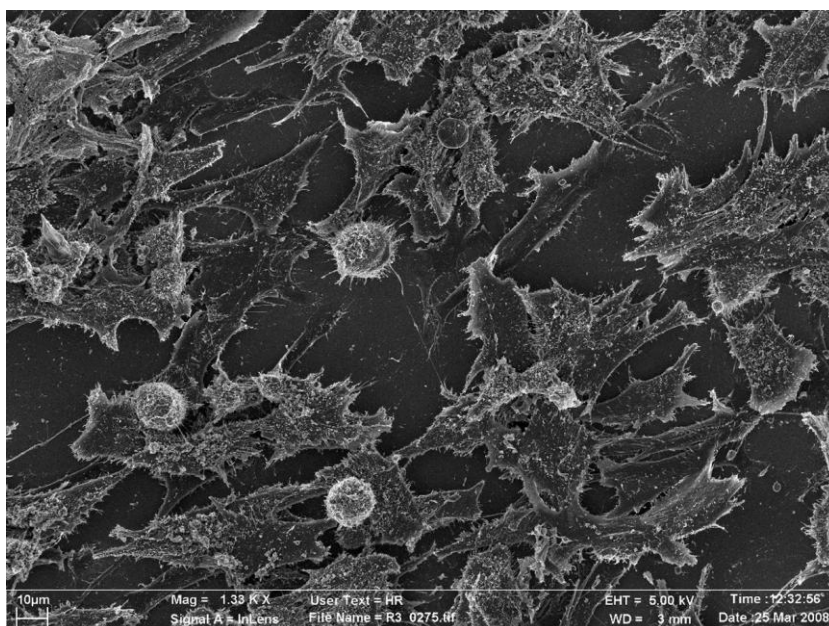


Figura 29: Cultivo sobre R3 (SEM 1330X). Algunas células esféricas. Obsérvese la mayor densidad de prolongaciones.



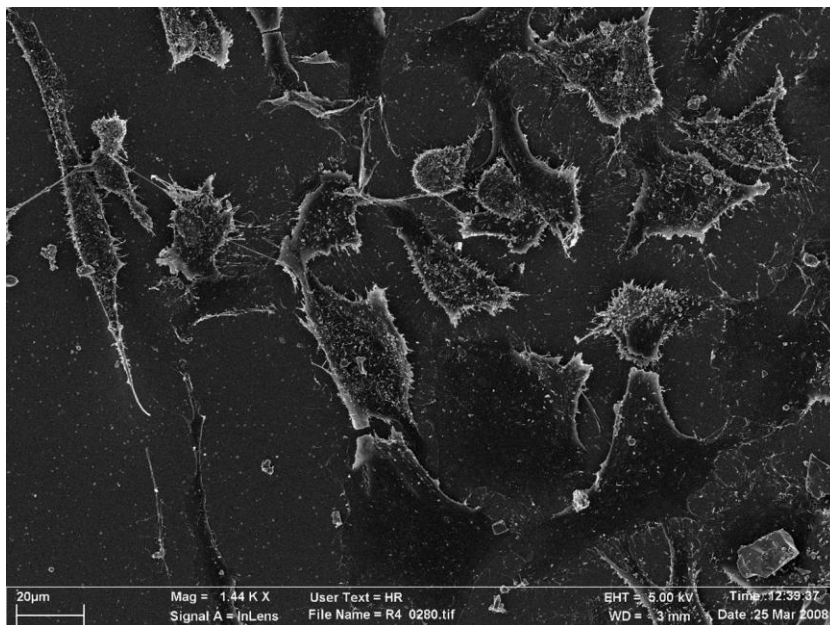


Figura 30: Cultivo sobre R4 (SEM 1440X). Se observa la menor densidad celular pero mayor número de prolongaciones.

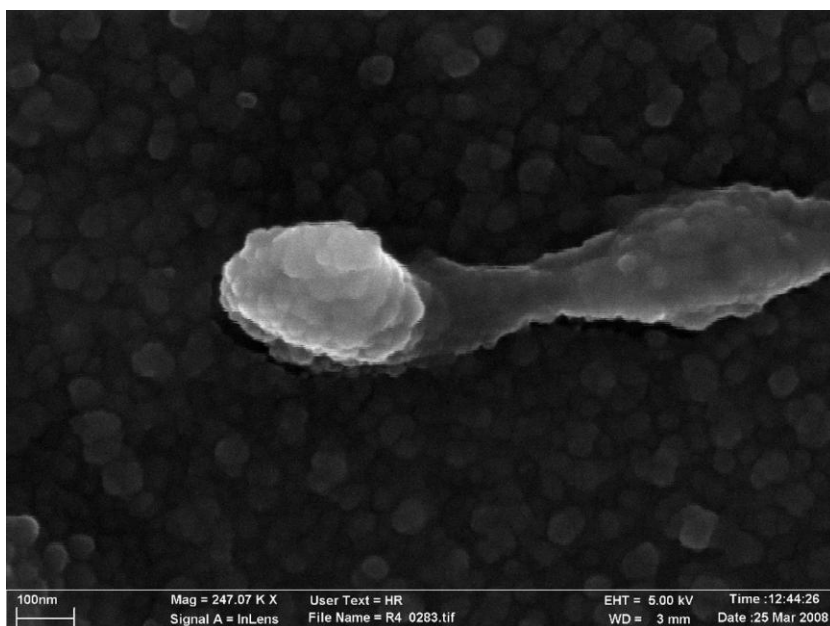


Figura 31: Detalle de una terminación de una de las prolongaciones en R4 (SEM 247070X).

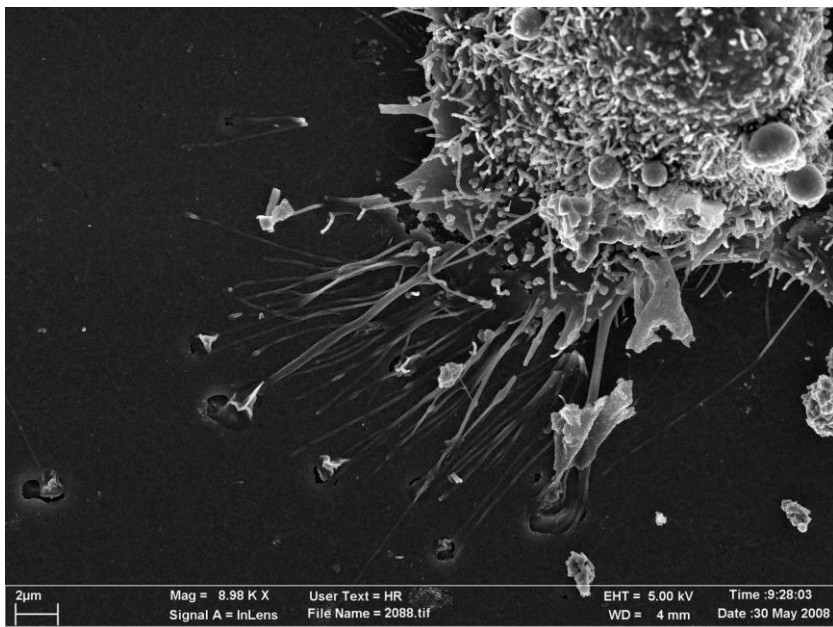


Figura 32: Interacciones célula-nanotopografía por medio de lamelopodios o prolongaciones celulares (SEM 8980X).

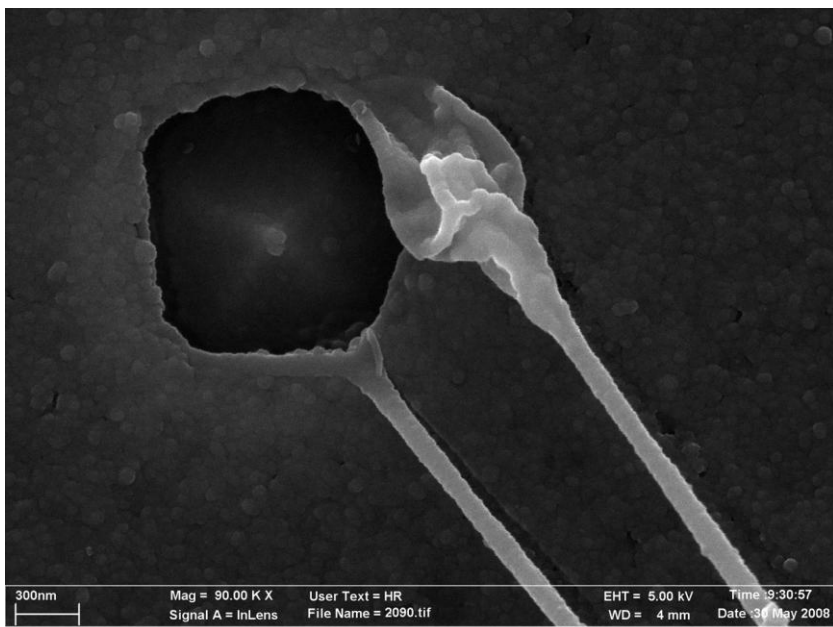


Figura 33: Detalle mediante SEM a 90000X de la interacción de varias prolongaciones con una oquedad.

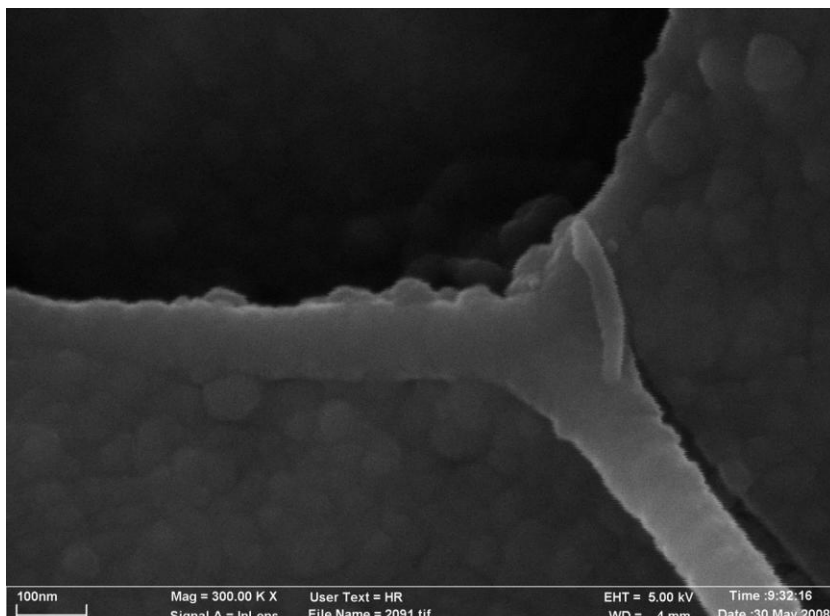


Figura 34: Detalle aún a más aumentos de la interacción célula-superficie (SEM 300000X).

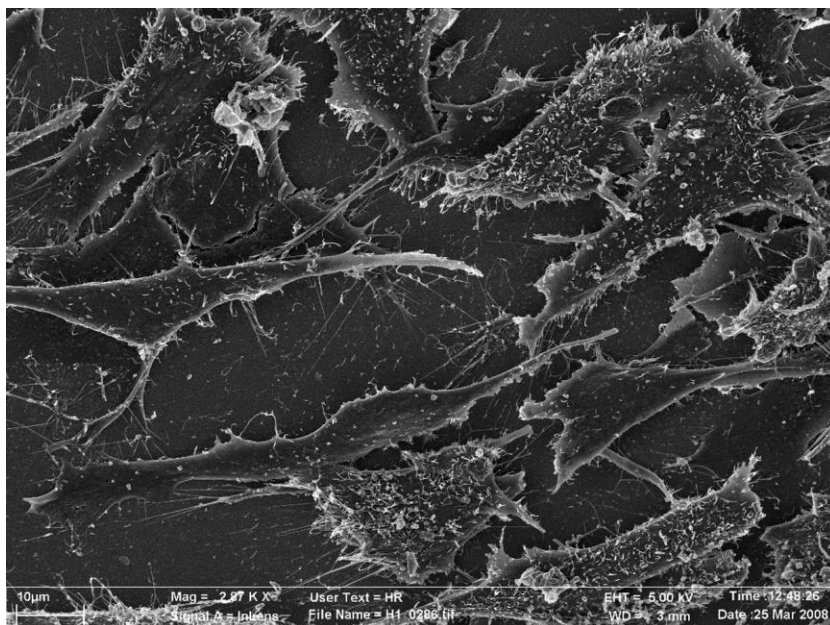


Figura 35: Cultivo celular sobre H1 (SEM 2870X). Pueden observarse algunas condensaciones de material, probablemente calcificado.

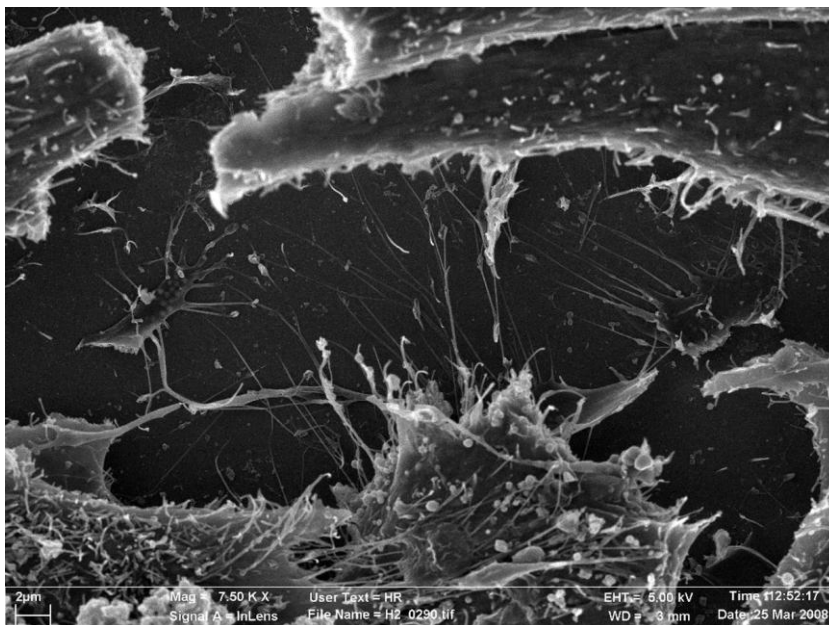


Figura 36: Algunas células sobre H2 con pequeños gránulos y excreciones en superficie (SEM 7500X).

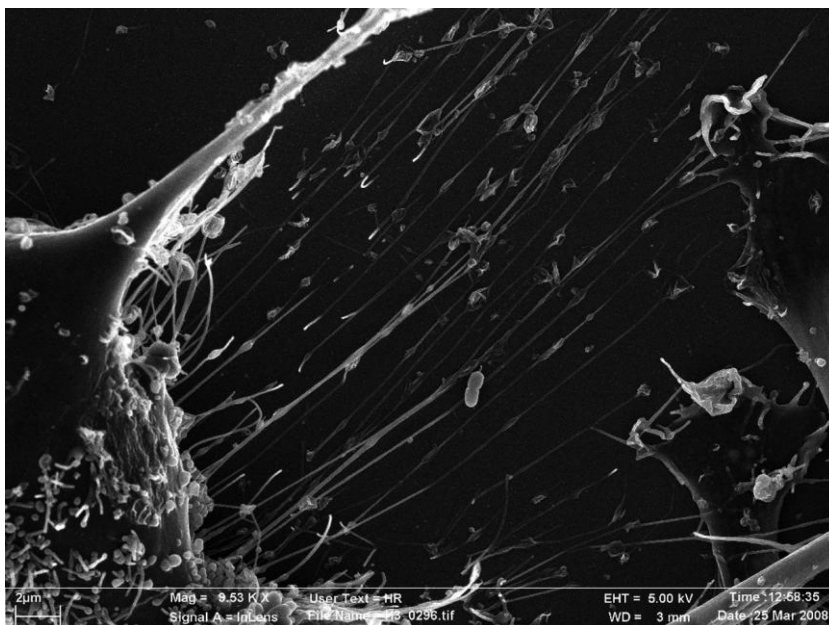


Figura 37: Alta concentración de prolongaciones sobre H3 (SEM 9530X).

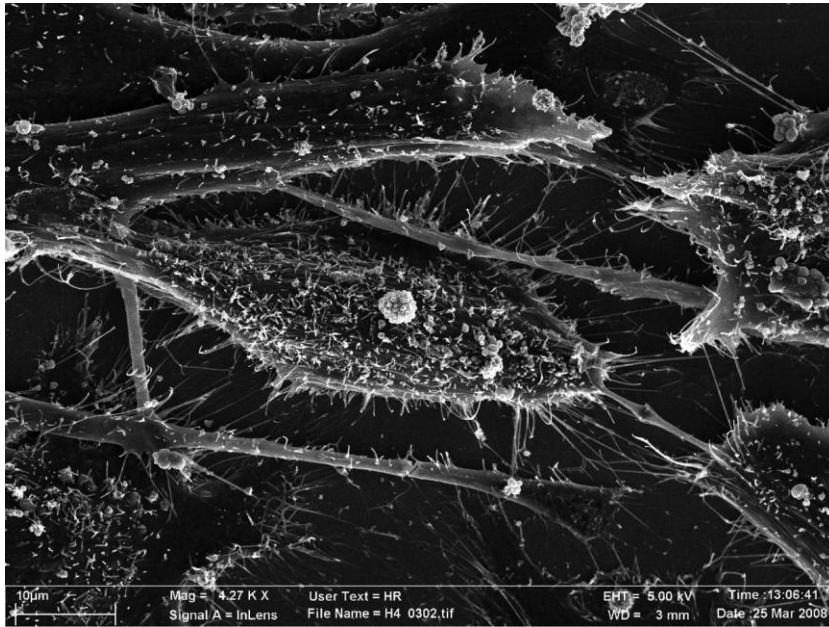


Figura 38: Alta densidad de prolongaciones y excrescencias en superficie sobre H4 mostrando la calcificación de la ECM (SEM 4270X).

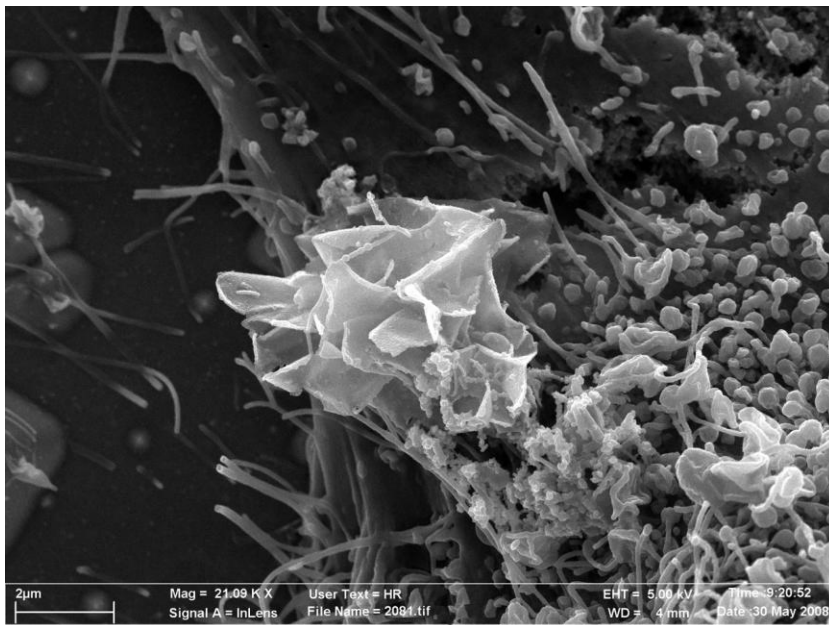


Figura 39: Calcificación inicial de la matriz extracelular en una muestra de superficie H4 (SEM 21090X).



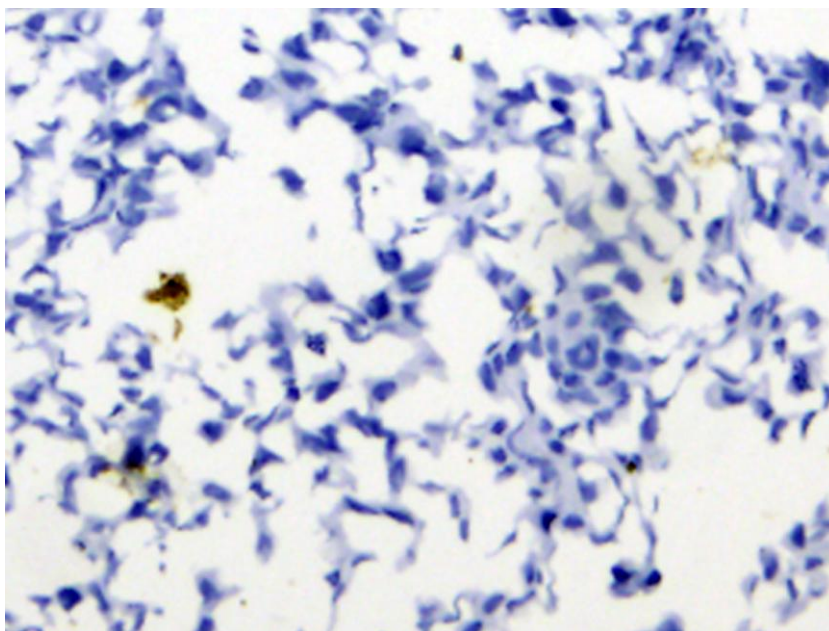


Figura 40: Escasa expresión de actina en superficies H4.

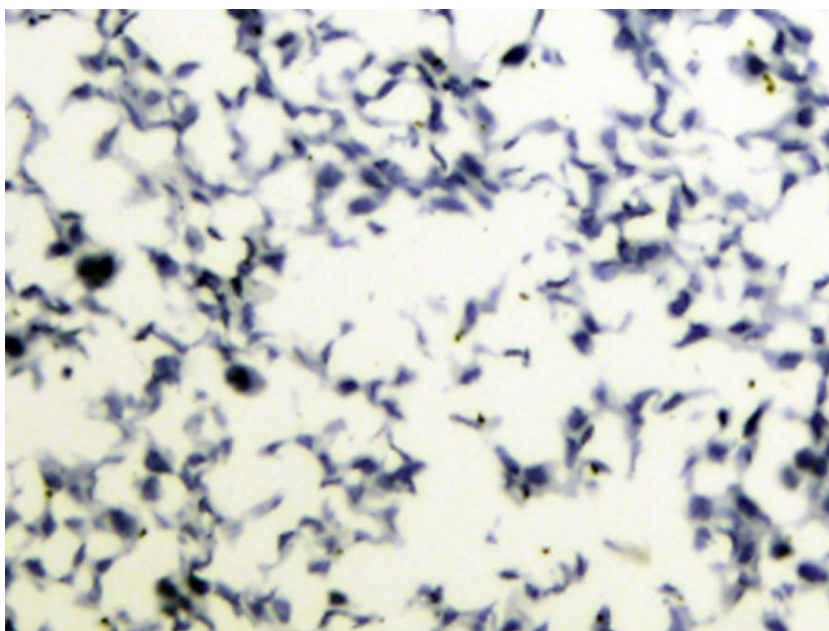


Figura 41: Expresión negativa de actina en superficies R4.

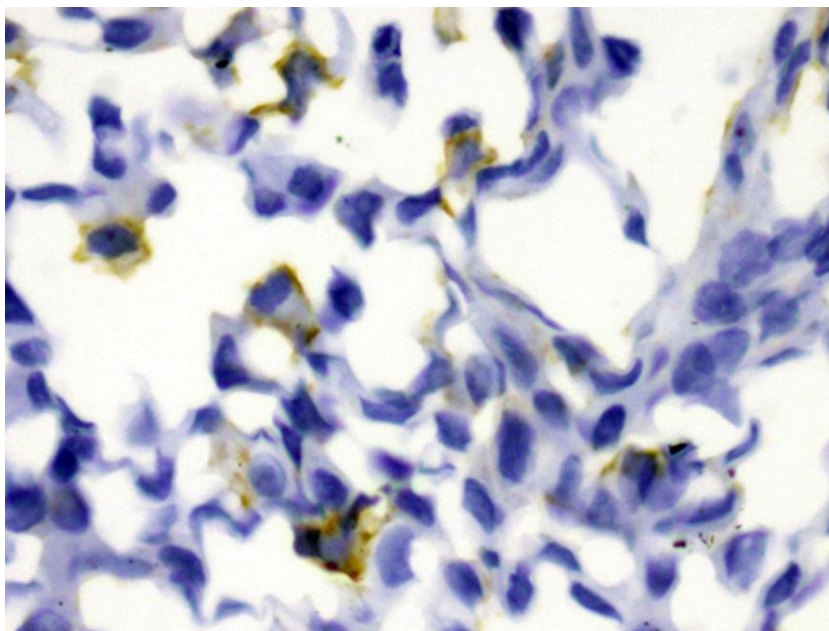


Figura 42: Expresión positiva de caldesmón en superficies H4.

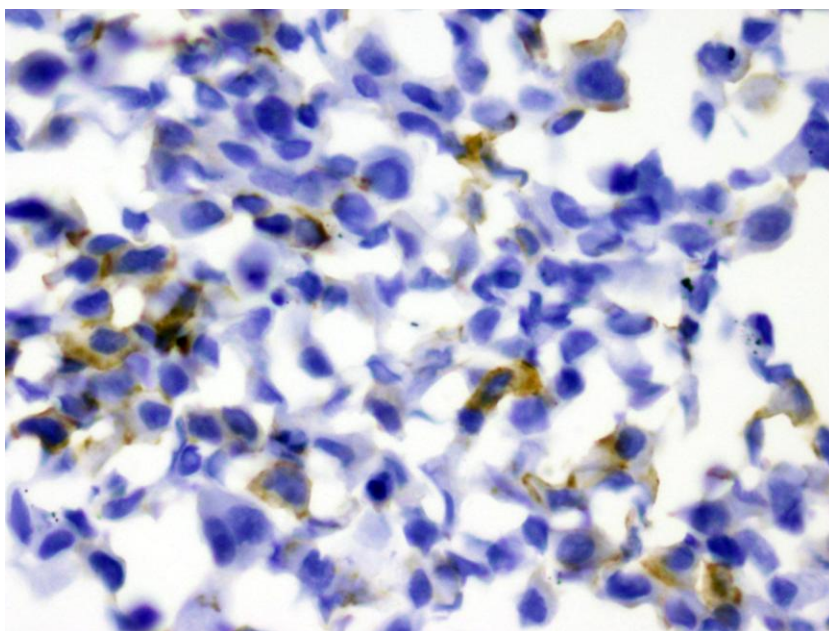


Figura 43: Expresión positiva de caldesmón en superficies R1.

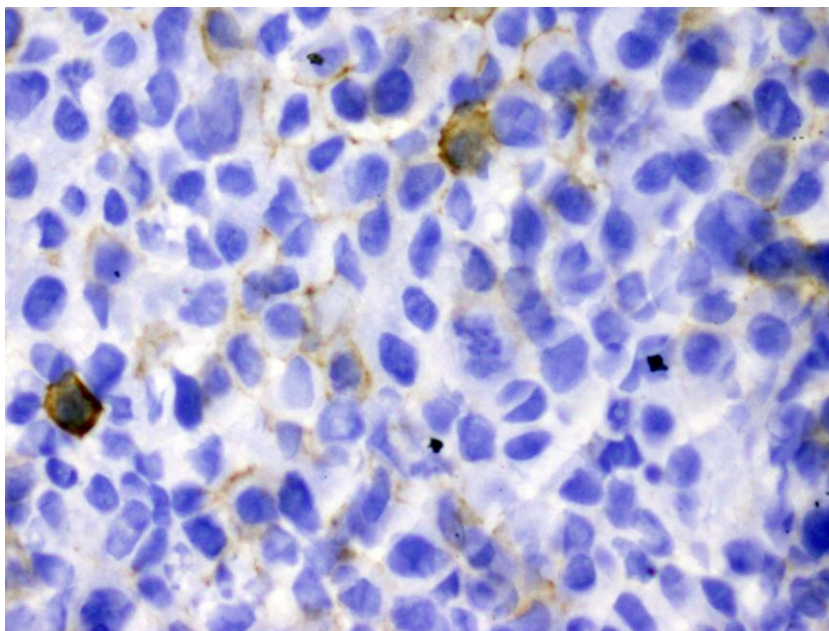


Figura 44: Expresión positiva de caldesmón en superficies R4.

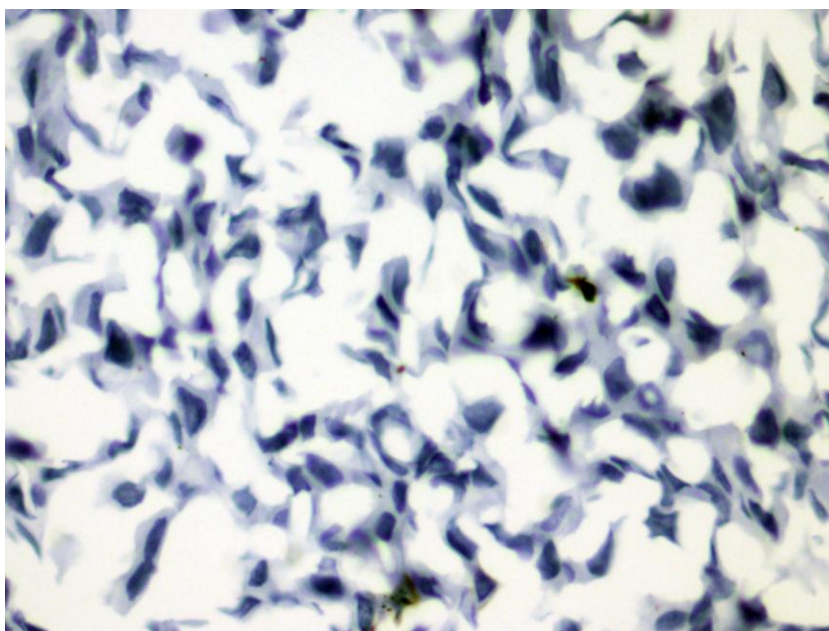


Figura 45: Expresión negativa de CD10 en superficies H4.



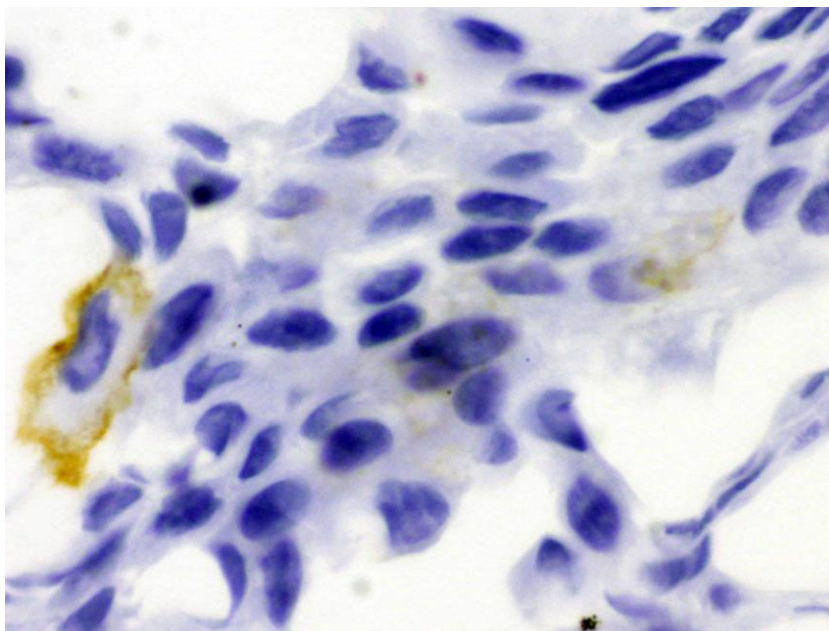


Figura 46: Expresión muy poco marcada de CD10 en superficies R1.

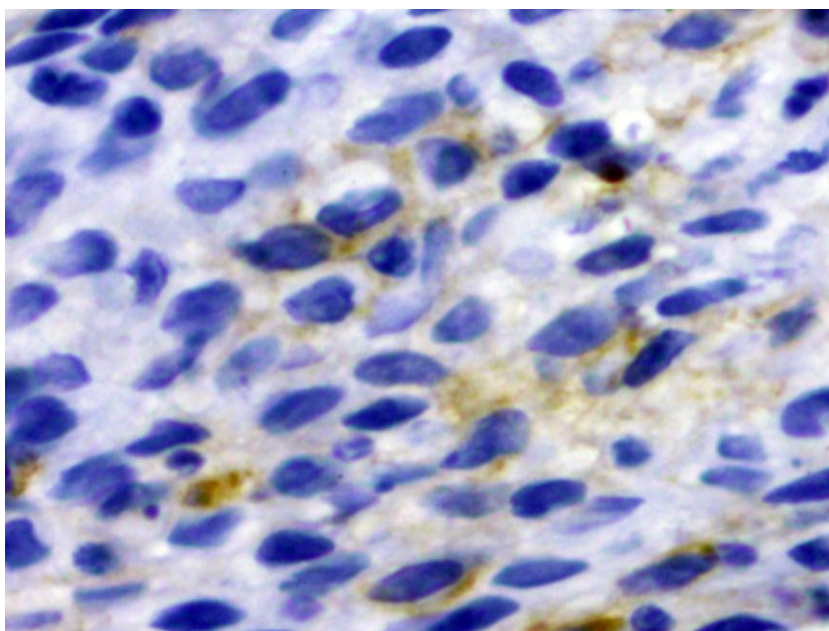


Figura 47: Expresión positiva poco marcada de CD10 en superficies R4.

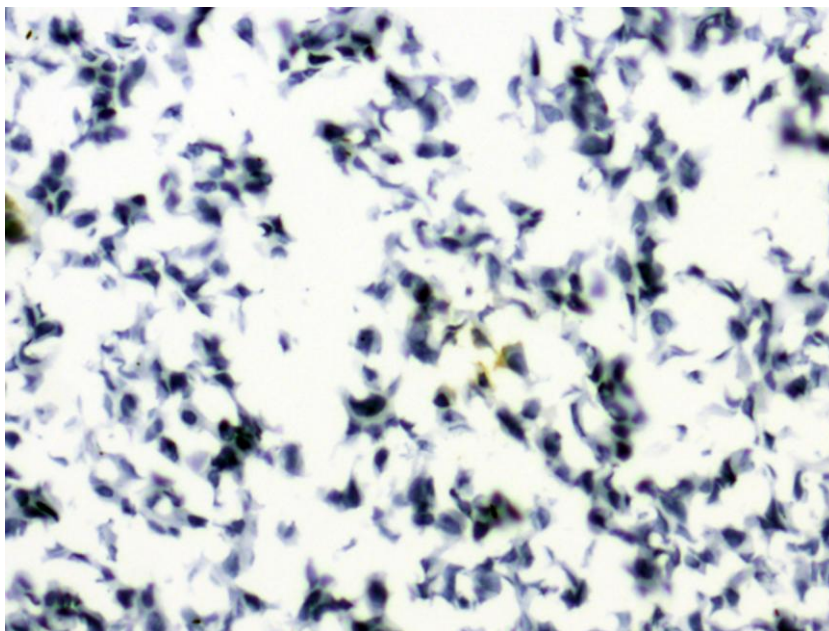


Figura 48: Expresión negativa de CD56 en superficies H4.

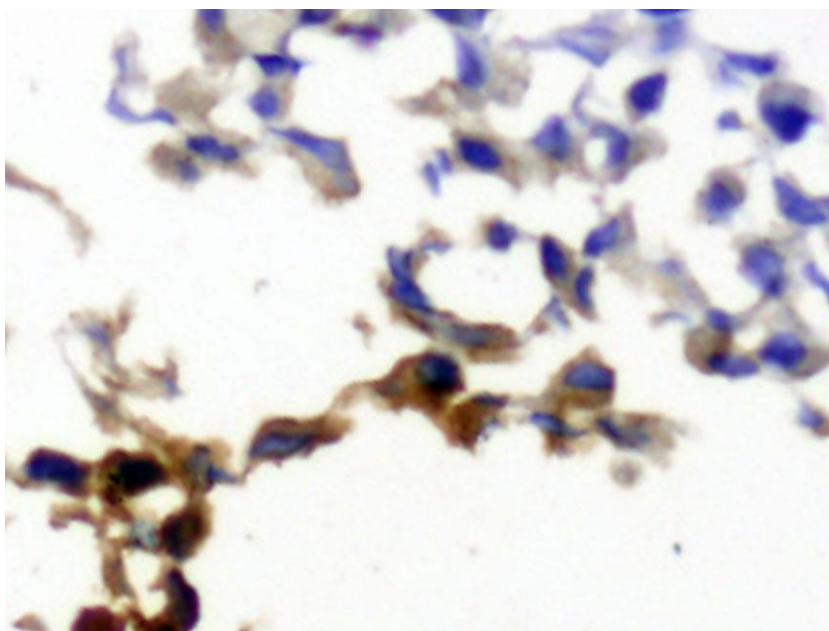


Figura 49: Expresión positiva poco marcada de CD56 en superficies R1.

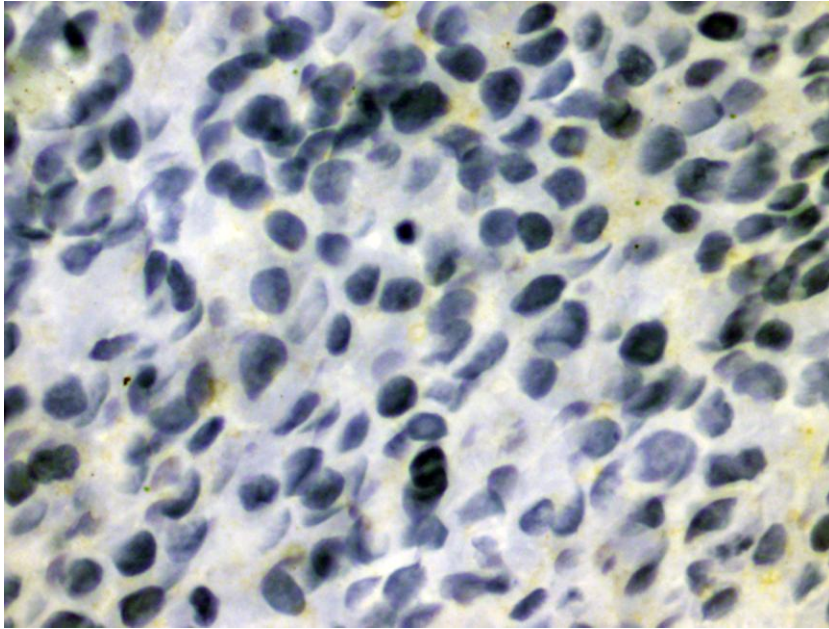


Figura 50: Expresión negativa de CD56 en superficies R4.

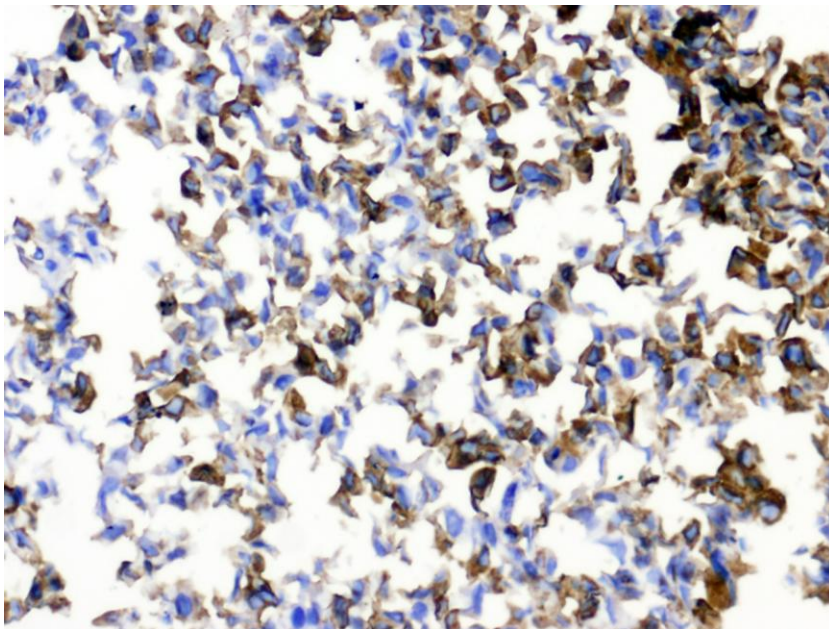


Figura 51: Expresión marcada de COX-2 en superficies H4.



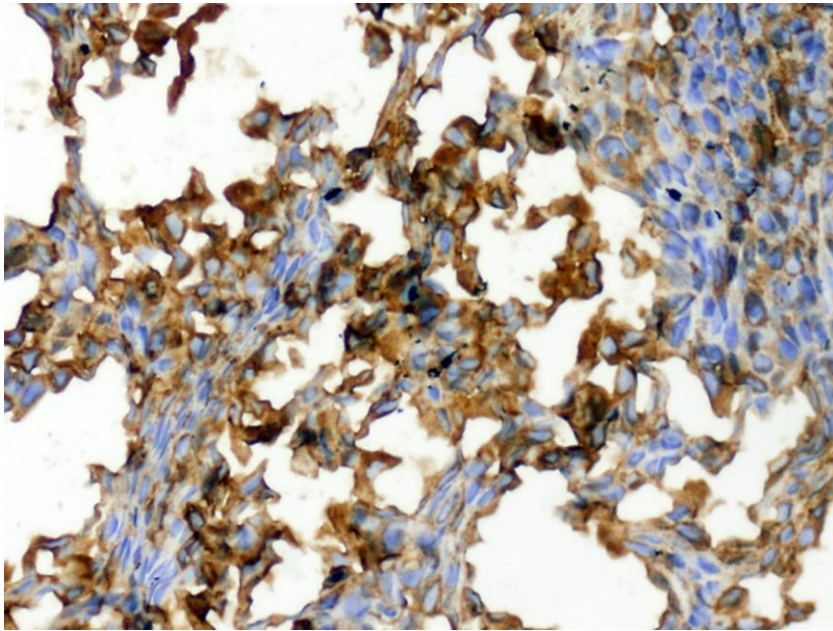


Figura 52: Expresión marcada de COX-2 en superficies R1.

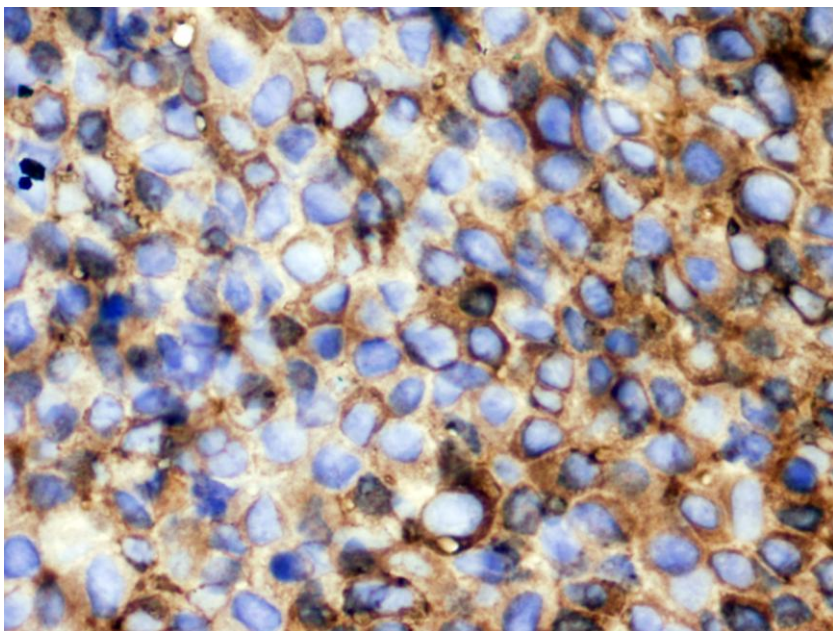


Figura 53: Expresión marcada de COX-2 en superficies R4.

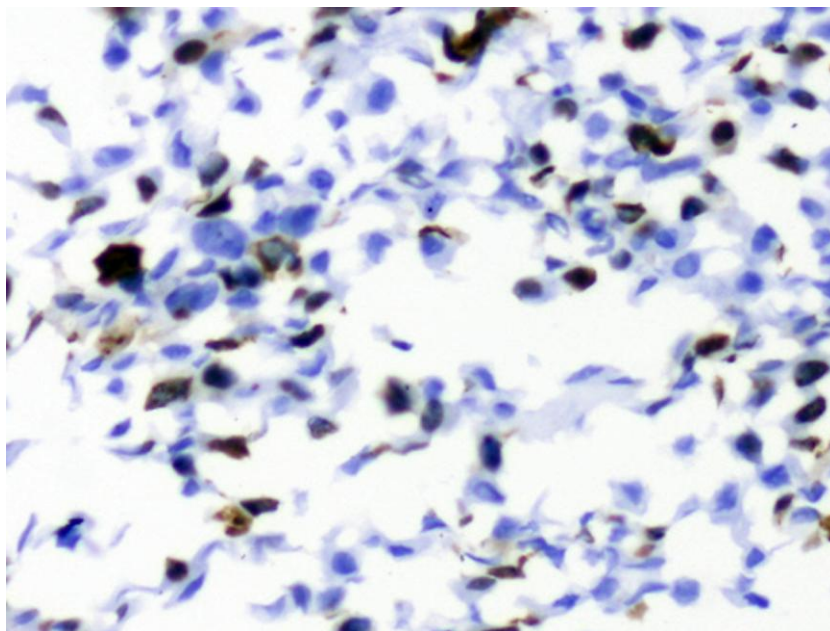


Figura 54: Expresión de Ki67 en superficies H4.

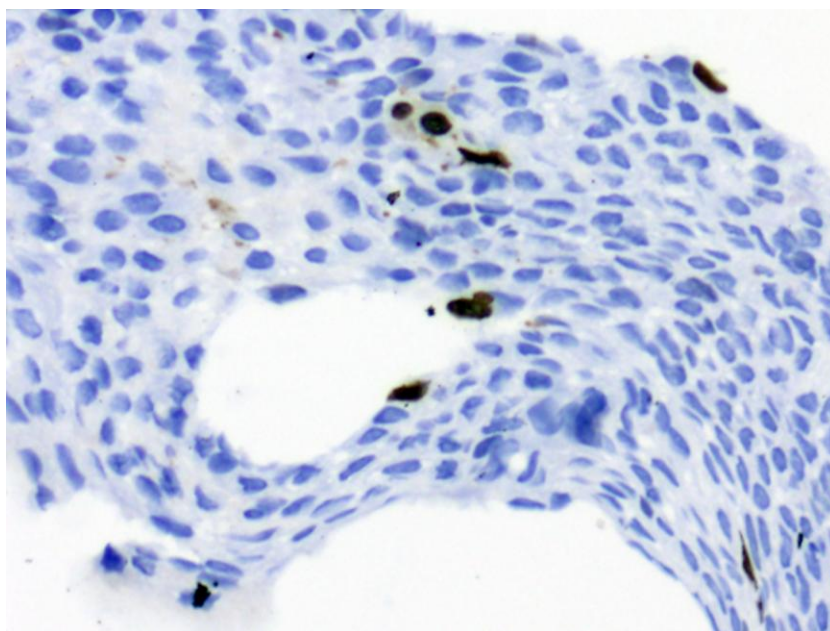


Figura 55: Expresión limitada de Ki67 en superficies R1.



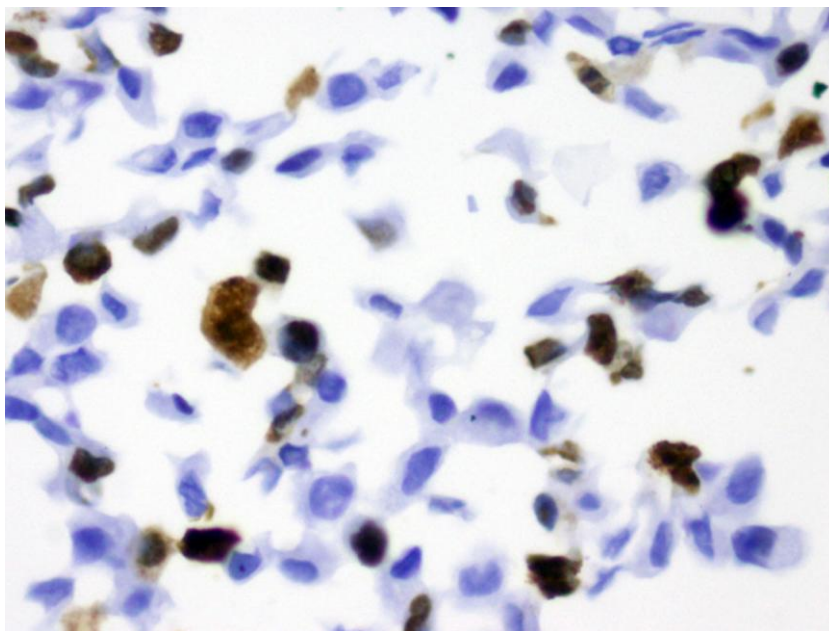


Figura 56: Expresión positiva de Ki67 en superficies R4.

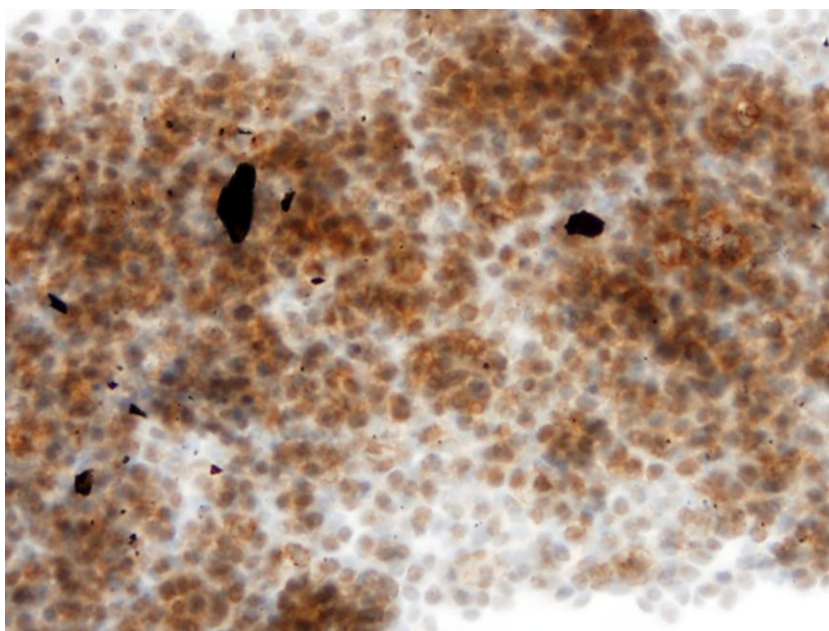


Figura 57: Expresión muy marcada de osteocalcina en superficies H4.

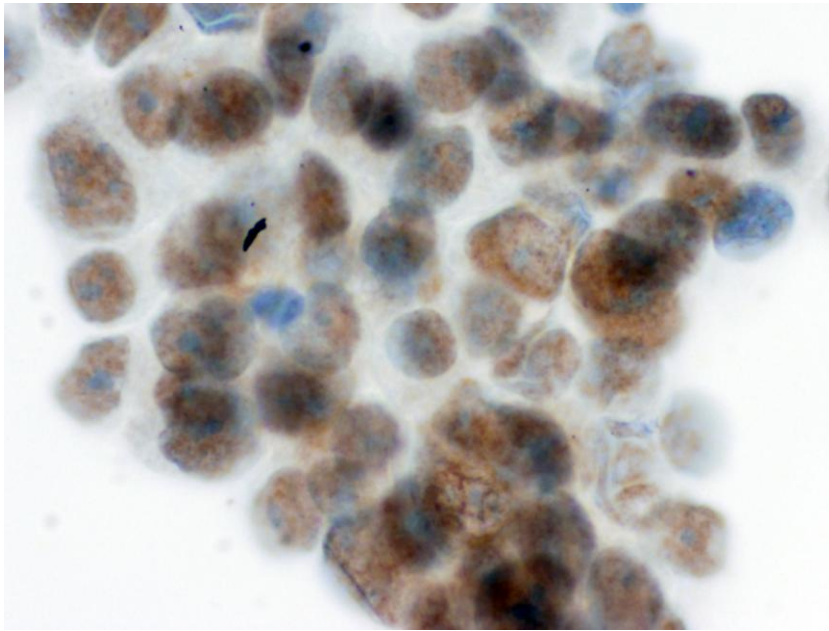


Figura 58: Expresión positiva de osteocalcina en superficies R1.

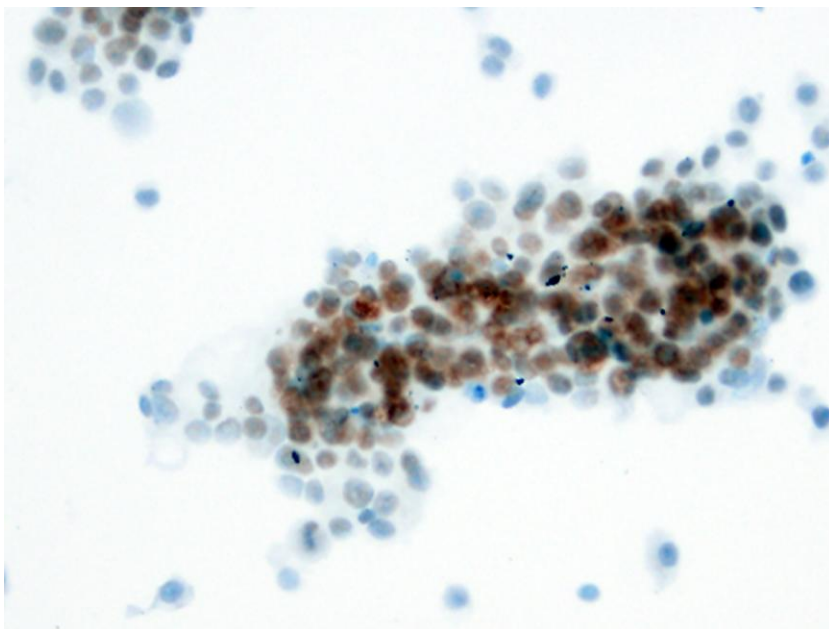


Figura 59: Expresión marcada de osteocalcina en superficies R4.

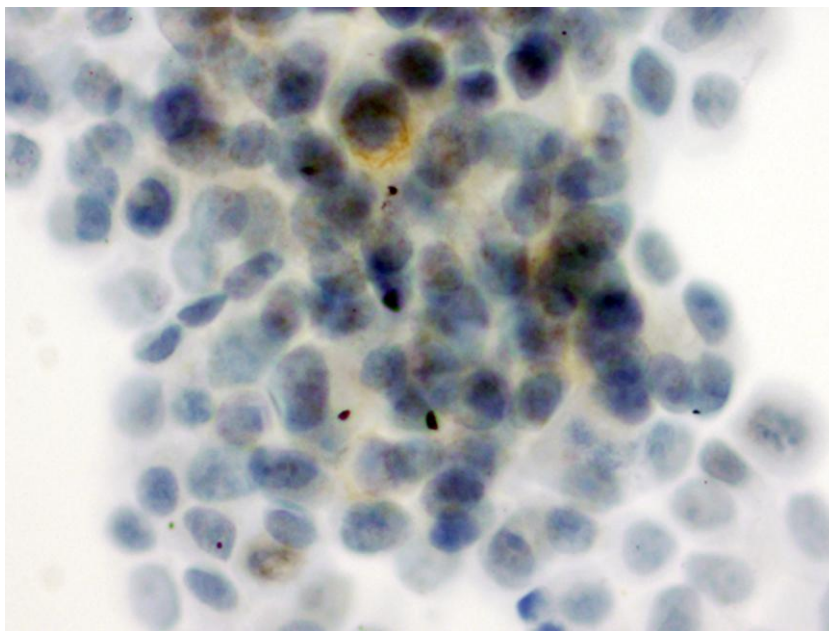


Figura 60: Expresión muy poco marcada de TRAP en superficies H4.

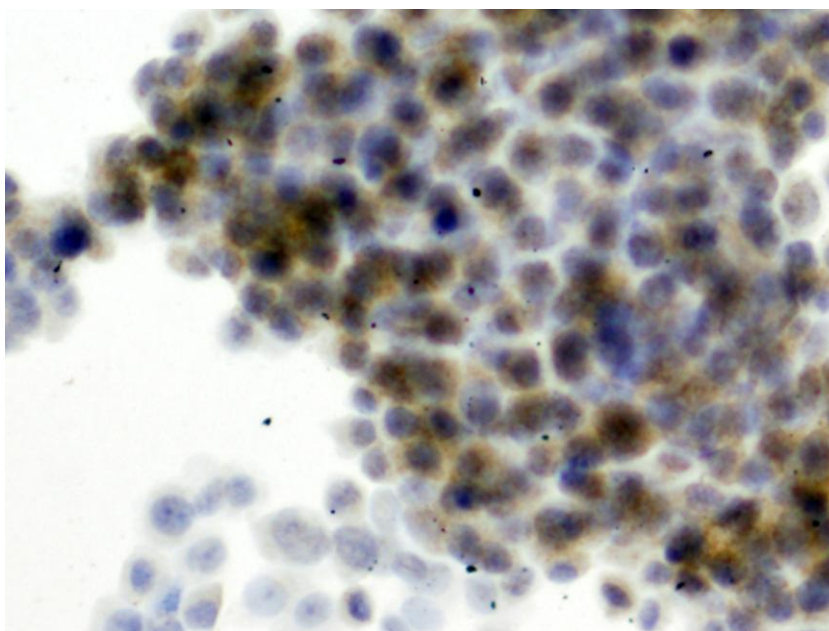


Figura 61: Expresión positiva de TRAP en superficies R1.



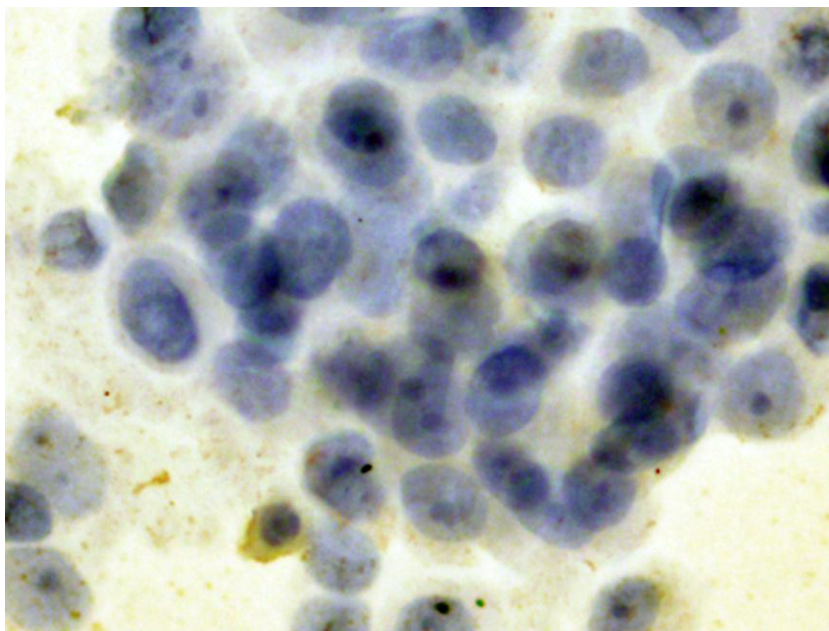


Figura 62: Expresión negativa de TRAP en superficies R4.

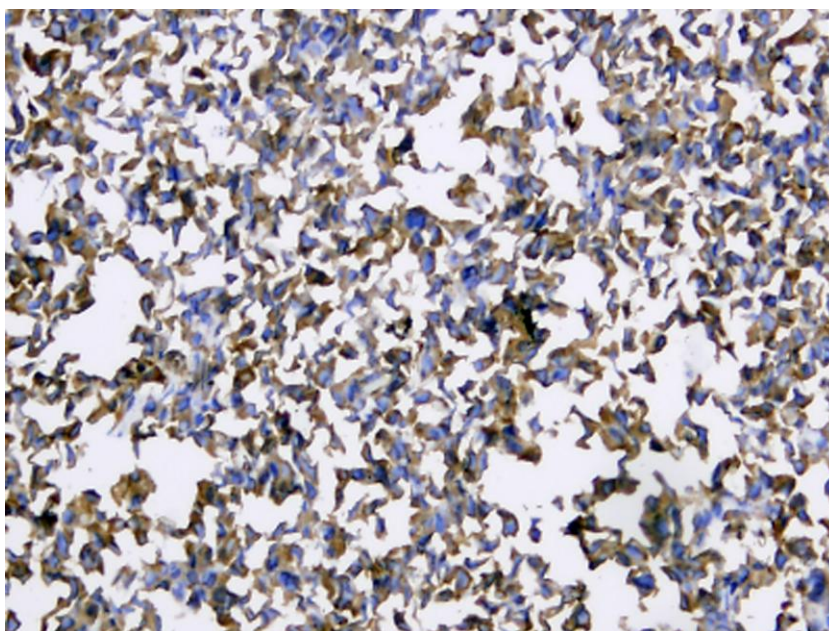


Figura 63: Expresión muy marcada de vimentina en superficies H4.

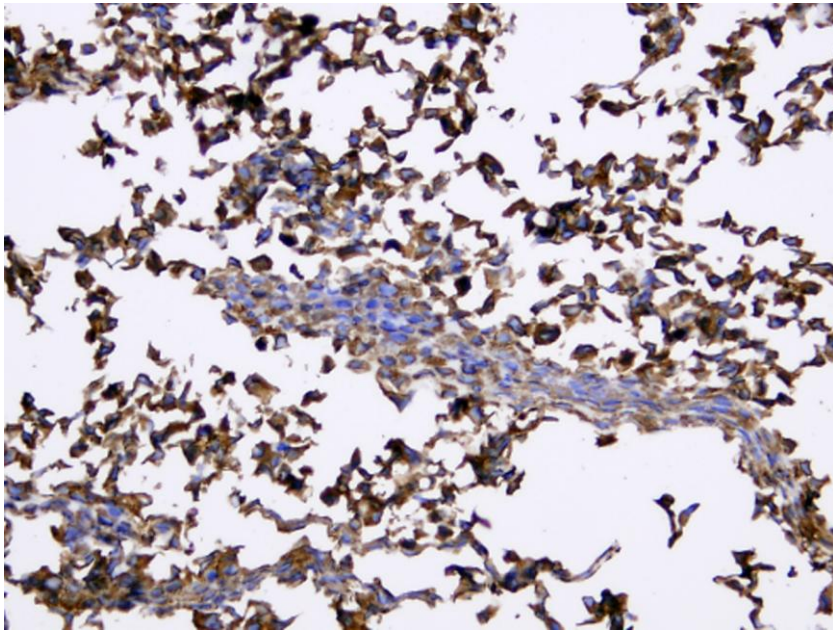


Figura 64: Expresión muy marcada de vimentina en superficies R1.

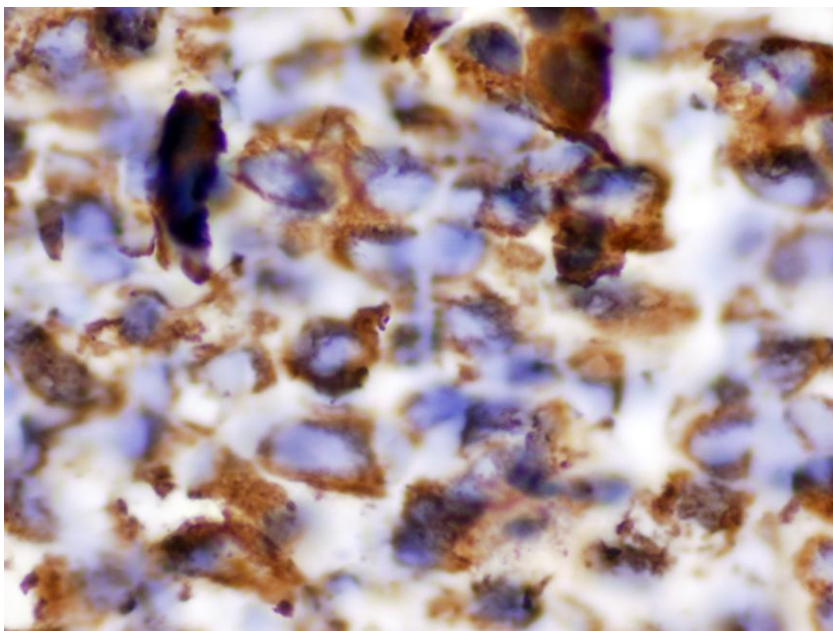


Figura 65: Expresión muy marcada de vimentina en superficies R4.

## 2. TABLAS

	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>
<b>Mínimo (nm)</b>	-2,60	-10,07	-27,96	-72,60
<b>Máximo (nm)</b>	8,32	17,69	29,92	84,80
<b><i>Ra</i> (nm)</b>	0,33	2,04	5,70	16,60
<b><i>Rq</i> (nm)</b>	0,61	2,58	7,13	20,70
<b><i>Skew</i></b>	4,53	0,155	0,16	0,156
<b><i>Kurtosis</i></b>	35,1	0,45	-0,19	-0,231
<b><i>r</i></b>	1,0024	1,0271	1,134	1,3906
<b><i>Df</i></b>	2,22	2,33	2,48	2,53

Tabla 1: Valores sobre rugosidad obtenidos mediante análisis con AFM.

<b>MUESTRA</b>	<b>ÁNGULO DE CONTACTO</b>
<b>R1</b>	$<7^\circ$
<b>R2</b>	$<7^\circ$
<b>R3</b>	$\sim 15^\circ$
<b>R4</b>	$\sim 20^\circ$
<b>H1</b>	$16 \pm 2^\circ$
<b>H2</b>	$21 \pm 2^\circ$
<b>H3</b>	$76 \pm 2^\circ$
<b>H4</b>	$95 \pm 2^\circ$

Tabla 2: Valores del ángulo de contacto obtenidos mediante ADSA-P.

MARCADORES	NIVEL DE EXPRESIÓN
<b>HLA-ABC (Control positivo)</b>	++
<b>CD14/CD45 (Control negativo)</b>	-
<b>CD10</b>	++
<b>CD20</b>	-
<b>CD38</b>	-
<b>CD55</b>	++
<b>CD56</b>	++
<b>CD59</b>	++
<b>CD95</b>	++
<b>CCR5</b>	-
<b>CXCR3</b>	+
<b>CXCR4</b>	-
<b>HLA-DR</b>	-

Tabla 3: Marcadores antigénicos expresados por MG-63 (Negatividad: -; Moderada positividad: +; Alta positividad: ++).

<b>MUESTRA</b>	<b>CONTAJE CELULAR MEDIO</b>
<b>R1</b>	2
<b>R2</b>	6
<b>R3</b>	10
<b>R4</b>	10,5
<b>H1</b>	4,5
<b>H2</b>	10
<b>H3</b>	22
<b>H4</b>	27

Tabla 4: Estudio de proliferación celular realizado en cámara de Neubauer. El número de células se expresa en células/ml x 1000.

<b>MARCADORES</b>	<b>H4</b>	<b>R1</b>	<b>R4</b>
<b>Actina</b>	+	-	-
<b>Caldesmón</b>	+	+	+
<b>CD10</b>	-	+/-	+
<b>CD56</b>	-	+	-
<b>COX-2</b>	++	++	++
<b>Ki67</b>	++	+/-	+
<b>Osteocalcina</b>	++	+	+
<b>TRAP</b>	-	++	-
<b>Vimentina</b>	++	++	++

Tabla 5: Marcadores antigénicos expresados por MG-63 tras cultivo sobre obleas de sílice (Negatividad: -; Moderada positividad: +; Alta positividad: ++).

# ***DISCUSIÓN***

Si he conseguido ver más lejos, es porque me he aupado en  
hombros de gigantes.

Isaac Newton (1642-1727). Físico y matemático inglés.





## DISCUSIÓN

El empleo de la sílice como material de recubrimiento para implantes se basa, por un lado, en su capacidad para unirse íntimamente al hueso, bien mediante el mecanismo conocido como *bone-bonding* o bien mediante la formación de *cement line* (Davies 2003, Davies 2007), y por otro, por la relativa facilidad para modificar sus propiedades físico-químicas a nivel superficial de forma aislada mediante reacciones químicas relativamente simples (Dotto & Kleinke 2001), lo que nos permite estudiar la influencia de estas propiedades sobre la respuesta celular de forma independiente.

Ya desde los estudios de Albrektsson y cols. (Albrektsson y cols. 1981) y Thomas & Cook (Thomas & Cook 1985) quedó establecida la importancia de la rugosidad de la superficie de los implantes en el aumento del contacto hueso-implante. Así, la topografía en la superficie a escala micro y nanométrica es capaz de modificar diferentes aspectos del comportamiento celular como la adhesión, morfología, proliferación y diferenciación, así como la producción de factores locales y microambientes favorables, principalmente estudiados en la superficie del titanio (Aaritalo y cols. 2007, Bachle & Kohal 2004, Franchi y cols. 2007, Hamilton & Brunette 2007, Hamilton y cols. 2007, Kunzler y cols. 2007a, Kunzler y cols. 2007b, Schwarz y cols. 2007, Schweikl y cols. 2007, Soumetz y cols. 2008, Zhao y cols. 2005). En este sentido, Huang y cols. (Huang y cols. 2004) demostraron la alta influencia de la nanorugosidad sobre la adhesión de los osteoblastos a la superficie. Coincidiendo con estos autores, según nuestros resultados la modificación topográfica a escala nanométrica juega un papel determinante en el comportamiento

celular a nivel de adhesión, morfología, proliferación y diferenciación. Así, tras realizar modificaciones topográficas a escala nanométrica de entre 0,33 y 16,60 nm pudimos observar cómo a medida que aumentó el valor  $Ra$ , la proliferación celular fue mayor. No obstante, la diferencia de rugosidad entre R3 y R4, teniendo en cuenta que el valor  $Ra$  de las muestras R4 era el triple que el de las R3 (Figura 1), no influyó en la proliferación celular en la misma proporción que lo hizo el aumento de rugosidad (Figura 25). A nivel inmunohistoquímico, se produjo también un aumento en la expresión de Ki67 desde R1 a R4 (Figura 55, Figura 56 y Tabla 5) pero, de nuevo, no en la proporción esperable en base al aumento de los valores  $Ra$  y  $Rq$ . Existen otros autores que son contrarios a esta hipótesis al no haber encontrado en sus experiencias diferencias en la adsorción proteica y crecimiento celular en distintas superficies con modificaciones a nivel nanométrico (Cai y cols. 2006, Ismail y cols. 2007).

Es importante resaltar que nuestros resultados en cuanto a la proliferación celular en función de los valores  $Ra$  o  $Rq$  alcanzó un techo o *plateau*, comportamiento similar al observado por otros autores (Linez-Bataillon y cols. 2002). Según estos autores, una vez que la rugosidad en términos de  $Ra$  y  $Rq$  alcanza altos valores, esta propiedad difícilmente seguirá afectando a la proliferación celular. Sin embargo, la tendencia que hemos encontrado en nuestro estudio sí puede guardar relación con otros parámetros referentes a la rugosidad, en concreto con la  $Df$ . Nuestros resultados determinaron claramente que los valores  $Ra$  y  $Rq$  juegan un papel determinante en la adhesión celular cuando la superficie es sometida a grabado por debajo de 60 min, con valores en torno a 6-8 nm

(Figura 1), situación a partir de la cual la influencia de la rugosidad superficial se satura (Figura 25) pasando a ser más útil el parámetro  $Df$  para describir el comportamiento celular. Si bien la  $Df$  también se estabiliza con el tiempo de grabado (Figura 1) a partir de 60 min, no ocurre así al relacionarlo con la proliferación celular (Figura 26). Esto indica cómo a partir de tiempos de grabado por encima de 60 min, pequeñas variaciones en la  $Df$  deben tener una determinada influencia en la proliferación celular. Por tanto, la textura superficial, expresada en términos de  $Df$ , se presenta como una vía de mejora de la adhesión e integración de un biomaterial al participar junto con la nanotopografía en la modulación de los procesos celulares de adhesión y proliferación (Mwenifumbo y cols. 2007). Otros estudios coinciden con esta idea y con nuestros resultados antes expresados, añadiendo que la textura superficial es determinante también en el proceso de nucleación de la apatita, es decir, es más importante la forma en la que están dispuestos los surcos, picos y valles de una superficie que la cuantificación de dicha rugosidad (Ball y cols. 2008).

En cuanto a la morfología y distribución celular sobre una superficie, existe consenso acerca de que en las superficies lisas la adhesión y migración celular es más difícil (Bachle & Kohal 2004) a pesar de que pueda generarse un tejido en íntimo contacto con el biomaterial por desarrollo de uniones intercelulares y crecimiento desde otras zonas, mecanismo conocido como osteogénesis a distancia (Davies 2003). Así, en las muestras R, con la observación del cultivo en su conjunto, se pudo determinar cómo el crecimiento en las superficies menos rugosas se produjo de forma más confluyente (Figura 27), es decir,

las células tendían a agruparse en las superficies menos rugosas, mientras que en las muestras más rugosas, el cultivo se encontraba más disperso (Figura 29). De igual forma, en las superficies menos rugosas se pudo observar un gran número de células de morfología esférica (Figura 28), lo que indicó que no se encontraban adheridas a la superficie. Este comportamiento es además indicativo de una mayor diferenciación del osteoblasto MG-63 (Bachle & Kohal 2004, Kieswetter y cols. 1996b). Este hecho quedó confirmado con el estudio de la expresión de CD56 (Figura 49, Figura 50 y Tabla 5). Esta es una proteína que media en la adhesión intercelular. Se expresó de forma más evidente en los cultivos sobre muestras menos rugosas, lo que indica que en dichas superficies las células necesitan desarrollar un sistema complejo de uniones intercelulares para que se produzca la proliferación celular y extensión sobre la placa de cultivo, mientras que en las superficies más rugosas este trabajo conjunto no sería necesario puesto que existirían otros mecanismos predominantes de adhesión celular directamente a la superficie del material. No hemos encontrado en la literatura trabajos previos relativos a este aspecto.

Del mismo modo, la irregularidad y complejidad de la forma de las células así como la densidad y longitud de las prolongaciones citoplasmáticas aumentó también de acuerdo a la  $Df$  (Figura 30), lo que sugiere que la complejidad estructural juega un papel principal en estas observaciones (Rico y cols. 2009). Esto se puede explicar considerando que una dimensión fractal elevada indica directamente un área superficial mayor y, por tanto, una mayor posibilidad de contacto para el anclaje (Anselme y cols. 2000, Kieswetter y cols. 1996b, Lauer y cols. 2001).

Recientemente, Gatti y cols. (Gatti y cols. 2008) han realizado observaciones similares, de acuerdo con estudios previos en este sentido a escala nanométrica (Chesmel y cols. 1995, Healy y cols. 1996, Thomas y cols. 1997).

En nuestro estudio, las modificaciones topográficas, por ser mediante ataque químico con NaOH, produjeron una superficie en la que la distribución de picos y valles ocurrió de forma aleatoria (Figura 7). Este tratamiento con NaOH, como ha quedado demostrado, es capaz de modificar la topografía de la superficie de la sílice, proceso que ocurre de forma similar a como se ha descrito en la superficie de otros metales (Kim y cols. 2000, Uchida y cols. 2002, Wang y cols. 2001). Se ha descrito cómo la cinética de formación de hidroxiapatita se ve acelerada significativamente por la presencia de la nanoestructura generada por el tratamiento con NaOH (Mendonca y cols. 2008), aspecto que se ve implementado en experimentos de inmersión en fluidos corporales simulados (SBF) (Oh y cols. 2005). Además, las dimensiones a escala sub-micrométrica influyen en la generación de contactos focales, adhesión, morfología y orientación celular. Las dimensiones entre 1 y 100  $\mu\text{m}$  afectan a la adhesión, morfología y orientación celulares así como la formación de hueso, mientras que dimensiones mayores a 100  $\mu\text{m}$  son imprescindibles para la retención mecánica (Ellingsen y cols. 2006). Las células serían capaces de detectar los puntos de contacto con la superficie (Figura 33), con independencia de la interacción proteica, transfiriendo esa información a su citoplasma mediante integrinas (Mendonca y cols. 2008) para así modificar su comportamiento, tanto a nivel adhesión como de movilidad celular. Las reacciones indirectas están mediadas por

proteínas de adhesión mientras que las directas se deben a la acción específica de las integrinas (Brunette 1988). Estos y otros autores sugieren que el aumento de hueso en contacto con implantes con superficie rugosa podría deberse a la producción de factores osteogénicos locales (Hamilton & Brunette 2007, Hamilton y cols. 2007, Kieswetter y cols. 1996a). Estudios similares de Salaszyk y cols. (Salaszyk y cols. 2004a, Salaszyk y cols. 2007, Salaszyk y cols. 2004b) concluyen que la topografía de una superficie es capaz de estimular la respuesta osteoblástica por medio de la interacción de las proteínas de la matriz extracelular, integrinas, quinasas de adhesión focal, vitronectina, etc. Por tanto, la topografía superficial no sólo influye en la propia interacción físico-química con la superficie a nivel celular sino que además es capaz por medio de la intervención de complejos mecanismos de transducción de señales extracelulares al interior de la célula de modificar su comportamiento modulando cascadas enzimáticas ocurridas en el citoplasma (Park & Webster 2005).

En este sentido, a pesar de que en nuestro estudio no hubo reflejo de este hecho en cuanto a la elevada expresión de Vimentina ni en la expresión de Actina y el aumento de la expresión de CD10 (Figura 46 y Figura 47), sí hubo un ligero aumento de la expresión de Osteocalcina (Figura 58 y Figura 59) y cambio a negatividad para TRAP (Figura 61 y Figura 62) al aumentar la rugosidad de R1 a R4 (Tabla 5). La expresión de Vimentina fue elevada en todas nuestras muestras (Figura 64, Figura 65 y Tabla 5), lo que muestra una escasa diferenciación del cultivo (Duprey & Paulin 1995, Weiss 1995). Es importante resaltar que las células empleadas en el presente estudio son de origen tumoral con lo que

los cambios en su fenotipo inmunohistoquímico específico son más difíciles de desarrollarse. En el mismo sentido, la expresión de Actina fue negativa en todas las superficies rugosas (Figura 40, Figura 41 y Tabla 5). Esto demuestra un menor desarrollo y organización a nivel del citoesqueleto y, por tanto, una menor diferenciación celular. Sin embargo, si consideramos la expresión de los marcadores antes citados, además de la negatividad para CD56 en R4, confirmamos cierta tendencia hacia el desarrollo de un fenotipo algo más diferenciado en las muestras R4 que en las muestras R1. Así, el ligero aumento de la expresión de Osteocalcina refleja esta diferenciación fenotípica osteoblástica. De especial interés es el hecho de que en las superficies menos rugosas hallamos encontrado una marcada expresión de TRAP (Figura 61), proteína relacionada con actividad osteoclástica. La no expresión en las superficies más rugosas (Figura 62) indicaría una mayor evolución fenotípica del cultivo, que en superficies menos rugosas estaría más indefinido pudiendo expresarse, por tanto, mayor cantidad de proteínas, incluso específicas de otros tipos celulares. Por tanto, coincidimos con la opinión de otros autores en el sentido de que la nanotopografía superficial, además de soportar la adhesión osteoblástica de forma específica y permitir su proliferación, confirmado en nuestro estudio por el aumento de expresión de Ki67, ésta ejerce un posible efecto beneficioso en cuanto a la diferenciación osteoblástica a los 21-28 días (Webster y cols. 1999). Adicionalmente, estudios *in vitro* muestran que la microtopografía modula la maduración fenotípica (Batzer y cols. 1998, Lohmann y cols. 2002), influyendo también en otros aspectos como son el aumento de la actividad celular y modulación de la función osteoblástica, modulando el proceso de osteosíntesis y la producción de



osteocalcina (Mustafa y cols. 2001). Hasta la fecha, existen pocos estudios que evalúen el patrón de expresión génica indicativo de diferenciación en función a la topografía superficial. Uno de ellos ha demostrado un aumento de la expresión de Runx2 (Guo y cols. 2007), con lo que la expresión de otras proteínas dependientes, como la proteína morfogenética ósea (BSP), osteopontina y osteocalcina también se verán aumentadas.

Por tanto y como principal aspecto a resaltar en cuanto a la topografía se refiere, basándonos en estos mecanismos celulares y moleculares, el uso de distintas rugosidades de superficie determinará, a nivel clínico, la velocidad de los procesos de remodelación ósea y de aposición posterior, lo que influirá directamente en el tiempo de carga protésica de los implantes. Algunos autores (Evans y cols. 1996, Gapski y cols. 2003, Piattelli y cols. 1993) refieren que el tratamiento de superficie no influye en el éxito de los implantes sometidos a carga inmediata. Sí se han reportado, por ejemplo, buenos resultados con implantes cortos gracias al uso de superficies rugosas (Buser y cols. 1997, Ferrigno y cols. 2002, Nedir y cols. 2004, Testori y cols. 2001) y en huesos tipo III y IV, como el maxilar posterior (Lazzara y cols. 1999, Wen y cols. 2003, Weng y cols. 2003). Además, una característica interesante de la nanotopografía es su selectividad para la adhesión celular habiéndose demostrado la disminución relativa de la adhesión de fibroblastos (Hart y cols. 2007, Price y cols. 2003), células del músculo liso y condrocitos (Price y cols. 2004) y bacterias (Colon y cols. 2006), lo cual puede optimizarse y aplicarse al diseño de los implantes y sus aditamentos, como se ha demostrado con el desarrollo del Laser-Lok® (BioHorizons, Inc.,

Birmingham, Alabama, EE.UU.) (Alexander y cols. 2009, Frenkel y cols. 2002, Soboyejo y cols. 2002).

Considerando la importancia de la topografía en la interacción célula-superficie, sin duda el aspecto que se ha demostrado más relevante tras la realización de la presente investigación, aunque menos estudiado en la literatura científica, es la interacción biológica inicial entre las células y una superficie en función a la modificación de la humectabilidad sin cambios topográficos (Kieswetter y cols. 1996a, Kilpadi & Lemons 1994). El tratamiento empleado por nosotros con el fin de hidrofobizar la superficie consistió en la formación de una nueva capa superficial saturada con grupos metilo (-CH<sub>3</sub>) terminales en mayor o menor medida que serán los que intervengan en las relaciones biológicas posteriores en el aspecto físico-químico (Ortega-Vinuesa y cols. 1998). Varios estudios han tratado de analizar la influencia de éste parámetro en la proliferación celular (Arima & Iwata 2007, Schweikl y cols. 2007). Sin embargo, la variedad de grupos químicos funcionales (-COOH, -NH<sub>2</sub>, -CF<sub>3</sub>, -PEG, etc.) unidos a la superficie modificada en todos estos estudios dificulta el establecimiento de correlaciones claras entre la humectabilidad y la adhesión celular debido a la influencia ambigua que puede ejercer específicamente cada uno de esos grupos químicos.

La interacción celular con una superficie implica un proceso complejo mediado por múltiples proteínas adhesivas y de la matriz extracelular y la transducción de señales al citoplasma por medio de integrinas en base a sus propiedades de membrana y al tipo celular (Webb y cols. 2000). Generalmente se ha considerado que una superficie hidrofílica puede presentar ventajas en cuanto a la adhesión celular y de

proteínas en las primeras fases de la reparación y en la cascada de eventos que ocurren durante la osteointegración (Ellingsen y cols. 2006). Sin embargo, en el presente trabajo, nuestros resultados mostraron una correlación positiva entre la hidrofobicidad y la proliferación celular (Figura 16 y Figura 24). A nivel inmunohistoquímico, considerando la superficie R1 como H0 tal y como describimos en la sección de *Materiales y Métodos*, este hecho tuvo su repercusión en la expresión de Ki67 pasando a ser muy marcada en la superficie H4 (Figura 54, Figura 55 y Tabla 5).

La razón de estas diferencias puede deberse a la interacción hidrofóbica que tiene lugar durante el proceso de la adsorción proteica. Se ha demostrado que la adsorción de proteínas globulares está generalmente estimulada por interacciones hidrofóbicas entre la superficie y estas macromoléculas (Norde 1986). La adhesión espontánea de este tipo de moléculas sobre las superficies hidrofóbicas es debida principalmente al aumento de entropía causada por la liberación de la mayor parte del agua que se encuentra estructurada en las zonas hidrófobas tanto de las cadenas de polipéptidos como de la superficie hidrófoba del biomaterial. Este tipo de interacción generalmente es mayor para proteínas grandes y lábiles que para las más pequeñas y rígidas (Norde 1986). En este sentido, se ha demostrado que el fibrinógeno (MW = 340 kD) es capaz de interaccionar con una superficie hidrófoba de forma más fuerte que la albúmina (MW = 66 kD) (Arima & Iwata 2007, Ortega-Vinuesa y cols. 1998, Rodrigues y cols. 2006). Así pues, cuando un material hidrófobo se expone a células suspendidas en un medio de cultivo con suero bovino fetal, las proteínas séricas presentes en ese medio son rápidamente adsorbidas sobre la

superficie del material, antes incluso de que se produzca ningún tipo de adhesión celular (Davies 2003). La albúmina es la proteína mayoritaria del suero, así que estadísticamente esta proteína sería la que recubriría en primer lugar la superficie de sílice. Sin embargo, la adhesión de albúmina a una superficie no promueve la adhesión celular, puesto que esta proteína no tiene dominios específicos para ello (Arima & Iwata 2007, Wilson y cols. 2005). Por tanto, para poder explicar la elevada adhesión celular que hemos encontrado en las muestras más hidrófobas (que además son las que más adhesión proteica generan), es obligatorio que la albúmina adsorbida inicialmente sea desplazada por otras proteínas con capacidad adhesiva celular como la fibronectina (MW = 500 kD), que sí se adhiere fuertemente creando fuertes puntos de adhesión focal (Scotchford y cols. 2002). Esta dinámica de desplazamiento proteico en una superficie va a depender de la afinidad relativa que exista entre la superficie y la nueva proteína así como de la fortaleza y número de los puntos de contacto existentes entre la superficie y la proteína adsorbida con anterioridad. Así, la albúmina, al no tener un alto peso molecular y poseer una capa externa relativamente hidrófila, tiende a establecer pocos contactos con las superficies de sílice metilada pudiendo ser fácilmente desplazada de la superficie hidrofóbica por otras proteínas de mayor peso molecular y mayor hidrofobicidad (Ortega-Vinuesa y cols. 1998). Además, se ha descrito una sinergia entre la albúmina y la fibronectina en la adhesión celular, lo que aumentaría la adhesión y dispersión celular en superficies hidrófobas, proceso denominado “*albumin rescuing*” (Lewandowska y cols. 1989). Este razonamiento, de acuerdo con Sawase y cols. (Sawase y cols. 2008), por tanto, podría explicar la correlación entre hidrofobicidad

y proliferación celular que hemos observado en nuestro estudio y que difiere de la mayoría de los aparecidos en la literatura.

De forma similar, Degasne y cols. (Degasne y cols. 1999), obtuvieron mejores resultados en cultivos con distintas características superficiales siempre que el medio de cultivo fuese suplementado con suero bovino fetal, presentando las células de la línea osteoblástica Saos-2 mayores prolongaciones citoplasmáticas y una mayor expansión en la placa. Observaron resultados similares cuando el medio era suplementado con vitronectina o con fibronectina. En nuestra experiencia, empleamos un suplemento de suero bovino fetal en el medio de cultivo lo que, como confirmaron estos autores, influye en la tendencia descrita en cuanto al aumento de prolongaciones y la mayor longitud de éstas (Figura 38) así como el crecimiento en placa de forma más homogénea y dispersa ya que esta propiedad es la que interviene de forma crítica en la interacción con las proteínas del suero. Los cultivos sobre superficies metiladas mostraron una clara tendencia a la dispersión (Figura 35), aunque también aumentó la proliferación en capas a pesar de la negatividad en la expresión de CD56 en superficies más hidrófobas (Figura 48), lo que implicaría otros mecanismos de adhesión intercelular por medio de otras proteínas expresadas en células más avanzadas a nivel fenotípico.

La carga negativa en superficie es otro de los parámetros que influye sobre el incremento de la adsorción de ciertas proteínas, como la fibronectina, muy relevantes en la adhesión celular a la superficie del biomaterial. Sin embargo, Bergkvist y cols. (Bergkvist y cols. 2003) concluyeron que, en las superficies más hidrófobas, los grupos metilo reducen la influencia de la carga negativa de la sílice preservando las

interacciones iónicas intermoleculares lo que resulta en una estructura proteica global de la fibronectina que asemeja a la estructura en solución. Según esto, la diferencia de morfología de la proteína adsorbida dependería de la mayor exposición hidrofílica, lo que estabilizaría las dos cadenas de la proteína, extendiendo la molécula al adsorberse y favoreciendo así la mayor adhesión celular. Contrariamente, nuestros resultados muestran una mayor adhesión sobre las superficies metiladas más hidrófobas (Figura 24). Entendemos, de acuerdo con Norde (Norde 1986), que la extensión de un cuerpo sobre una superficie adsorbente depende de la atracción que exista entre ellos. La adhesión celular está mediada por una adsorción previa de proteínas y ésta puede ser causada por fuerzas eléctricas y/o hidrofóbicas. El que se sustituya un tipo de interacción por otro al metilar una superficie hará que se atenúen las interacciones eléctricas atractivas proteína-superficie (siempre que la proteína sea catiónica) pero a su vez se potenciarán las interacciones hidrófobas atractivas proteína-superficie. Estas interacciones hidrófobas proteína-superficie hacen incluso que la proteína se extienda más sobre la superficie y que aumente su exposición hidrófila hacia la fase acuosa (huyendo esas partes proteicas de la superficie hidrófoba), por lo que, en principio, favorecerán la adhesión celular al exponer teóricamente un mayor número de regiones RGD. Por tanto, la reducción de la carga negativa de la sílice por incorporación de grupos metilo no tiene porqué reducir la adsorción de la fibronectina, sino que incluso puede potenciarla, al cambiar el mecanismo “atractivo eléctrico” por otro que incluso puede llegar a ser más fuerte, el “atractivo hidrófobo”.

En términos de ángulo de contacto, nuestros resultados mostraron una mayor proliferación celular para ángulos de contacto en torno a 80-90° (Figura 24). Estos resultados difieren de los propuestos por otros autores según los cuáles la adhesión celular es máxima sobre superficies con ángulos de contacto intermedios (40°-70°) (Lee y cols. 1998). Otros autores incluso establecen que las superficies hidrofílicas soportan la adhesión celular mientras que la hidrofobicidad la inhibe (Faucheux y cols. 2004, Keselowsky y cols. 2004).

La actividad celular de MG-63 sobre las superficies metiladas sugirió también cierta diferenciación celular a nivel morfológico al cambiar tanto la humectabilidad como la rugosidad de la superficie. De hecho, la mayor proliferación observada sobre las superficies hidrófobas indica que esta propiedad física debe catalizar de alguna manera la actividad celular. Nuestros resultados demuestran cambios morfológicos a los 21 días de cultivo (Figura 35 y siguientes). Existen en la literatura resultados presentados por otros autores que no concuerdan con los nuestros, pero cabe decir que no son estudios comparables por las diferencias en cuanto al tiempo de observación (Kim y cols. 2007). Otros grupos sí muestran resultados similares en cuanto a adhesión celular, dispersión y diferenciación en superficies moderadamente hidrófobas (Tamada & Ikada 1994). Además se confirma en algunos estudios nuestras observaciones de depósitos calcificados sobre la membrana celular y de la matriz extracelular (Mendonca y cols. 2008) (Figura 39). La modificación de la expresión de marcadores de diferenciación inmunohistoquímicos confirmó éstas hipótesis. Así, tomando como referencia las superficies R1, que consideramos también H0, en las

superficies H4 se produjo un aumento de la expresión de Actina (Figura 40), confirmando la mayor organización del citoesqueleto de la célula, un elevado aumento en la expresión de Osteocalcina (Figura 57), lo que demuestra claramente una mayor actividad osteoblástica, y la no expresión de TRAP (Figura 60). En este sentido, es importante resaltar la negatividad para CD10 en las células de la superficie H4. Esta proteína es una metaloproteasa que se expresa en células sensibles a diversas hormonas y péptidos moduladores, ejerciendo su función degradando esos elementos proteicos del entorno celular, lo que disminuye su concentración y la respuesta biológica de la célula diana (Oliva 2004). La baja expresión de CD10 dejaría a estas células más expuestas frente a posibles acciones hormonales y peptídicas y, por tanto, habría una mayor probabilidad de modulación celular a partir de la acción de diversos mediadores de naturaleza proteica (Avila Ortiz 2006). En este contexto, es lógico pensar que para alcanzar y mantener un mayor grado de diferenciación en las células osteogénicas MG-63 sería necesario un mayor efecto biológico hormonal y peptídico. Todo ello indicaría una mayor evolución fenotípica del cultivo a pesar de la alta expresión de Vimentina en las células cultivadas en todas las superficies (Tabla 5).

Como hemos demostrado a lo largo del presente estudio mediante el análisis de los cambios morfofuncionales celulares (Figura 27 y siguientes) y la expresión de los distintos marcadores inmunohistoquímicos (Tabla 5) en comparación con las condiciones basales de MG-63, tanto a nivel morfológico (Figura 17 y siguientes) como inmunohistoquímico (Tabla 3), la hidrofobicidad de la superficie afecta más al comportamiento celular en términos de morfología,



proliferación y diferenciación celular que el cambio de rugosidad. Así, observamos mayores cambios en la expresión de los marcadores representativos de proliferación y diferenciación en las células cultivadas sobre las superficies H4. En las superficies R4 en relación a R1 también existe variación en la expresión de éstos y otros marcadores pero de forma menos marcada.

Por tanto, el proceso por el cual se produce la reacción a un biomaterial depende en gran medida de las características de la superficie, del propio material y, de un modo más determinante, del proceso biológico mismo, es decir, de los diferentes mecanismos moleculares que intervienen y se suceden durante el proceso regenerativo (Davies 2000, Davies 2003, Davies 2007). Dicho proceso se encuentra en un primer momento determinado por la adsorción proteica, principalmente por la adhesión de fibrinógeno, constituyente fundamental del coágulo de fibrina generado tras la inserción de un biomaterial por la herida quirúrgica producida (Fernández-Barbero *y cols.* 2006, Galindo-Moreno *y cols.* 2007). Como hemos demostrado, dicha adhesión está íntimamente relacionada con las características superficiales del material del implante, sobre todo por su humectabilidad. Del mismo modo, empleando marcadores biológicos ponemos de manifiesto la relación que se produce entre un biomaterial y los diferentes procesos celulares, individuales y de conjunto, en función a las características superficiales de dicho material, lo que nos permite una aproximación al conocimiento íntimo de estas interacciones.

# ***CONCLUSIONES***

Lo último que uno sabe, es por donde empezar.

Blaise Pascal (1623-1661). Físico y matemático francés.



## CONCLUSIONES

1. Nuestros resultados demuestran que las superficies de sílice modificadas por reacciones químicas simples permiten evaluar de forma independiente la influencia de la nanotopografía y la humectabilidad en la interacción célula-substrato en términos de morfología, proliferación y diferenciación celular.

2. Según nuestros resultados, la interacción célula-superficie en términos de morfología, proliferación y diferenciación celular depende de forma más relevante de la humectabilidad que de la topografía, lo que confirma parte de nuestra hipótesis de estudio. Sin embargo, estos fenómenos celulares se ven favorecidos por el aumento de la hidrofobicidad de la superficie mediante la adición de grupos metilo y no de la hidrofilia como planteamos en nuestra hipótesis de estudio.

3. En la interacción célula-substrato en cuanto a la topografía se refiere, es más importante el efecto causado por la dimensión fractal de la superficie rugosa que el ejercido por los valores descriptivos clásicos de rugosidad ya que ayuda a comprender y predecir mejor el comportamiento celular coincidiendo su aumento con el aumento de la proliferación y diferenciación celulares.

4. Nuestros hallazgos, fruto de la investigación básica multidisciplinar, se presentan como herramientas útiles en la optimización del diseño de superficies de implantes y generación de nuevos biomateriales para aplicaciones biomédicas.



# ***BIBLIOGRAFÍA***

Hay cosas peores que quemar libros; una de ellas es no leerlos.

Ray Bradbury (1920-). Escritor estadounidense.



## BIBLIOGRAFÍA

Aaritalo, V., Areva, S., Jokinen, M., Linden, M. & Peltola, T. (2007) Sol-gel-derived TiO(2)-SiO(2) implant coatings for direct tissue attachment. Part I: design, preparation and characterization. *Journal of Material Science. Materials in Medicine* **18**: 1863-1873.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. (1994) *The cell*. New York, Garland Publishing Inc.

Albrektsson, T., Branemark, P.I., Hansson, H.A. & Lindström, J. (1981) Osseointegrated titanium implants. *Acta Orthopaedica Scandinava* **52**: 155-170.

Alexander, H., Ricci, J.L. & Hrico, G.J. (2009) Mechanical basis for bone retention around dental implants. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* **88**: 306-311.

Allen, L.T., Fox, E.J., Blute, I., Kelly, Z.D., Rochev, Y., Keenan, A.K., Dawson, K.A. & Gallagher, W.M. (2003) Interaction of soft condensed materials with living cells: phenotype/transcriptome correlations for the hydrophobic effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 6331-6336.

Amato, M.M., Blyaydon, S.M., Scribbick, F.W., Jr., Belden, C.J., Shore, J.W., Neuhaus, R.W., Kelley, P.S. & Holck, D.E. (2003) Use of bioglass for orbital volume augmentation in enophthalmos: a rabbit model (*Oryctolagus cuniculus*). *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery* **19**: 455-465.



Anderson, S.I., Downes, S., Perry, C.C. & Caballero, A.M. (1998) Evaluation of the osteoblast response to a silica gel in vitro. *Journal of Material Science. Materials in Medicine* **9**: 731-735.

Anderson, T.F. (1951) Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *Transactions of the New York Academy of Sciences* **13**: 130-133.

Anselme, K. (2000) Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* **21**: 667-681.

Anselme, K., Bigerelle, M., Noel, B., Dufresne, E., Judas, D., Iost, A. & Hardouin, P. (2000) Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *Journal of Biomedical Materials Research* **49**: 155-166.

Aparicio Bádenas, C.J. (2004) Tratamientos de Superficie sobre Titanio Comercialmente Puro para la Mejora de la Osteointegración de los Implantes Dentales. *Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metallúrgica*. Barcelona: Universitat Politècnica de Catalunya.

Applegate, E.J. (1995) *The Anatomy and Physiology*. Philadelphia, W.B. Saunders Company.

Areva, S., Aaritalo, V., Tuusa, S., Jokinen, M., Linden, M. & Peltola, T. (2007) Sol-Gel-derived TiO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> implant coatings for direct tissue attachment. Part II: Evaluation of cell response. *Journal of Material Science. Materials in Medicine* **18**: 1633-1642.

Arima, Y. & Iwata, H. (2007) Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials* **28**: 3074-3082.

Aubin, J., Turksen, K. & Hersche, J. (1993) Osteoblastic cell lineage. En: M. Noda, ed. *Cellular and Molecular Biology of Bone*, 1-45. San Diego: Academic Press Inc.

Avila, G., Misch, K., Galindo-Moreno, P. & Wang, H.L. (2009) Implant surface treatment using biomimetic agents. *Implant Dentistry* **18**: 17-26.

Avila Ortiz, G. (2006) El Plasma Rico en Plaquetas como inductor de procesos de Proliferación y Diferenciación celular epitelio-mesenquimal *Departamento de Estomatología*. Granada: Universidad de Granada.

Bachle, M. & Kohal, R.J. (2004) A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. *Clinical Oral Implants Research* **15**: 683-692.

Bagno, A. & di Bello, C. (2004) Surface Treatment and Roughness Properties of Ti-based Biomaterials. *Journal of Material Science. Materials in Medicine* **15**: 935-949.

Ball, M., Grant, D.M., Lo, W.J. & Scotchford, C.A. (2008) The effect of different surface morphology and roughness on osteoblast-like cells. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* **86**: 637-647.

Batzer, R., Liu, Y., Cochran, D.L., Szmuckler-Moncler, S., Dean, D.D., Boyan, B.D. & Schwartz, Z. (1998) Prostaglandins mediate the effects of titanium surface roughness on MG63 osteoblast-like cells and alter cell responsiveness to 1 alpha,25-(OH)2D3. *Journal of Biomedical Materials Research* **41**: 489-496.

Bergkvist, M., Carlsson, J. & Oscarsson, S. (2003) Surface-dependent conformations of human plasma fibronectin adsorbed to silica, mica, and hydrophobic surfaces, studied with use of Atomic Force Microscopy. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* **64**: 349-356.

Billiau, A., Edy, V.G., Heremans, H., Van Damme, J., Desmyter, J., Georgiades, J.A. & De Somer, P. (1977) Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **12**: 11-15.

Boccaccini, A.R. & Blaker, J.J. (2005) Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds. *Expert Review of Medical Devices* **2**: 303-317.

Branemark, P.I., Hansson, B.O., Adell, R., Breine, U., Lindstrom, J., Hallen, O. & Ohman, A. (1977) Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery. Supplementum* **16**: 1-132.

Brault, P., Dumas, P. & Salvan, F. (1998) Roughness scaling of plasma-etched silicon surfaces. *Journal of Physics: Condensed Matter* **10**: L27-L32.

Brunette, D.M. (1988) The effects of implant surface topography on the behavior of cells. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **3**: 231-246.

Bullough & Vigorita (1996) *Orthopaedic Pathology*. London, Mosby-Wolfe.

Buser, D., Mericske-Stem, R., Bernard, J.P., Behneke, A., Behneke, N., Hirt, H.P., Belser, U.C. & Lang, N.P. (1997) Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. Part 1: 8-year life table analysis of a prospective multi-center study with 2359 implants. *Clinical Oral Implants Research* **8**: 161-172.

Cai, K., Bossert, J. & Jandt, K.D. (2006) Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation? *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **49**: 136-144.

Chambers, T.J., Darby, J.A. & Fuller, K. (1985) Mammalian collagenase predisposes bone surfaces to osteoclastic resorption. *Cell and Tissue Research* **241**: 671-675.

Chan, C., Thompson, I., Robinson, P., Wilson, J. & Hench, L. (2002) Evaluation of Bioglass/dextran composite as a bone graft substitute. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **31**: 73-77.

Chen, Q.Z., Thompson, I.D. & Boccaccini, A.R. (2006) 45S5 Bioglass-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **27**: 2414-2425.

Chesmel, K.D., Clark, C.C., Brighton, C.T. & Black, J. (1995) Cellular responses to chemical and morphologic aspects of biomaterial surfaces. II. The biosynthetic and migratory response of bone cell populations. *Journal of Biomedical Materials Research* **29**: 1101-1110.

Chong, S.C., Loo, J., Lee, P.S. & Ma, J. (2008) Biomimetic processing of bioactive interface on silicon substrates. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* **85**: 368-377.

Colon, G., Ward, B.C. & Webster, T.J. (2006) Increased osteoblast and decreased Staphylococcus epidermidis functions on nanophase ZnO and TiO<sub>2</sub>. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* **78**: 595-604.

Condie, R., Bose, S. & Bandyopadhyay, A. (2007) Bone cell-materials interaction on Si microchannels with bioinert coatings. *Acta Biomaterialia* **3**: 523-530.

Conejero, J.A., Lee, J.A. & Ascherman, J.A. (2007) Cranial defect reconstruction in an experimental model using different mixtures of bioglass and autologous bone. *Journal of Craniofacial Surgery* **18**: 1290-1295.

Crofts, R., Boyce, T. & Bloebaum, R. (1994) Aging changes in osteon mineralization in the human femoral neck. *Bone* **15**: 147-152.

Davies, J.E. (2000) Bone engineering. Toronto, EM Squared.

Davies, J.E. (2003) Understanding peri-implant endosseous healing. *Journal of Dental Education* **67**: 932-949.

Davies, J.E. (2007) Bone bonding at natural and biomaterial surfaces. *Biomaterials* **28**: 5058-5067.

Degasne, I., Basle, M.F., Demais, V., Hure, G., Lesourd, M., Grolleau, B., Mercier, L. & Chappard, D. (1999) Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces. *Calcified Tissue International* **64**: 499-507.

Donoso, M.G., Méndez-Vilas, A., Bruque, J.M. & González-Martin, M.L. (2007) On the relationship between common amplitude surface roughness parameters and surface area: Implications for the study of cell-material interactions. *International Biodeterioration and Biodegradation* **59**: 245-251.

Dotto, M.E.R. & Kleinke, M.U. (2001) Kinetic roughening in etched Si. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* **295**: 149-153.

Ducheyne, P. & Qiu, Q. (1999) Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* **20**: 2287-2303.

Duprey, P. & Paulin, D. (1995) What can be learned from intermediate filament gene regulation in the mouse embryo. *International Journal of Developmental Biology* **39**: 443-457.

El-Ghannam, A. (2005) Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering. *Expert Review of Medical Devices* **2**: 87-101.

El-Ghannam, A., Amin, H., Nasr, T. & Shama, A. (2004a) Enhancement of bone regeneration and graft material resorption using surface-modified bioactive glass in cortical and human maxillary cystic bone defects. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **19**: 184-191.

El-Ghannam, A., Cunningham, L., Jr., Pienkowski, D. & Hart, A. (2007) Bone engineering of the rabbit ulna. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **65**: 1495-1502.

El-Ghannam, A., Hamazawy, E. & Yehia, A. (2001) Effect of thermal treatment on bioactive glass microstructure, corrosion behavior, zeta potential, and protein adsorption. *Journal of Biomedical Materials Research* **55**: 387-395.

El-Ghannam, A. & Ning, C.Q. (2006) Effect of bioactive ceramic dissolution on the mechanism of bone mineralization and guided tissue growth in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* **76**: 386-397.

El-Ghannam, A., Ning, C.Q. & Mehta, J. (2004b) Cyclosilicate nanocomposite: a novel resorbable bioactive tissue engineering scaffold

for BMP and bone-marrow cell delivery. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* **71**: 377-390.

El-Ghannam, A.R. (2004) Advanced bioceramic composite for bone tissue engineering: design principles and structure-bioactivity relationship. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* **69**: 490-501.

Elias, J., Tang, W. & Howitz, M. (1995) Cytokine and hormonal stimulation of human osteosarcoma cytokine-11 production. *Endocrinology* **136**: 489-498.

Ellingsen, J.E., Thomsen, P. & Lyngstadaas, S.P. (2006) Advances in dental implant materials and tissue regeneration. *Periodontology 2000* **41**: 136-156.

Elshahat, A., Shermak, M.A., Inoue, N., Chao, E.Y. & Manson, P. (2004) The use of Novabone and Norian in cranioplasty: a comparative study. *Journal of Craniofacial Surgery* **15**: 483-489.

Eriksen, E., Axelrod, D. & Melsen, F. (1994) Bone histology and bone histomorphometry. En: E. Eriksen, D. Axelrod & F. Melsen, eds. *Bone Histomorphometry*, 33-48. New York: Raven Press.

Evans, G.H., Mendez, A.J. & Caudill, R.F. (1996) Loaded and nonloaded titanium versus hydroxyapatite-coated threaded implants in the canine mandible. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **11**: 360-371.



Faucheux, N., Schweiss, R., Lutzow, K., Werner, C. & Groth, T. (2004) Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. *Biomaterials* **25**: 2721-2730.

Fernández-Barbero, J.E., Galindo-Moreno, P., Ávila-Ortiz, G., Caba, O., Sánchez-Fernández, E. & Wang, H.L. (2006) Flow cytometric and morphological characterization of platelet-rich plasma gel. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 687-693.

Ferrigno, N., Laureti, M., Fanali, S. & Grippaudo, G. (2002) A long-term follow-up study of non-submerged ITI implant in the treatment of totally edentulous jaws. Part I: Ten-year life table analysis of a prospective multicenter study with 1286 implants. *Clinical Oral Implants Research* **13**: 260-273.

Franchi, M., Bacchelli, B., Giavaresi, G., De Pasquale, V., Martini, D., Fini, M., Giardino, R. & Ruggeri, A. (2007) Influence of different implant surfaces on peri-implant osteogenesis: histomorphometric analysis in sheep. *Journal of Periodontology* **78**: 879-888.

Frenkel, S.R., Simon, J., Alexander, H., Dennis, M. & Ricci, J.L. (2002) Osseointegration on metallic implant surfaces: effects of microgeometry and growth factor treatment. *Journal of Biomedical Materials Research* **63**: 706-713.

Gadelmawla, E.S., Koura, M.M., Maksoud, T.M.A., Elewa, I.M. & Soliman, H.H. (2002) Roughness parameters. *Journal of Materials Processing Technology* **123**: 133-145.

Galindo-Moreno, P., Avila, G., Fernandez-Barbero, J.E., Aguilar, M., Sanchez-Fernandez, E., Cutando, A. & Wang, H.L. (2007) Evaluation of sinus floor elevation using a composite bone graft mixture. *Clinical Oral Implants Research* **18**: 376-382.

Galindo-Moreno, P., Avila, G., Fernandez-Barbero, J.E., Mesa, F., O'Valle-Ravassa, F. & Wang, H.L. (2008) Clinical and histologic comparison of two different composite grafts for sinus augmentation: a pilot clinical trial. *Clinical Oral Implants Research* **19**: 755-759.

Gao, T., Aro, H.T., Ylanen, H. & Vuorio, E. (2001) Silica-based bioactive glasses modulate expression of bone morphogenetic protein-2 mRNA in Saos-2 osteoblasts in vitro. *Biomaterials* **22**: 1475-1483.

Gapski, R., Wang, H.L., Mascarenhas, P. & Lang, N.P. (2003) Critical review of immediate implant loading. *Clinical Oral Implants Research* **14**: 515-527.

Gatti, R., Orlandini, G., Uggeri, J., Belletti, S., Galli, C., Raspanti, M., Scandroglio, R. & Guizzardi, S. (2008) Analysis of living cells grown on different titanium surfaces by time-lapse confocal microscopy. *Micron* **39**: 137-143.

Golec, T.S. & Krauser, J.T. (1992) Long-term retrospective studies on hydroxyapatite coated endosteal and subperiosteal implants. *Dental Clinics of North America* **36**: 39-65.

Gonzalez Macias, J. & Serrano Figueras, S. (1995) Enfermedades óseas. En: P. Farreras, ed. *Medicina Interna*. Decimotercera edición edition, 1064-1089. Madrid: Mosby-Doyma.

Gosain, A.K. (2004) Bioactive glass for bone replacement in craniomaxillofacial reconstruction. *Plastic and Reconstructive Surgery* **114**: 590-593.

Govindaraj, S., Costantino, P.D. & Friedman, C.D. (1999) Current use of bone substitutes in maxillofacial surgery. *Facial Plastic Surgery: FPS* **15**: 73-81.

Guo, J., Padilla, R.J., Ambrose, W., De Kok, I.J. & Cooper, L.F. (2007) The effect of hydrofluoric acid treatment of TiO<sub>2</sub> grit blasted titanium implants on adherent osteoblast gene expression in vitro and in vivo. *Biomaterials* **28**: 5418-5425.

Gupta, G., Kirakodu, S. & El-Ghannam, A. (2007) Dissolution kinetics of a Si-rich nanocomposite and its effect on osteoblast gene expression. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* **80**: 486-496.

Gurley, A. & Roth, S. (1992) Bone. En: S. Sternberg, ed. *Histology for pathologists*, 61-80. New York: Raven Press.

Hamilton, D.W. & Brunette, D.M. (2007) The effect of substratum topography on osteoblast adhesion mediated signal transduction and phosphorylation. *Biomaterials* **28**: 1806-1819.

Hamilton, D.W., Chehroudi, B. & Brunette, D.M. (2007) Comparative response of epithelial cells and osteoblasts to microfabricated tapered pit topographies in vitro and in vivo. *Biomaterials* **28**: 2281-2293.

Hart, A., Gadegaard, N., Wilkinson, C.D., Oreffo, R.O. & Dalby, M.J. (2007) Osteoprogenitor response to low-adhesion nanotopographies originally fabricated by electron beam lithography. *Journal of Material Science. Materials in Medicine* **18**: 1211-1218.

Healy, K.E., Thomas, C.H., Rezania, A., Kim, J.E., McKeown, P.J., Lom, B. & Hockberger, P.E. (1996) Kinetics of bone cell organization and mineralization on materials with patterned surface chemistry. *Biomaterials* **17**: 195-208.

Hench, L., Splinter, R., Greenlee, T. & Allen, W. (1971) Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *Journal of Biomedical Engineering* **2**: 117-141.

Hench, L.L. & Wilson, J. (1984) Surface-active biomaterials. *Science* **226**: 630-636.

Hench, L.L. & Wilson, J. (1986) Biocompatibility of silicates for medical use. *Ciba Foundation Symposium* **121**: 231-246.

Hisbergues, M., Vendeville, S. & Vendeville, P. (2009) Zirconia: Established facts and perspectives for a biomaterial in dental implantology. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* **88**: 519-529.

Huang, H.H., Ho, C.T., Lee, T.H., Lee, T.L., Liao, K.K. & Chen, F.L. (2004) Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion. *Biomolecular Engineering* **21**: 93-97.

Ismail, F.S., Rohanizadeh, R., Atwa, S., Mason, R.S., Ruys, A.J., Martin, P.J. & Bendavid, A. (2007) The influence of surface chemistry and topography on the contact guidance of MG63 osteoblast cells. *Journal of Material Science. Materials in Medicine* **18**: 705-714.

Jell, G. & Stevens, M.M. (2006) Gene activation by bioactive glasses. *Journal of Material Science. Materials in Medicine* **17**: 997-1002.

Jilka, R.L. (1998) Cytokines, bone remodeling and estrogen deficiency: A 1998 update. *Bone* **23**: 75-81.

Johansson, C.B. & Albrektsson, T. (1991) A removal torque and histomorphometric study of commercially pure niobium and titanium implants in rabbit bone. *Clinical Oral Implants Research* **2**: 24-29.

Jones, F.H. (2001) Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials. *Surface Science Reports* **42**: 75-205.

Jones, S. & Boyde, A. (1976) Experimental study of changes in osteoblastic shape induced by calcitonin and parathyroid extract in an organ culture system. *Cell and Tissue Research* **169**: 449-465.

Kato, H., Nakamura, T., Nishiguchi, S., Matsusue, Y., Kobayashi, M., Miyazaki, T., Kim, H.M. & Kokubo, T. (2000) Bonding of alkali- and heat-treated tantalum implants to bone. *Journal of Biomedical Materials Research* **53**: 28-35.

Keselowsky, B.G., Collard, D.M. & Garcia, A.J. (2003) Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* **66**: 247-259.

Keselowsky, B.G., Collard, D.M. & Garcia, A.J. (2004) Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. *Biomaterials* **25**: 5947-5954.

Kieswetter, K., Schwartz, Z., Dean, D.D. & Boyan, B.D. (1996a) The role of implant surface characteristics in the healing of bone. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **7**: 329-345.

Kieswetter, K., Schwartz, Z., Hummert, T.W., Cochran, D.L., Simpson, J., Dean, D.D. & Boyan, B.D. (1996b) Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. *Journal of Biomedical Materials Research* **32**: 55-63.

Kilpadi, D.V. & Lemons, J.E. (1994) Surface energy characterization of unalloyed titanium implants. *Journal of Biomedical Materials Research* **28**: 1419-1425.

Kim, H.M., Kokubo, T., Fujibayashi, S., Nishiguchi, S. & Nakamura, T. (2000) Bioactive macroporous titanium surface layer on titanium substrate. *Journal of Biomedical Materials Research* **52**: 553-557.

Kim, K.H. & Ramaswamy, N. (2009) Electrochemical surface modification of titanium in dentistry. *Dental Materials Journal* **28**: 20-36.

Kim, M.S., Shin, Y.N., Cho, M.H., Kim, S.H., Kim, S.K., Cho, Y.H., Khang, G., Lee, I.W. & Lee, H.B. (2007) Adhesion behavior of human bone marrow stromal cells on differentially wettable polymer surfaces. *Tissue Engineering* **13**: 2095-2103.

Kunzler, T.P., Drobek, T., Schuler, M. & Spencer, N.D. (2007a) Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients. *Biomaterials* **28**: 2175-2182.

Kunzler, T.P., Huwiler, C., Drobek, T., Voros, J. & Spencer, N.D. (2007b) Systematic study of osteoblast response to nanotopography by means of nanoparticle-density gradients. *Biomaterials* **28**: 5000-5006.

Lauer, G., Wiedmann-Al-Ahmad, M., Otten, J.E., Hubner, U., Schmelzeisen, R. & Schilli, W. (2001) The titanium surface texture effects adherence and growth of human gingival keratinocytes and human maxillar osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* **22**: 2799-2809.

Lausmaa, J. (2001) Mechanical, Thermal, Chemical and Electrochemical Surface Treatment of Titanium. En: D. M. Brunette, P. Tengvall, M. Textor & P. Thomsen, eds. *Titanium in Medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications*, 231-266. Berlin: Springer Verlag.

Lazzara, R., Testori, T., Trisi, P., Porter, S. & Weinstein, R. (1999) A human histologic analysis of Osseotite (R) and machined surfaces using implants with 2 opposing surfaces. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **19**: 117-129.

Lee, J.H., Khang, G., Lee, J.W. & Lee, H.B. (1998) Interaction of Different Types of Cells on Polymer Surfaces with Wettability Gradient. *Journal of Colloid and Interface Science* **205**: 323-330.

Lewandowska, K., Balachander, N., Sukenik, C.N. & Culp, L.A. (1989) Modulation of fibronectin adhesive functions for fibroblasts and neural cells by chemically derivatized substrata. *Journal of Cellular Physiology* **141**: 334-345.

Li, P. & Zhang, F. (1990) The electrochemistry of a glass surface and its application to bioactive glass in solution. *Journal of Non-Crystalline Solids* **119**: 112-118.

Lian, J. & Stein, G. (1992) Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **3**: 269-305.

Linez-Bataillon, P., Monchau, F., Bigerelle, M. & Hildebrand, H.F. (2002) In vitro MC3T3 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates. *Biomolecular Engineering* **19**: 133-141.

Lohmann, C.H., Tandy, E.M., Sylvia, V.L., Hell-Vocke, A.K., Cochran, D.L., Dean, D.D., Boyan, B.D. & Schwartz, Z. (2002) Response of normal female human osteoblasts (NHOst) to 17beta-estradiol is modulated by implant surface morphology. *Journal of Biomedical Materials Research* **62**: 204-213.

Mannelquist, A., Almqvist, N. & Fredriksson, S. (1998) Influence of tip geometry on fractal analysis of atomic force microscopy images. *Applied Physics A: Materials Science & Processing* **66**: S891-S895.



Manolagas, S. & Jilka, R. (1995) Bone marrow, cytokines, and bone remodelling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *The New England Journal of Medicine* **332**: 305-311.

Mendonca, G., Mendonca, D.B., Aragao, F.J. & Cooper, L.F. (2008) Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography. *Biomaterials* **29**: 3822-3835.

Meretoja, V.V., De Ruijter, A.E., Peltola, T.O., Jansen, J.A. & Narhi, T.O. (2005) Osteoblast differentiation with titania and titania-silica-coated titanium fiber meshes. *Tissue Engineering* **11**: 1489-1497.

Meretoja, V.V., Tirri, T., Aaritalo, V., Walboomers, X.F., Jansen, J.A. & Narhi, T.O. (2007) Titania and titania-silica coatings for titanium: comparison of ectopic bone formation within cell-seeded scaffolds. *Tissue Engineering* **13**: 855-863.

Mundy, G. (1993) Bone resorbing cells. En: M. Favus, ed. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, 25-32. New York: Raven Press.

Mustafa, K., Wennerberg, A., Wroblewski, J., Hultenby, K., Lopez, B.S. & Arvidson, K. (2001) Determining optimal surface roughness of TiO<sub>2</sub> blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clinical Oral Implants Research* **12**: 515-525.

Mwenifumbo, S., Li, M., Chen, J., Beye, A. & Soboyejo, W. (2007) Cell/surface interactions on laser micro-textured titanium-coated silicon surfaces. *Journal of Material Science. Materials in Medicine* **18**: 9-23.

Nečas, D. & Klapetek, P. *Gwyddion - SPM data analysis softwares*. Czech Metrology Institute. Disponible en <<http://gwyddion.net/>>.

Nedir, R., Bischof, M., Briaux, J.M., Beyer, S., Szmukler-Moncler, S. & Bernard, J.P. (2004) A 7-year life table analysis from a prospective study on ITI implants with special emphasis on the use of short implants. Results from a private practice. *Clinical Oral Implants Research* **15**: 150-157.

Ning, C.Q., Mehta, J. & El-Ghannam, A. (2005) Effects of silica on the bioactivity of calcium phosphate composites in vitro. *Journal of Material Science. Materials in Medicine* **16**: 355-360.

Norde, W. (1986) Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. *Advances in Colloid and Interface Science* **25**: 267-340.

Oh, S.H., Finones, R.R., Daraio, C., Chen, L.H. & Jin, S. (2005) Growth of nano-scale hydroxyapatite using chemically treated titanium oxide nanotubes. *Biomaterials* **26**: 4938-4943.

Oliva, E. (2004) CD10 expression in the female genital tract: does it have useful diagnostic applications? *Advances in Anatomic Pathology* **11**: 310-315.

Ortega-Vinuesa, J.L., Tengvall, P. & Lundstrom, I. (1998) Aggregation of HSA, IgG, and Fibrinogen on Methylated Silicon Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **207**: 228-239.

Owen, T., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L., Wilming, M., Tassinari, M., Kennedy, M., Pockwinse, S., Lian, J. & Stein, G. (1990)

Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *Journal of Cellular Physiology* **143**: 420-430.

Parfitt, A. (1994) Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *Journal of Cellular Biochemistry* **55**: 273-286.

Park, G.E. & Webster, T.J. (2005) A review of nanotechnology for the development of better orthopedic implants. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **1**: 18-29.

Peterson, L.J., McKinney Jr, R.V. & Pennel, B.M. (1980) Clinical, radiographic, and histological evaluation of porous rooted cobalt-chromium alloy dental implants. *Journal of Dental Research* **59**: 99-108.

Pfeilschifter, J., Laukhuf, F., Müller-Beckman, B., Blum, W., Pfister, T. & Ziegler, R. (1995) Parathyroid hormone increases the concentration of insuline-like growth factor I and transforming growth factor beta 1 in rat bone. *Journal of Clinical Investigation* **96**: 767-774.

Piattelli, A., Ruggeri, A., Franchi, M., Romasco, N. & Trisi, P. (1993) An histologic and histomorphometric study of bone reactions to unloaded and loaded non-submerged single implants in monkeys: a pilot study. *Journal of Oral Implantology* **19**: 314-320.

Price, R.L., Ellison, K., Haberstroh, K.M. & Webster, T.J. (2004) Nanometer surface roughness increases select osteoblast adhesion on

carbon nanofiber compacts. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* **70**: 129-138.

Price, R.L., Gutwein, L.G., Kaledin, L., Tepper, F. & Webster, T.J. (2003) Osteoblast function on nanophase alumina materials: Influence of chemistry, phase, and topography. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* **67**: 1284-1293.

Puzas, J. (1993) The osteoblast. En: M. Favus, ed. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, 15-20. New York: Raven Press.

Rico, P., Rodriguez Hernandez, J.C., Moratal, D., Altankov, G., Monleon Pradas, M. & Salmeron, M. (2009) Substrate-induced assembly of fibronectin into networks. Influence of surface chemistry and effect on osteoblast adhesion. *Tissue Engineering. Part A* **15**: 3271-3281.

Rodrigues, S.N., Goncalves, I.C., Martins, M.C., Barbosa, M.A. & Ratner, B.D. (2006) Fibrinogen adsorption, platelet adhesion and activation on mixed hydroxyl-/methyl-terminated self-assembled monolayers. *Biomaterials* **27**: 5357-5367.

Rodriguez-Valverde, M.A., Cabrerizo-Vilchez, M.A., Rosales-Lopez, P., Paez-Dueñas, A. & Hidalgo-Alvarez, R. (2002) Contact angle measurements on two (wood and stone) non-ideal surfaces. *Colloids and surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects* **206**: 485-495.

Salasznyk, R.M., Klees, R.F., Hughlock, M.K. & Plopper, G.E. (2004a) ERK signaling pathways regulate the osteogenic differentiation

of human mesenchymal stem cells on collagen I and vitronectin. *Cell Communication & Adhesion* **11**: 137-153.

Salasznyk, R.M., Klees, R.F., Williams, W.A., Boskey, A. & Plopper, G.E. (2007) Focal adhesion kinase signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research* **313**: 22-37.

Salasznyk, R.M., Williams, W.A., Boskey, A., Batorsky, A. & Plopper, G.E. (2004b) Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Biomedical Biotechnology* **2004**: 24-34.

Sawase, T., Jimbo, R., Baba, K., Shibata, Y., Ikeda, T. & Atsuta, M. (2008) Photo-induced hydrophilicity enhances initial cell behavior and early bone apposition. *Clinical Oral Implants Research* **19**: 491-496.

Schwarz, F., Ferrari, D., Hertel, M., Mihatovic, I., Wieland, M., Sager, M. & Becker, J. (2007) Effects of Surface Hydrophilicity and Microtopography on Early Stages of Soft and Hard Tissue Integration at Non-Submerged Titanium Implants: An Immunohistochemical Study in Dogs. *Journal of Periodontology* **78**: 2171-2184.

Schwarz, F., Wieland, M., Schwartz, Z., Zhao, G., Rupp, F., Geis-Gerstorfer, J., Schedle, A., Brogini, N., Bornstein, M.M., Buser, D., Ferguson, S.J., Becker, J., Boyan, B.D. & Cochran, D.L. (2009) Potential of chemically modified hydrophilic surface characteristics to support tissue integration of titanium dental implants. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* **88**: 544-557.

Schweickl, H., Muller, R., Englert, C., Hiller, K.A., Kujat, R., Nerlich, M. & Schmalz, G. (2007) Proliferation of osteoblasts and fibroblasts on model surfaces of varying roughness and surface chemistry. *Journal of Material Science. Materials in Medicine* **18**: 1895-1905.

Scotchford, C.A., Gilmore, C.P., Cooper, E., Leggett, G.J. & Downes, S. (2002) Protein adsorption and human osteoblast-like cell attachment and growth on alkylthiol on gold self-assembled monolayers. *Journal of Biomedical Materials Research* **59**: 84-99.

Serrano, S. & Mariñoso, M. (1990) Bases histológicas de la histomorfometría ósea. En: S. Serrano, J. Aubia & M. Mariñoso, eds. *Patología ósea metabólica*, 55-70. Barcelona: Doyma.

Soboyejo, W.O., Nemetski, B., Allameh, S., Marcantonio, N., Mercer, C. & Ricci, J. (2002) Interactions between MC3T3-E1 cells and textured Ti6Al4V surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research* **62**: 56-72.

Soumetz, F.C., Pastorino, L. & Ruggiero, C. (2008) Human osteoblast-like cells response to nanofunctionalized surfaces for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* **84**: 249-255.

Stein, G. & Lian, J. (1992) Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrine Reviews* **14**: 424-442.

Stevens, B., Yang, Y., Mohandas, A., Stucker, B. & Nguyen, K.T. (2008) A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* **85**: 573-582.

Tamada, Y. & Ikada, Y. (1994) Fibroblast growth on polymer surfaces and biosynthesis of collagen. *Journal of Biomedical Materials Research* **28**: 783-789.

Termine, J. (1993) Bone matrix proteins and mineralization process. En: M. Favus, ed. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Second Edition, 21-24. Nueva York: Raven Press.

Testori, T., Wiseman, L., Woolfe, S. & Porter, S. (2001) A prospective multicenter clinical study of the Osseotite (R) implant: four-year interim report. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **16**: 193-200.

Thomas, C.H., McFarland, C.D., Jenkins, M.L., Rezanian, A., Steele, J.G. & Healy, K.E. (1997) The role of vitronectin in the attachment and spatial distribution of bone-derived cells on materials with patterned surface chemistry. *Journal of Biomedical Materials Research* **37**: 81-93.

Thomas, K. & Cook, S.D. (1985) An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. *Journal of Biomedical Materials Research* **19**: 875-901.

Torres García-Denche, J. (2006) Influencia del Plasma Rico en Plaquetas en la Regeneración Ósea: Estudio Densitométrico y

Morfométrico en calota de conejas osteoporóticas. Madrid: Universidad Rey Juan Carlos.

Tresguerres, I.F. (1999) Influencia de la Hormona del crecimiento en la Osteointegración. Madrid: Universidad Complutense.

Uchida, M., Kim, H.M., Miyaji, F., Kokubo, T. & Nakamura, T. (2002) Apatite formation on zirconium metal treated with aqueous NaOH. *Biomaterials* **23**: 313-317.

Vaahtio, M., Peltola, T., Hentunen, T., Ylanen, H., Areva, S., Wolke, J. & Salonen, J.I. (2006) The properties of biomimetically processed calcium phosphate on bioactive ceramics and their response on bone cells. *Journal of Material Science. Materials in Medicine* **17**: 1113-1125.

Valerio, P., Pereira, M.M., Goes, A.M. & Leite, M.F. (2004) The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials* **25**: 2941-2948.

Valimaki, V.V. & Aro, H.T. (2006) Molecular basis for action of bioactive glasses as bone graft substitute. *Scandinavian Journal of Surgery: SJS* **95**: 95-102.

Vallet-Regi, M., Salinas, A.J. & Arcos, D. (2006) From the bioactive glasses to the star gels. *Journal of Material Science. Materials in Medicine* **17**: 1011-1017.

Van de Graaff, K.M. (1998) Human Anatomy. Boston, McGraw-Hill.



Van Put, A., Vertes, A., Wegrzynek, D., Treiger, B. & Van Grieken, R. (1994) Quantitative characterization of individual particle surfaces by fractal analysis of scanning electron microscope images. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **350**: 440-447.

Wang, X.X., Hayakawa, S., Tsuru, K. & Osaka, A. (2001) A comparative study of in vitro apatite deposition on heat-, H<sub>2</sub>O(2)-, and NaOH-treated titanium surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research* **54**: 172-178.

Watson, P., Lazowski, D., Han, V., Fraher, L., Steer, B. & Hodsmann (1995) Parathyroid hormone restores bone mass and enhances osteoblast insulin-like growth factor I gene expression in ovariectomized rats. *Bone* **16**: 357-365.

Webb, K., Hlady, V. & Tresco, P.A. (2000) Relationships among cell attachment, spreading, cytoskeletal organization, and migration rate for anchorage-dependent cells on model surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research* **49**: 362-368.

Webster, T.J., Siegel, R.W. & Bizios, R. (1999) Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Biomaterials* **20**: 1221-1227.

Weiss, S. (1995) Tumores de los Tejidos Blandos. Madrid, Elsevier España.

Wen, X., Wang, X. & Zhang, N. (2003) Microrough surface of metallic biomaterials: a literature review. *Biomedical Materials and Engineering* **6**: 173-189.

Weng, D., Hoffmeyer, M., Hürzeler, M.B. & Richter, E.J. (2003) The Osseotite(R) vs machined surface in poor bone quality. A study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* **14**: 703-708.

Wilson, C.J., Clegg, R.E., Leavesley, D.I. & Pearcy, M.J. (2005) Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Engineering* **11**: 1-18.

Zahn, W. & Zösch, A. (1997) Characterization of thin-film surfaces by fractal geometry. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **358**: 119-121.

Zambonin-Zallone, A., Teti, A. & Primavera, M.V. (1984) Resorption of vital or devitalized bone by isolated osteoclasts in vitro. The role of lining cells. *Cell and Tissue Research* **235**: 561-564.

Zhao, G., Schwartz, Z., Wieland, M., Rupp, F., Geis-Gerstorfer, J., Cochran, D.L. & Boyan, B.D. (2005) High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* **74**: 49-58.



# *PRODUCCIÓN CIENTÍFICA*

Somos lo que hacemos cada día. De modo que la excelencia no  
es un acto, sino un hábito.

Aristóteles (384-322 a. C.). Filósofo griego.



---

## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA GENERADA

Parte de los resultados generados por la Tesis Doctoral presentada han sido previamente publicados y defendidos tal y como se expone a continuación:

### 1. ABSTRACTS DE CONGRESOS

Padial-Molina M, Sánchez-Fernández E, Ramón-Torregrosa PJ, Ortega-Vinuesa JL, Fernández-Barbero JE, Galindo-Moreno P (2008). Influencia de la hidrofobicidad y la rugosidad en superficies de sílice sobre el crecimiento celular de estirpe ósea. *Libro de Congreso*; VI Congreso SECIB, Santiago de Compostela: 102.

Padial-Molina M, Ramón-Torregrosa PJ, Fernández-Barbero JE, Jódar-Reyes AB, Ortega-Vinuesa JL, and Galindo-Moreno P (2009). Osteoblast proliferation and characterization on silicon surfaces with different roughness and hydrophobicity. *Journal of Clinical Periodontology* **36 (Supplement 9)**: 77-78. ISBN: 0303-6979. Indexada en JCR: 3.193 (2ª de 55 en la Categoría Dentistry, Oral Surgery & Medicine).

Padial-Molina M, Galindo-Moreno P, Fernández-Barbero JE, Jódar-Reyes AB, Ramón-Torregrosa PJ, Ortega-Vinuesa JL, Sánchez-Fernández E (2009). Modificadores superficiales del crecimiento celular de estirpe ósea. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* **14**:e766-e767. ISBN: 1698-4447. Indexada en JCR desde 2009.

## 2. CAPÍTULOS DE LIBROS

Padial-Molina M, Galindo-Moreno P, Fernández-Barbero JE, Jódar-Reyes AB, Ramón-Torregrosa PJ, Cabrerizo-Vílchez MA, and Ortega-Vinuesa JL (2009). Roughness and Hydrophobicity on Silica Surfaces as Factors for Osteoblast Proliferation and Cell Morphology. En: Martínez-López F, de Vicente J, Martín-Rodríguez A, and Rodríguez-Valverde MA, eds. *III Reunión Ibérica de Coloides e Interfases (RICI) VIII Reunión del Grupo Especializado de Coloides e Interfases (GECI)*: 633-641. ISBN 978-84-338-5027-0.

## 3. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Padial-Molina M, Galindo-Moreno P, Fernández-Barbero JE, Jódar-Reyes AB, Ortega-Vinuesa JL, and Ramón-Torregrosa PJ. Roughness and hydrophobicity as modulation factors for osteoblast proliferation and morphology on silica surfaces. *Clinical Oral Implants Research*. En revisión. ISBN: 1600-0501. Indexada en JCR: 2.756 (6<sup>a</sup> de 55 en la Categoría Dentistry, Oral Surgery & Medicine).

# Libro del Congreso

programa definitivo - comités - actividad científica - expositiva - exposiciones - colaboraciones - resúmenes



# Santiago <sup>SECIB</sup>

23, 24 y 25 de Octubre de 2008

VI Congreso Nacional de la SECIB

Sociedad Española de Cirugía Bucal



Portugal Implantología 2008

*Gracias por haber llegado con nosotros, al final del Camino*



## Comunicación oral nº 88

**Influencia de la hidrofobicidad y la rugosidad en superficies de silice sobre el crecimiento celular de estirpe ósea****Autores**

Padial-Molina M, Sanchez-Fernandez E, Ramon-Torregrosa PJ, Ortega-Vinuesa JL, Fernandez-Barbero JE, Galindo-Moreno P.

**Centro**

Unidad Docente de Cirugía Bucal, Maxilofacial e Implantología B, Facultad de Odontología, Universidad de Granada.

**Introducción**

Como paso previo a la adhesión del hueso sobre la superficie de un material en condiciones fisiológicas es necesaria la formación de una capa biológicamente activa que contenga hidroxiapatita. Los cristales de superficie bioactiva consiguen la unión con el hueso tras la formación de una capa de fosfato cálcico por disolución, precipitación e intercambio iónico. Además estas reacciones están acompañadas de adsorción e incorporación de moléculas biológicamente activas.

**Objetivo**

Estudiar el comportamiento celular de estirpe ósea según la hidrofobicidad y la rugosidad de superficies de silice.

**Material y Métodos**

Se emplearon 32 obleas de silice con modificaciones en su topografía o hidrofobicidad sobre las que se cultivaron células de estirpe ósea de la línea MG-63. Estos cultivos fueron caracterizados mediante SEM y se realizaron contajes celulares en cámara de Neubauer.

**Resultados**

Se observó una mayor proliferación celular sobre las obleas más hidrófobas. Además, al aumentar la rugosidad o la hidrofobicidad, el cultivo era más confluyente y las células presentes en él mostraban un mayor número de prolongaciones citoplasmáticas y de mayor longitud.

**Discusión**

La configuración y magnitud de las rugosidades de una superficie idónea que favorezcan la mayor adhesión, proliferación y diferenciación osteoblástica, así como la modificación de otras propiedades físico-químicas de superficie como la hidrofobicidad, han sido ya descritas aunque sin conclusiones firmes en uno u otro sentido. En nuestro caso, la rugosidad a escala nanométrica influye en menor medida que las modificaciones hidrofóbicas sobre las características del cultivo celular. La modificación de la hidrofobicidad de una superficie influye en la conformación de las proteínas adsorbidas sobre la misma, lo que determina los procesos adhesivos celulares y las características del desarrollo celular sobre la superficie del material. El mayor número de prolongaciones citoplasmáticas observadas en las superficies más hidrófobas indican una mayor interacción de las proteínas adhesivas sobre la superficie.

**Conclusiones**

La hidrofobización de la superficie del silice mediante la adición de grupos CH<sub>3</sub> terminales influye de forma más decisiva en el comportamiento de las células cultivadas sobre dichas superficies que la modificación topográfica a escala nanométrica.



UGR Universidad  
de Granada



UGR Universidad  
de Granada



# *Journal of* Clinical Periodontology

VOLUME 36 • SUPPLEMENT 9 • JUNE 2009

Official Journal of The European  
Federation of Periodontology



Founded by the British, Dutch, French, German,  
Scandinavian, and Swiss Societies of Periodontology

*Editor*

**Maurizio Tonetti**

Europerio 6  
Stockholm, Sweden  
4–6 June 2009

*Guest Editor*  
Stefan Renvert

Available online at: [interscience.wiley.com/journal/jcpe](http://interscience.wiley.com/journal/jcpe)

 **WILEY-BLACKWELL**

4 and 7 day ( $P < 0.01$ ). Expression of ALP mRNA was also similar in all groups. The highest expression of osteopontin mRNA was observed in the group cultured with ABM/P-15, followed by those with ABM/T-CAM and ABM. A halo of red stain is wider and denser around ABM/T-CAM and ABM/P-15 particle than around ABM particle. In vivo study, ABM/T-CAM seemed to have similar bone forming bioactivity comparing with ABM/P-15. In conclusion, ABM/T-CAM, which seemed to have similar bone forming activity compared with ABM/P-15, was considered to serve as effective tissue-engineered bone graft material.

140

Ref no: EUABS065690

### Anatase surface modification of titanium implants offers clinical potential

F. RUPP\*, L. SCHEIDLER, M. HAUPT, E. DECKER, M. EICHLER, C. DEHR, C. VON OHLE, S. SINN, H. -P. WENDEL AND J. GEIS-GERSTORFER

Univ. Tübingen, Fraunh. Inst, Stuttgart, Germany

**Introduction:** The anatase-modification of titaniumdioxide allows photoswitching of coated titanium implants from hydrophobic to very hydrophilic. Furthermore, the photocatalytic activity of anatase offers the potential for biofilm degradation. We investigated reaction kinetics for photoswitching and photodegradation of a model protein to develop irradiation regimes for potential clinical applications.

**Methods:** Photoswitching was analyzed by contact angle measurements, photocatalysis by quartz crystal microbalance QCM-D. UV light (382 nm, 25 mW/cm<sup>2</sup>) was generated by UVACube 100. HSA was adsorbed to the anatase surface by incubation with 1 mg HSA/ml PBS (pH 7) for 90 minutes.

**Results:** Contact angle analysis confirmed anatase photoswitching from  $\theta = 56^\circ$  to superhydrophilicity  $< 5^\circ$  by 2.2 J/cm<sup>2</sup> UV. After 3 h storage in darkness, contact angles increased from superhydrophilicity to  $\theta = 10^\circ$  and after 12 hour to  $\theta = 30^\circ$ , indicating clinically relevant long-lasting hydrophilization. Rehydrophobization was caused by carbon contaminations, as shown by ESCA. QCM-D demonstrated photocatalytic degradation of protein layers. HSA adsorbed to anatase (adsorbed mass 960 ng/cm<sup>2</sup>) was completely decomposed by 3 UV-pulses of 4.5 J/cm<sup>2</sup>, resp.

**Conclusion:** The results encourage the clinical application of anatase coatings for i) chairside activation of implant surfaces by UV-hydrophilization immediately before implantation and ii) photocatalytic degradation of contaminations and biofilms *in situ*.

141

Ref no: EUABS064992

### Ridge augmentation of atrophic posterior mandible with inlay bone grafts: autologous iliac versus bovine anorganic bone: a histological analysis

P. FELICE\*, V. CHECCHI AND A. G. BONETTI

Univ. Bologna & Chieti, Italy; Univ. Manchester, UK

**Objectives:** To compare histological results after inlay grafting procedures performed bilaterally in posterior atrophic mandibles for implant-borne prosthetic rehabilitation, using autologous iliac bone block and inorganic bovine bone block (Bio-Oss®).

**Materials and methods:** Ten partially edentulous patients with mandibular vertical deficit posteriorly to the mental foramen (range of residual bone height: 5–7 mm) underwent bilateral inlay bone grafting procedures with the use of autologous bone block (iliac crest) on one side and inorganic bovine bone block (Bio-Oss) contralaterally. The block-grafts were fitted between the coronal transport fragment and the basal bone and covered with

a resorbable membrane. Four months later, at time of implant insertion; a bone specimen was taken for histological evaluation on both sides.

**Results:** Histological analysis revealed for both sides that grafted bone was lined by newly-formed bone with no gaps at the interface. Wide osteocyte lacunae were observed proximal and distal to the interface. No chronic inflammatory cell infiltrate or multinucleated giant cells and foreign body reaction cells were present around the graft or at the bone interface. Many osteoblasts were observed in the process of depositing osteoid matrix.

**Conclusions:** The use of inorganic bovine bone block in inlay technique is comparable to autogenous grafts and allows overcoming the risks and morbidity related to iliac bone harvesting.

142

Ref no: EUABS065009

### Neoangiogenesis quantification, bone formation, and clinics parameters influence in composite grafts biopsies from maxillary sinus augmentation

P. GALINDO-MORENO\*, M. PADIAL-MOLINA AND G. AVILA

Univ. of Granada, Spain; Univ. of Michigan, USA

Our aim was to evaluate vessels microdensity, bone formation and their relation with clinical characteristics and patient habits. 45 sinus elevations with delayed implant placement were performed in 25 consecutive patients. A composite bone graft consisting in 1:1 autologous cortical bone and anorganic bovine bone was used in all cases. Cores biopsies were obtained to histologic, histomorphometric and immunohistochemistry analysis 6 months later. 10 control biopsies were taken from posterior maxillary pristine bone. Biopsies from sinus augmentation presented significant remodeling activities in comparison with pristine bone with significant increase of osteoid lines. Histomorphometry revealed 43.81 ± 17.1% vital bone, 40.22 ± 16.5% connective tissue and 41.55 ± 27.7 remaining ABB particles. Vascular formation was analyzed in the three different tisular compartments. Immunohistochemistry showed 99.53 ± 61.92 positive CD34 vessels per mm<sup>2</sup> in graft tissue and 31.52 ± 13.69 per mm<sup>2</sup> in native tissue with statistical significance ( $P = 0.001$  Student t test). Greater connective tissue was found in relation with vessels microdensity in graft ( $r = 0.482$ ,  $P = 0.0001$ , Pearson test). Angiogenesis and revascularization processes in relation with this composite bone graft indicate that this material can be considered an ideal composite graft that can be modulated by clinical parameters and habits such as periodontal diseases, edentulism, tobacco or alcohol consuming.

143

Ref no: EUABS065010

### Osteoblast proliferation and characterization on silicon surfaces with different roughness and hydrophobicity

M. PADIAL-MOLINA\*, P. GALINDO-MORENO AND J. L. ORTEGA

University of Granada, Spain

Cell adhesion to artificial materials and its proliferation and differentiation are governed by surface properties such as wettability, roughness, surface charge, chemical functionalities, and cells. Moreover, biomaterial surfaces usually possess a high degree of interfacial heterogeneity. Our aim was to analyze osteoblasts morphology and their proliferation on silica surfaces regarding on roughness and hydrophobic degrees. To avoid ambiguous influences that may cause the presence of multiple properties, different roughnesses were created by chemical etching in caustic solutions, while hydrophilic surface was turned into hydrophobic



by methylation of oxidized silicon surfaces. Two simple functional groups (-OH and -CH<sub>3</sub>) are responsible of initial cell adhesion in our study. ADSA and AFM measurements confirmed different roughness and wettability on each samples group. Lineal correlation between hydrophobicity and osteoblasts proliferation was observed. SEM characterization of cell cultures showed higher spreading, proliferation and dendritic extensions on hydrophobic surfaces. Our results also support that cell morphology on roughest silicon surfaces demonstrates a cuboidal shape with dendritic extensions, according to a more differentiated osteoblast. It can be concluded that nanometer roughness may play an important role on cell response but less important than hydrophobicity by means of CH<sub>3</sub> terminal groups addition to silicon surfaces.

144

Ref no: EUABS064967

**Bacterial response to different Cp-Ti surfaces**

A. RODRÍGUEZ\*, E. ENGEL, A. JUÁREZ AND F. J. GIL

1. IBEC, UPC, UB, Spain

Good osteointegration and the preservation of supportive tissues play an important role for the success of these treatments. A localized inflammation and persistent infections might conduct the failure of these devices due to lack of soft/hard tissue-implant surface interaction. The inflammation is usually associated with bacteria colonization on the prosthetic surface or immunology reaction due to release of cp-Ti particles into gingival tissue. In this preliminary work we evaluate the cp-Ti surface-bacteria interaction. The quantification of bacteria attachment was done with two normal inhabitants of the mouth: *S. sanguinis* (CECT 480) and *L. salivarius* (CECT 4063). Cp-Ti discs were incubated with bacteria broth. New bacteria suspension was seeded on solid medium (MRS for *L. salivarius* and Todd-Hewitt for *S. sanguinis*), incubated for 48 hours at 37°C and finally the number of colonies was counted. At the same time the pH variations during bacteria growth phase was measured. This study has demonstrated the influence of roughness and particles chemistry on initial bacteria attachment. The results support our hypothesis that the best implant surface must have roughness of 2–4 µm (Ra). Rough Ti-surfaces obtained with Al-particles show the best bacteria response, favoring the adhesion of soft tissue onto implant surface. In addition, bacteria metabolism causes Ti-particle release, which might be associated with initial inflammation of the peri-implantitis.

145

Ref no: EUABS064968

**Influence of the surface treatment for titanium dental implant in bone attachment using mechanical and histological tests**

A. PADRÓS, N. MANZANARES, C. APARICIO, A. BADET AND F. J. GIL\*

UPC, Barcelona, Spain

The aim of this work was to study the effect of surface treatment on bone attachment of cylinder-shape titanium implants. The implants studied were acid-etching, blasted with Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles of 450–600 nm, and blasted with thermo-chemical treatment in order to achieve apatite coating on the roughness of the dental implants. One group had no further surface treatment (as-received –machined-). The surface topography of the implant

specimens was examined by Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) and by confocal laser scanner for a numeric evaluation of S<sub>a</sub>, S<sub>i</sub> and S<sub>dr</sub>. The implants were placed into the mandibular bone of 6 minipigs. After 4 and 6 weeks healing, the attachments of bone to implants were examined using a tensile test analysis. The results support observations from histological studies realised in dental implants with the different surface treatments. The optimal surface at 4 weeks was the bioactive cylinders (Blasted + thermo-chemical treatment) and for 6 weeks the blasted surface reached at the bioactive implants. The bone attachment values lowest were the acid-etched and the control implants. Retention values of the different types of implants.

146

Ref no: EUABS064958

**Proliferation and expression of angiogenesis gene of HUVECs in response to different titanium surfaces**Y. ZHANG\*<sup>1</sup>, N. AN<sup>1</sup>, A. SCHEDLE<sup>2</sup> AND X. RAUSCH-FAN<sup>2</sup><sup>1</sup>Peking Univ., CHN, <sup>2</sup>Medical Univ. Vienna, Austria

**Aims:** To investigate the influence of titanium (Ti) surfaces with different smoothness and wettability on the proliferation and angiogenesis-related gene expression of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).

**Materials and methods:** Four kinds of commercial pure titanium surface were used in this study: polished (P) surfaces, pickled (PT) surfaces, hydrophilic modified polished (modP) surfaces and hydrophilic modified pickled (modPT) surfaces. The proliferation of HUVECs grown on different surfaces was measured with the cell counting kit-8 (CCK-8) assay. Gene expression of von Willebrand factor (vWF), thrombomodulin (TM), endothelial-cell-protein-C-receptor (EPCR), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (E-selectin) were detected by real-time PCR.

**Results:** The proliferation of HUVECs was highest on PT surfaces, followed by P surfaces, and lowest on modP and modPT surfaces. The gene of angiogenesis related cytokines were highly expressed on PT surfaces in comparing to modPT surfaces.

**Conclusion:** The present study demonstrates that the hydrophilic property of Ti surfaces with either high or low smooth degree might inhibit the proliferation of HUVECs and down-regulate its gene expression of functional cytokines *in vitro*.

147

Ref no: EUABS064781

**Evaluation of the long-term results of rat cranial bone repair using a particular xenograft**

H. DEVELIOGLU\*, S. SARAYDIN, U. KARTAL AND L. TANER

Cumhuriyet Univ, Dep. Perodontology, Sivas, Turkey

The aim of present study was to detect the effects of a xenograft (Unilab Surgibone) on bone-building in experimentally-created parietal bone defects in rats. Standardized parietal bone defects were created in 16 rats and in each of them had a circular morphology, 6 mm in diameter. The right defect sites were filled with porous particle material and the left site was used as control. After 3rd, 6th and 12th months, rats were sacrificed and tissue samples obtained from related site of the cranium. Subsequently, histological sections were taken and stained with different stains for evaluation under light microscope. The rate of bone formation was assessed using a semi-quantitative method. The results have shown that dense collagenous tissue was observed in the control area during the third month, whereas xenograft particles



# Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal

INCLUIDA EN  
SCI - JCR

**Organo Oficial / Official publication:**

- Sociedad Española de Medicina Oral
- Sociedad Española de Odontostomatología para el Mimaxibido y Pacientes Especiales
- Sociedad Española de Cirugía Bucal
- Academia Iberoamericana de Patología y Medicina Bucal
- Sociedad Española de Gerodontología

**INDEXADA / INDEXED**

SCIENCE CITATION INDEX EXPANDED, JOURNAL CITATION REPORTS,  
INDEX MEDICUS / MEDLINE/ PubMed, EMBASE (Excerpta Medica -The Netherlands), SCOPUS,  
INDICE MÉDICO ESPAÑOL



**VII** CONGRESO  
NACIONAL  
17, 18 y 19  
SEPTIEMBRE

**SECIB 2009**

Resolución de Reconocimiento de Méritos Científico-Sanitario de la Dirección General de Asistencia, Investigación y Gestión del Conocimiento concedido en fecha 6 de julio de 2009 al VII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cirugía Bucal firmado por el Secretario General de Calidad y Modernización y en su nombre el Jefe de Servicios de Desarrollo Profesional y Formación, D<sup>a</sup> Teresa Campos García.

más estrecho (platform switching), 1,62 mm frente a 0,76 mm respectivamente a los 5 años de carga protésica.

Con respecto al cuello del implante, la pérdida ósea fue mayor para implantes con el cuello mecanizado (1,32 mm a los 3 años de carga), en comparación con los implantes con microrroscas en su cuello (0,39mm a los 3 años).

**Conclusiones:** La reabsorción ósea marginal en los implantes ha sido considerada normal e inevitable dentro de unos parámetros, pero actualmente están apareciendo técnicas que permiten minimizar esta pérdida ósea, haciendo que los antiguos criterios para el éxito de los implantes con respecto a este tema estén comenzando a modificarse.

### MIXOMA ODONTOGÉNICO EN RELACIÓN CON UN TERCER MOLAR INFERIOR INCLUIDO: A PROPÓSITO DE UN CASO Y REVISIÓN DE LA LITERATURA

*Corral Pavón Edurne, Berini Aytés Leonardo, Gay Escoda Cosme.*

**Introducción:** El Mixoma Odontogénico (MO) es un tumor odontogénico benigno que aparece en los huesos maxilares y que rara vez suele verse asociado a un diente incluido.

**Caso clínico:** Se presenta el caso de una mujer, de 13 años de edad, que acude al Centro Médico Teknon de Barcelona en Septiembre de 2008 para la extracción del germen del tercer molar inferior izquierdo incluido, asociado a una imagen radiotransparente. Tras efectuar la exodoncia, se procede a la enucleación de la lesión quística y su posterior estudio anatomopatológico, dando como resultado "Mixoma Odontogénico". En el control a los 12 meses de la intervención quirúrgica, no se ha observado recidiva de la lesión.

**Discusión:** En la clasificación histológica internacional de los tumores odontogénicos, el MO está definido como un tumor odontogénico benigno que se origina a partir del tejido mesodérmico embrionario. Es más frecuente en pacientes de entre 10 y 50 años de edad (máximo en la 3ª década), aunque se han descrito casos de aparición de MO en individuos más jóvenes. Radiológicamente se presenta como una imagen osteolítica radiotransparente o mixta (patrón radiológico en "cuerdas de raqueta") que puede ser unilocular o multilocular, ésta última con un comportamiento clínico más agresivo. Cursa de manera asintomática en un elevado porcentaje de pacientes. Las localizaciones más frecuentes son la rama ascendente y el ángulo mandibulares, aunque también aparece en el maxilar superior (entre premolares y primer molar), en cuyo caso puede invadir el seno maxilar homolateral si la lesión adquiere un tamaño considerable. Su localización en regiones óseas que no sean el hueso alveolar maxilar superior o mandibular es extremadamente rara, a pesar de que existen casos descritos en la literatura de mixomas intraóseos extramaxilares. Normalmente, el MO no

produce reabsorción radicular de los dientes adyacentes, aunque éstos pueden presentar una movilidad aumentada o estar desplazados, pero conservando su vitalidad pulpar. Histológicamente está compuesto por células redondas y poligonales embebidas en un estroma mucoso abundante. La presencia de islotes epiteliales es posible, pero no es un criterio necesario para el diagnóstico. Las células del MO son positivas para vimentina y actina muscular específica, y negativas para desmina, proteína S-100 y citoqueratinas. Si no se efectúa el tratamiento quirúrgico el MO puede alcanzar dimensiones considerables, produciendo destrucción tisular y desfiguración del paciente debido a su comportamiento invasivo local. El tratamiento quirúrgico es el de elección, pudiendo, sin embargo, aplicarse diferentes técnicas para su eliminación. Se han descrito casos de malignización sarcomatosa de un MO, pero no es un hecho frecuente. La recurrencia se estima entre un 10 y un 30%, aunque ésta es rara si el tratamiento quirúrgico se efectúa de forma correcta.

**Conclusiones:** El MO es un tumor odontogénico benigno asintomático y de crecimiento lento, pero que puede comportarse como localmente invasivo. Es obligada la realización de un tratamiento quirúrgico que asegure la excisión completa de toda la lesión, seguido de un análisis histopatológico de la muestra para confirmar el diagnóstico de mixoma odontogénico. La tasas de recidiva son bajas si se efectúa un tratamiento correcto.

### MODIFICADORES SUPERFICIALES DEL CRECIMIENTO CELULAR DE ESTIRPE ÓSEA

*Miguel Padial-Molina, Pablo Galindo-Moreno, Juan Emilio Fernández-Barbero, Ana Belén Jódar-Reyes, Pedro J. Ramón-Torregrosa, Juan Luis Ortega-Vinuesa, Elena Sánchez-Fernández.*

**Introducción:** La comprensión de los mecanismos íntimos de adhesión y proliferación celular a una superficie así como los factores modificadores de este comportamiento es indispensable para entender las fases posteriores de reacción frente a un biomaterial. El sílice puede ser empleado como modelo mediante reacciones químicas simples para estudiar de forma aislada la influencia de la humectabilidad o la rugosidad.

**Objetivo:** Estudiar la adhesión y proliferación celular según la hidrofobicidad y la rugosidad en superficies de sílice.

**Material y Métodos:** Se realizaron modificaciones a nivel nanométrico en superficies de sílice. En otro grupo de muestras, la humectabilidad fue modificada mediante metilación superficial. Se cultivaron células de estirpe ósea de la línea MG-63 sobre dichas superficies y se realizó estudio de adhesión y proliferación.

**Resultados:** La proliferación celular sobre las obleas con mayores ángulos de contacto fue mayor, principalmente en aquellas sin modificación topográfica. Por otra parte, al aumentar la nanorugosidad o la hidrofobicidad, el cultivo se

desarrolló de forma más compacta, presentando las células un mayor número de prolongaciones citoplasmáticas y de mayor longitud.

**Conclusión:** La humectabilidad influye de forma más decisiva que la modificación topográfica a escala nanométrica en el comportamiento de las células cultivadas sobre superficies modificadas, tanto a nivel de adhesión como de proliferación.

## MODOS DE ACTUACIÓN Y VALORACIÓN EN LA COLOCACIÓN DE IMPLANTES INMEDIATOS POSTEXTRACCIÓN

*Pamies J, Garcia-Sala F, Garcia M<sup>a</sup>, Pastor M.*

**Objetivo:** Actualmente los tratamientos implantológicos convencionales intentan reducir los tiempos mediante la colocación de implantes en alveolos postextracción. El objetivo de este trabajo es conocer mediante una revisión de la literatura científica que, tras la extracción dental atraumática, es necesario tener en cuenta una serie de factores que nos marcarán cuándo es posible la colocación de implantes, con el objetivo de predecir la obtención de estabilidad primaria, osteointegración y estética; y qué casos conviene esperar la cicatrización del alveolo o regenerar.

**Materiales y Métodos:** Para esta revisión se ha realizado una búsqueda de artículos a través de la base de datos de Medline publicados entre los años 1998 y 2008. Las palabras clave utilizadas para la búsqueda fueron: immediate implant, delayed implant, bone defect, extraction socket and jumping distance. Todos los artículos han sido seleccionados dentro de las 20 revistas de más impacto según "Listing for journals on Dentistry, Oral Surgery & Medicine 2007 JCR Science Edition".

**Resultados:** Los estudios aportan unos índices de supervivencia muy altos en implantes inmediatos con o sin la utilización de membranas e injerto de hueso y con un seguimiento de 5 años. Sin embargo, existen controversias en lo que algunos aspectos se refiere, como la reabsorción de hueso tras la extracción, el espacio entre hueso e implante, la regeneración en casos de fenestración y valorar como actuar en estas situaciones.

**Conclusión:** El estudio nos demuestra que en los tratamientos con implantes inmediatos es imprescindible valorar los siguientes factores: cortical residual vestibular, jumping distance, defectos óseos (fenestraciones o dehiscencias) y estabilidad primaria.

## ODONTOMA COMPUESTO. A PROPÓSITO DE UN CASO

*Martínez Gil-Ortega A, Maceiras Pérez A, Gutiérrez Sánchez L, López-Silva M.J, Martínez-González JM.*

**Introducción:** Los odontomas se consideran los tumores odontogénicos benignos más frecuentes. Son malformaciones compuestas por estructuras duras semejantes al diente (esmalte, cemento y dentina) en proporciones variables y con distinto grado de desarrollo. La OMS clasifica a los odontomas desde el punto de vista anatomopatológico en compuestos, donde los tejidos dentarios que están representados se disponen de forma ordenada formando estructuras semejantes a los dientes llamadas dentículos, y en complejos donde los tejidos dentarios se manifiestan como una masa radiopaca bien delimitada pero desorganizada, con escasa morfodiferenciación por lo que presenta poca semejanza con los dientes.

**Caso clínico:** Paciente mujer, de 14 años que acudió al Servicio de Cirugía Bucal e Implantología del Hospital de Madrid remitida por el servicio de ortodoncia por presentar ausencia clínica del canino inferior derecho permanente. La exploración radiológica puso de manifiesto que el canino inferior derecho permanente estaba incluido y su retención estaba causada por la presencia de dos lesiones radiocondensantes de unos cinco milímetros de diámetro rodeadas por un halo radiotransparente. Se planificó la cirugía prescribiendo Diazepam 2,5mg una hora antes del inicio de la intervención. Tras realizar la extracción de las estructuras y el canino inferior derecho incluido lo remitimos para su análisis al departamento de anatomía patológica que corroboró el diagnóstico clínico e histológico de odontoma compuesto. A los tres meses realizamos una radiografía panorámica de control en la que se evidencia la rápida neoformación ósea.

## OPTIMIZACIÓN DE LA ANTIBIOTERAPIA EN CIRUGÍA DE CORDALES: NUEVA PROFILAXIS POSTOPERATORIA MEDIANTE AMOXICILINA CON Y SIN ÁCIDO CLAVULÁNICO

*Siguero Muñoz A, Moreno Osborne A, Sáenz Ramírez C, Palomino Nicas J, González Padilla JD, Torres Lagares D.*

**Introducción:** La extracción de los terceros molares retenidos es la actuación más demandada actualmente en los servicios de Cirugía Maxilofacial. Requiere de una cirugía limpia-contaminada, que conlleva una serie de secuelas postoperatorias. Es relativamente frecuente que se desarrollen complicaciones de carácter infeccioso. Entre ellas destacan la Osteítis Alveolar (20-30 % casos) y la infección de la herida quirúrgica (1-6% casos).

**Objetivos:** Demostrar clínicamente los beneficios de un protocolo de antibioterapia profiláctica, tras la cirugía de terceros molares, desarrollado a lo largo de 5 días, mediante la administración de 1000 mgr de Amoxicilina cada 12 horas. Además podremos conocer si la administración de Ácido Clavulánico ofrece algún beneficio.

**Material y Método:** Presentamos un ensayo clínico aleatorizado, prospectivo y a doble ciego. Participarán pa-





## ROUGHNESS AND HYDROPHOBICITY ON SILICA SURFACES AS FACTORS FOR OSTEOBLAST PROLIFERIZATION AND CELL MORPHOLOGY

*M. Padiá-Molina<sup>1</sup>, P. Galindo-Moreno<sup>1</sup>, J.E. Fernández-Barbero<sup>2</sup>, A.B. Jódar-Reyes<sup>3</sup>, P.J. Ramón-Torregrosa<sup>4</sup>, M.A. Cabrerizo-Vílchez<sup>4</sup>, and J.L. Ortega-Vinuesa<sup>4\*</sup>*

<sup>1</sup> *Oral Surgery Department, School of Dentistry, University of Granada, Campus de la Cartuja S/N, 18071, Granada, Spain.*

<sup>2</sup> *Human Anatomy and Embryology Department, Regenerative Biomedicine Institute (IBIMER), University of Granada, Campus de la Salud, 18071, Granada, Spain.*

<sup>3</sup> *Department of Applied Physics, University of Extremadura, Av. Universidad S/N, 10071, Cáceres, Spain.*

<sup>4</sup> *Department of Applied Physics, University of Granada, Campus de Fuentenueva S/N, 18071, Granada, Spain.*

[jlortega@ugr.es](mailto:jlortega@ugr.es)

### INTRODUCTION

In the development of biomedical devices for dental and orthopedic applications, it is crucial to gain a clear understanding of the interaction of these biomaterials with biological tissues at a cellular level. It is well known that cell adhesion to artificial materials is governed by physical and chemical surface properties of the substrate such as wettability, roughness, surface charge, chemical functionalities, as well as by the characteristics of the cells [1-3]. In addition, initial cell attachment to a material surface determines subsequent processes such as cell spreading, morphology, migration, proliferation, and differentiation [4,5]. Therefore, it is important to determine separately the role played by each surface property. With regard to surface texturing, it is known that certain roughness degrees enhance cell adhesion and integration in biomedical systems [6]. Studies related to the effect of wettability are more ambiguous, since the variety of chemical groups (-COOH, -NH<sub>2</sub>, -CF<sub>3</sub>, -PEG, ...) bound to the modified surfaces in all these studies makes it difficult to establish a clear correlation between wettability and cell adhesion due to the specific influence that may be exerted by a terminal group or some other group. In addition to the cell proliferation, both surface factors may affect to the cell morphology, and thus, it must also be studied.

With this scenario, we have focused our research on analyzing separately surface wettability and roughness on model silica surfaces. Substrates with different roughness were created by chemical etching of silica with caustic solutions, while hydrophilic silica was turned hydrophobic by methylation of oxidized silicon surfaces. In this manner, wettability was directly analyzed, since only two simple functional groups (-OH and -CH<sub>3</sub>) were responsible for the cell proliferation, avoiding the ambiguous influence that could have caused the presence of other chemical groups.

## MATERIALS AND METHODS

**Silicon Surfaces.** Single-side polished silicon wafers (p-type, 1-30  $\Omega\text{cm}$  resistivity, 525  $\mu\text{m}$  thickness) were purchased from Si-Mat® (Landsberg, Germany). Wafers were cut into 1 x 1 cm squares using a special wafer saw. These pieces were cleaned using the following protocol: they were immersed for 5 min in a boiling basic peroxide solution ( $\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}_2$  (30% v/v) :  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25% v/v), ratio 5:1:1). After being rinsed in MilliQ water, samples were again immersed for 5 min. in a boiling acidic peroxide solution ( $\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}_2$  (30% v/v) :  $\text{HCl}$  (37% v/v), ratio 6:1:1). This protocol creates an oxidized layer with external hydroxyl groups providing hydrophilic surfaces.

**Modification of surfaces.** Some hydrophilic pieces were turned hydrophobic by methylating the  $\text{SiO}_2$  groups of the surface. Different degrees of methylation were carried out to obtain a representative gamut gradient from highly hydrophilic to highly hydrophobic surfaces. Details about the hydrophobization protocol can be found elsewhere [7]. Roughness was controlled by a caustic etching process, in which the silicon pieces were immersed in a  $\text{NaOH}$  solution (0.1 M) for 0, 22, 60 or 165 min.

**Surface characterization.** Wettability was quantified by measuring the water contact angle of a sessile drop (5  $\mu\text{L}$  volume) using the ADSA method [8]. The analysis of surface roughness was performed by capturing images with an AFM (Nanoscope IV MultiMode, Digital Instruments). Different parameters were used to characterize the roughness and the texture of the surface: the *Arithmetic Average Roughness* ( $R_a$ ), which provides information on the average vertical deviation of the absolute surface values from the mean line, and the *Root Mean Squared Roughness* ( $R_q$  or  $RMS$ ), which indicates the deviation of the surface roughness respect to the  $R_a$  value. Consequently,  $R_q$  is more sensitive than  $R_a$  to large deviations from the mean line. However, for a more complete characterization of the surface roughness, two more parameters, the *roughness surface ratio* ( $r$ ), and the *fractal dimension* ( $D_f$ ), were also calculated. The “ $r$ ” parameter was defined as the ratio between the surface area computed by a simple triangulation method and the projected surface area. The *fractal dimension* of the surface gives information about its structural complexity.

**Cell proliferation.** Human MG-63 osteoblast-like cells were supplied by the Scientific Instrumentation Center of the University of Granada. Cells were cultured in Dulbecco’s modified Eagle medium (DMEM, Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma) and 1% penicillin/streptomycin at 37°C in a humidified 5%  $\text{CO}_2$ /95% air atmosphere. The silicon wafers were placed face-up in the tissue culture pools, in which the cells were added at the same density (500 cells/ml). Culture medium was exchanged every 48 h until the cells reached confluence on the plastic vessel. At 21 days after plating, the samples were washed with phosphate-buffered saline to remove non-adherent cells. Afterwards, cells were released from the surface by two sequential incubations in 0.25% trypsin in Hanks balanced salt solution containing 1 mM EDTA for 5 min at 37°C. Cell suspensions from both trypsinizations were combined and centrifuged at 500 x g for 10 min. Cell pellets were washed and resuspended in PBS. Then, the released cells were counted in a Neubauer chamber. Morphology of the adhered cells was analyzed by Scanning

Electron Microscopy (SEM) photographs taken by the Scientific Instrumentation Center of the University of Granada.

#### RESULTS AND DISCUSSION

*Cell proliferation and wettability.* Culture of osteoblast-like cells on silicon surfaces with different hydrophobicity shows a sigmoidal relation between the number of cells released from the surface and the methylation agent (DDS) concentration (Figure 1). This figure also reveals that the same type of function is found for the dependency of the water contact angle of the surface on the DDS concentration.

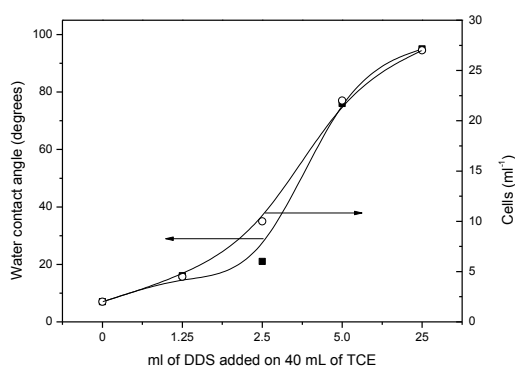


Figure 1. Water contact angle of the surface (squares) and number of cells released from the sample (circles) as a function of the added amount of DDS.

Therefore, the correlation between hydrophobicity and cell proliferation is clearly manifested. The reason to observe different proliferation in our experiments can be explained by taking into account the hydrophobic interactions that participate in protein adsorption processes. When a hydrophobic material is exposed to cells suspended in a culture medium with fetal bovine serum, proteins in the serum must be rapidly adsorbed onto the material surface before the cells adhere. The adsorbed proteins determine the subsequent cell adhesion behavior. It should be noted that most of the proteins do not promote cell adhesion once they are adsorbed onto a surface. There are many serum proteins, such as albumin, that lack cell specific domains, and thus do not support the receptor-mediated binding of cells to biomaterials [4, 9, 10]. Since albumin does not promote cell adhesion, as clearly demonstrated by Arima and Iwata [1], a displacement of this serum protein by other adhesive proteins is needed for cells to adhere to the surface material. Displacement will depend on the relative affinity existing between the surface and other proteins in solution. Therefore, taking into account the results shown in Figure 1, the albumin adsorbed during the early phase of culture incubation has had to be significantly displaced by adhesive serum proteins, which appear to show a higher affinity for

adsorbing onto hydrophobic materials due to their bigger sizes. This reasoning would explain our correlation between hydrophobicity and cell proliferation.

*Cell proliferation and roughness.* Topographical features on material surfaces are important for cellular as well as integrated tissue response to implants [3, 11-13]. Figure 2 shows how Ra and Rq increased with the etching time. A more precise analysis appears to indicate that Ra and Rq values saturate at a critical value for etching times greater than those considered in this study. Otherwise, r and Df increase initially for etching times lower than 60 min, but then their values saturate approximately at 1.4 and 2.5 for r and Df, respectively. The trends of all our roughness parameters can be fit according to the Sigmoidal Boltzmann model (solid lines in Fig. 2).

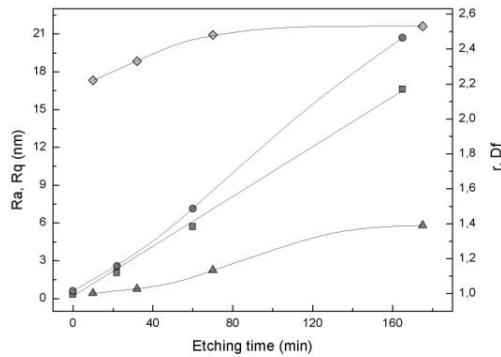


Figure 2. Relationship between roughness parameters (Ra appears with squares, Rq with circles, r with triangles, and Df with diamonds) versus etching time.

An analysis of the correlation between the surface roughness parameters and cell proliferation indicates that the number of cells rises with all of them (see Fig. 3 and 4). Despite that Ra, Rq and r give a saturation value with regard to cell proliferation (see Fig. 3 and 4), the structural complexity of the surface, characterized by the *fractal dimension*, behaves in a different way, as reflected in Figure 4. There is no plateau in this curve, and it shows that cell proliferation increases with the fractal dimension. Initially, this increase was strong, but the cell proliferation appears to have restrained its growth above certain Df value.

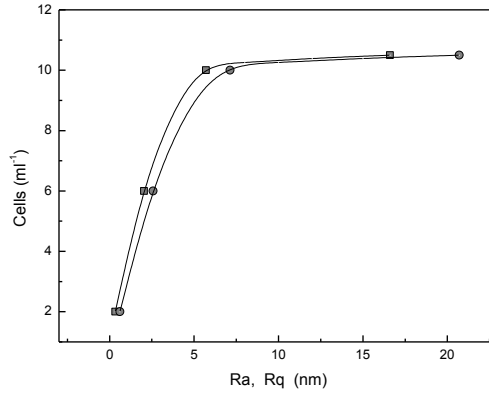


Figure 3. Relationship between the amount of cells released from the sample and the statistical roughness parameters Ra (squares) and Rq (circles).

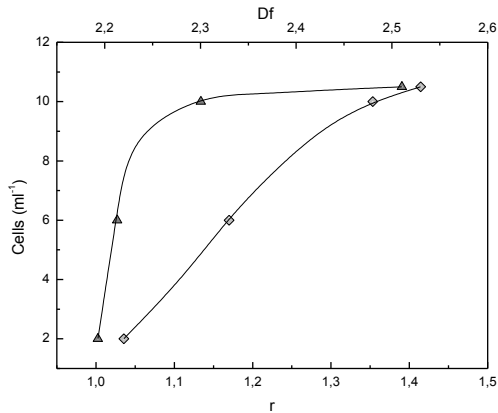
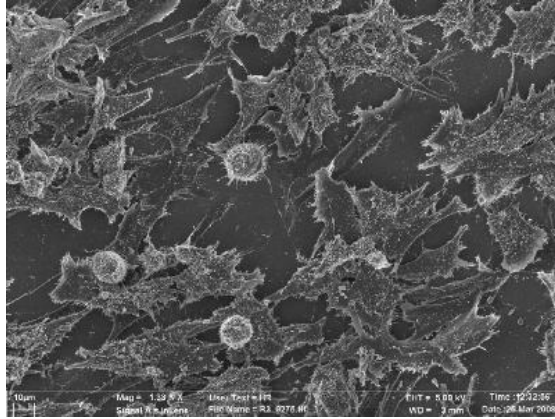


Figure 4. Relationship between the amount of cells released from the sample and the non-statistical roughness parameters  $r$  (triangles) and  $Df$  (diamonds).

By taking into account our results with respect to Ra, Rq,  $r$  and  $Df$ , it is clear that roughness plays the main role in the cell proliferation on a silicon surface for etching times lower than 60 min; but, for etching times greater than 60 min, when surface roughness saturates, cell proliferation appears to be controlled by the structural complexity of the surface.

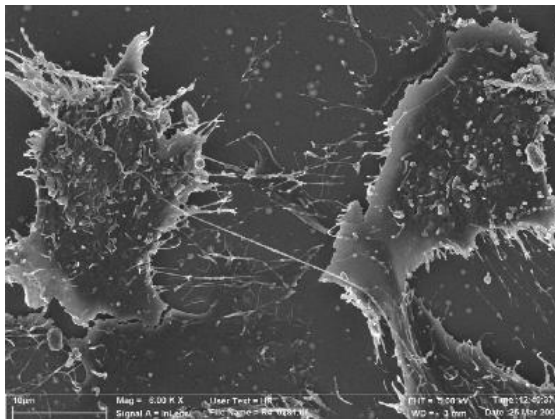
*Cell morphology and roughness.* The surface roughness affects not only cell proliferation, but it also modulates cell morphology and distribution. Cultures on rougher surfaces show high spreading, random distribution, and dispersion (Figure

5), while they seem to grow in a confluent way (with a clear tendency to form groups) in the less rough surfaces.



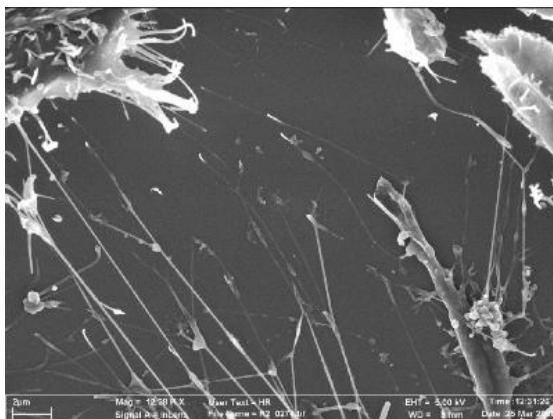
*Figure 5. SEM image from a culture on a highly rough surface ( $R_a = 5.7$  nm) showing a high spreading random distribution. Some spherical cells can be seen.*

Nevertheless, if cell growth was governed exclusively by the surface roughness, their spreading, distribution, and dispersion on the surface for etching times greater than 60 min would be similar. However, such similitude was not observed. This fact suggests that the cell growth may be controlled mainly by the structural complexity of the surface (i.e. its fractal dimension). The morphology of the cells on rougher silicon surfaces showed a more cubed shape with dendritic extensions. This morphology was observed on other rough surfaces achieved by other techniques, and is typical of a more differentiated osteoblast (Figure 6).



*Figure 6. Cell morphology on highly rough silica surfaces showing a cube shape with dendritic extensions.*

The irregularity and complexity of the shape of the cell, and also the density and length of dendritic extensions augmented with  $D_f$ , suggesting that the structural complexity of the surface plays an important role in these observations. In addition, a great number of long cytoplasmatic prolongations increased with the roughness and structural complexity of the surface at the same time that their diameters diminished (see Fig. 7).

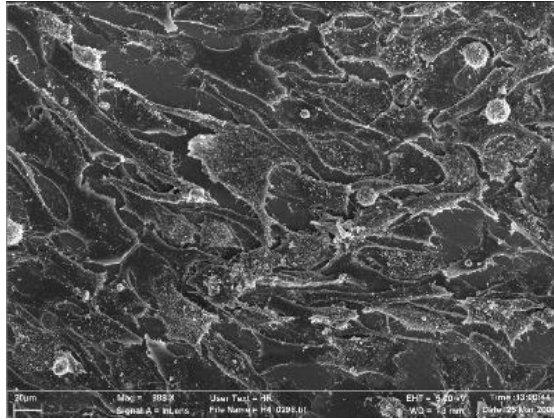


*Figure 7. Cytoplasmatic prolongations from cells interacting among themselves and with the surface.*

These prolongations usually grow from polarized regions of the cell, and they would act as a primary anchor from which other secondary and narrow fibers could derive. The osteoblast-like cell can be anchored onto the sorbent material or onto another neighbor cell thanks to these prolongations, which can even act as elements for cell intercommunication. This can be explained by taking into account that higher fractal dimension translates directly as a larger surface area and, therefore, as an increase in anchorage points. Similar observations have been noted by other authors [14-16].

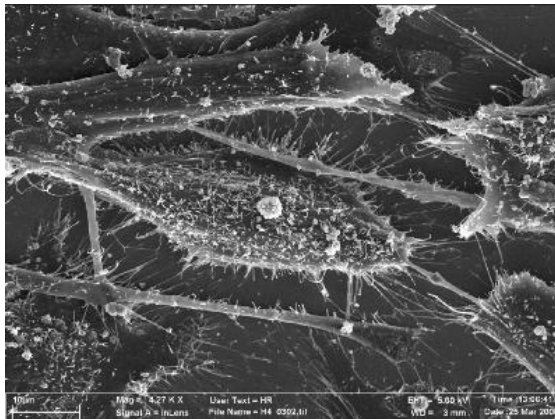
*Cell morphology and wettability.* Cultures on methylated wafers presented a clear tendency to cellular aggregation and coaggregation; the higher the surface hydrophobicity, the greater the surface cell concentration (including some layers of overlapped cells, as shown in Figure 8).





*Figure 8. Culture on methylated silicon wafers presenting a clear tendency to cellular aggregation. Layers of overlapped cells are found sometimes.*

In addition, the surface hydrophobicity promoted the formation of cell cytoplasmatic prolongations, which increased in number and also in complexity. In addition, the number of secretal-like vesicles on the cell membrane significantly augmented with the surface hydrophobicity (see Figure 9).



*Figure 9. Secretal-like vesicles on the cell membrane.*

These vesicles appeared to be constituted by some type of calcified material. The cell activity was clearly manifested by the MG-63 adhering to highly methylated silica, suggesting a certain cell differentiation. In fact, the high cell growth observed on hydrophobic surfaces indicates that hydrophobicity must somehow catalyze the cell activity.

## CONCLUSIONS

Model silica surfaces generated by simple chemical treatments enabled separate evaluations of the influence of surface roughness and wettability on cell-substrate interactions. Cell attachment efficiency and proliferation clearly depend on these physical factors, the influence of the surface hydrophobicity being more important. The substrate nano-roughness also improves the MG-63 cell proliferation, although this improvement shows a plateau once a certain surface roughness is reached ( $Ra > 6$  nm). Cell morphology is also influenced by the two physical parameters studied, the effect provoked by hydrophobicity again being more significant than that caused by the roughness. These general findings may be useful in optimizing implant design, where the osteoblast behavior determines colonization and subsequent osseointegration. Our results underscore the importance of studies geared toward elucidating the relationships between cell behavior and interfacial physicochemical properties.

*Acknowledgments* This work was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación under the projects MAT2007-66662-C02-01 and MAT2007-66117, by the projects P07-FQM3099 and FQM392 given by the Junta de Andalucía (Spain), and by the Research Group #CTS-583 (Junta de Andalucía, Spain).

## REFERENCES

1. Y. Arima, and H. Iwata, *Biomaterials*, 28 (2007) 3074.
2. B.D. Ratner. *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine*. B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, and J.E. Lemons editors. Elsevier Academic Press, Amsterdam (2004) 765.
3. H. Schweikl, R. Muller, C. Englert, K.A. Hiller, R. Kujat, M. Nerlich, et al., *J Mater Sci Mater Med*, 18 (2007) 1895.
4. K. Anselme, *Biomaterials*, 21 (2000) 667.
5. K. Anselme, and M. Bigerelle, *J Mater Sci Mater Med*, 17 (2006) 471.
6. S. Mwenifumbo, M. Li, J. Chen, A. Beye, and W. Soboyejo, *J Mater Sci Mater Med*, 18 (2007) 9.
7. J.L. Ortega-Vinuesa, P. Tengvall, and I. Lundstrom, *J Colloid Interface Sci*, 207 (1998) 228.
8. M.A. Rodríguez-Valverde, M.A. Cabrerizo-Vílchez, P. Rosales-López, A. Paez-Dueñas, and R. Hidalgo-Álvarez, *Colloids Surf A*, 206 (2002) 485.
9. A.S. Curtis, and J.V. Forrester, *J Cell Sci*, 71 (1984) 17.
10. C.J. Wilson, R.E. Clegg, D.I. Leavesley and M.J. Percy, *Tissue Eng*, 11 (2005) 1.
11. K. Cai, J. Bossert, and K.D. Jandt, *Colloids Surf B*, 49 (2006) 136.
12. M. Franchi, B. Bacchelli, G. Giavaresi, V. de Pasquale, D. Martini, M. Fini, et al., *J Periodontol*, 78 (2007) 879.
13. F.S. Ismail, R. Rohanizadeh, S. Atwa, R.S. Mason, A.J. Ruys, P.J. Martin, et al., *J Mater Sci Mater Med*, 18 (2007) 705.
14. B. Groessner-Schreiber, and R.S. Tuan, *J Cell Sci*, 101 (1992) 209.
15. G. Lauer, M. Wiedmann-Al-Ahmad, J.E. Otten, U. Hubner, R. Schmelzeisen, and W. Schilli, *Biomaterials*, 22 (2001) 2799.
16. K. Anselme, M. Bigerelle, B. Noel, E. Dufresne, D. Judas, A. Iost, et al., *J Biomed Mater Res*, 49 (2000) 155.



CLINICAL ORAL IMPLANTS RESEARCH

**Roughness and hydrophobicity as modulation factors for osteoblast proliferation and morphology on silica surfaces**

Journal:	<i>Clinical Oral Implants Research</i>
Manuscript ID:	COIR-Jul-09-OR-1200
Manuscript Type:	Original Research
Date Submitted by the Author:	06-Jul-2009
Complete List of Authors:	Padial-Molina, Miguel; Private Practice Galindo-Moreno, Pablo; University of Granada, Oral Surgery and Implant Dentistry Fernández-Barbero, Juan; School of Medicine, University of Granada, Human Anatomy and Embryology, Regenerative Biomedicine Institute (IBIMER) Jódar-Reyes, Ana Belén; University of Extremadura, Department of Applied Physics Ortega-Vinuesa, Juan Luis; University of Granada, Department of Applied Physics Ramón-Torregrosa, Pedro J; University of Granada, Department of Applied Physics
Keywords:	Biomaterials, Bone implant interactions, Material sciences, Surface chemistry

# Roughness and hydrophobicity as modulation factors for osteoblast proliferation and morphology on silica surfaces

Miguel Padial-Molina<sup>1</sup>, Pablo Galindo-Moreno<sup>1,\*</sup>, Juan Emilio Fernández-Barbero<sup>2</sup>, Ana Belén Jódar-Reyes<sup>3</sup>, Juan Luis Ortega-Vinuesa<sup>4</sup>, and Pedro J Ramón-Torregrosa<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Oral Surgery and Implant Dentistry Department, School of Dentistry, University of Granada, Campus de la Cartuja S/N, 18071, Granada, Spain.

<sup>2</sup> Human Anatomy and Embryology Department, Regenerative Biomedicine Institute (IBIMER), University of Granada, Campus de la Salud, 18071, Granada, Spain.

<sup>3</sup> Department of Applied Physics, University of Extremadura, Av. Universidad S/N, 10071, Cáceres, Spain.

<sup>4</sup> Department of Applied Physics, University of Granada, Campus de Fuentenueva S/N, 18071, Granada, Spain.

**Running Title:** Osteoblast proliferation on silica surfaces

## Corresponding author:

Name: Dr. Pablo Galindo-Moreno

Address: C/ Recogidas, 39 5º Izq, 18005, Granada, Spain.

TEL: +34 958 520658

FAX: +34 958 520658

e-mail address: pgalindo@ugr.es

**Keywords:** osteoblast, silica surface, nanotopography, wettability, SEM (scanning electron microscopy), cell morphology, cell proliferation, AFM (atomic force microscopy).

**ABSTRACT**

Development of new biomaterials is a constant in Regenerative Medicine, in its different branches. Silica derivatives have been introduced as bone substitutes and as biomimetic agents for implant surface coating. Simple chemical treatments can be used to generate model silica surfaces where it is possible to study, separately, the effect of surface wettability and roughness on cell-artificial material interactions.

**Material and Methods:** Oxidized silica was methylated to different degrees in order to produce surfaces with different wettabilities. On the other hand, hydrophilic silica pieces were etched with caustic solutions to produce surfaces with different degrees of nanoroughness. Contact angle and quantitative roughness analysis were performed by axisymmetric drop shape analysis (ADSA) and Atomic Force Microscopy (AFM). MG-63 osteoblast-like cells were cultured on surfaces and examined by Field Emission Scanning Electron microscopy (FESEM).

**Results:** Nanometer roughness was modified showing  $Ra$  values between 0.33 and 16.6 nm. Wettability showed water contact angles ranging from  $<7^\circ$  to  $95^\circ$  without roughness modification. Hydrophobicity and roughness affected the cell proliferation as well as the cell morphology. Generally, higher hydrophobicity without roughness modification can promote cell spreading and the formation of numerous dendrite-like filaments that put the cells into contact with the surface.

**Conclusion:** Cell morphology and proliferation is influenced by nanoroughness and wettability, being the effect provoked by hydrophobicity more significant than that caused by the roughness. These general findings may optimize biomaterial design, looking for a differential osteoblast behavior that determines enhanced colonization and subsequent improved osseointegration or osteoconduction.

## INTRODUCTION

Bone substitutes as well as surfaces of biomedical devices for dental and orthopedic applications must be able to induce optimal bone response for optimal clinical success. They must provide epigenetic signals to cells in the peri-implant tissues to elicit proper biological responses that favor bone healing, osteoconduction and osseointegration. In its development, it is crucial to gain a clear understanding of the interaction between these biomaterials and biological tissues. It is well known that cell adhesion to artificial materials is governed by physical and chemical surface properties of the substrate such as wettability, roughness, surface charge, chemical functionalities, as well as by the characteristics of the cells (Arima & Iwata 2007, Schweikl et al. 2007). In addition, initial cell attachment to a material surface determines subsequent processes such as cell spreading, morphology, migration, proliferation, and differentiation (Anselme 2000). Therefore, it is important to determine separately the role played by each surface property. However, biomaterial surfaces usually possess a high degree of interfacial heterogeneity, including type and density of functional chemical groups, hydrophilic or hydrophobic areas, surface texture, and roughness. Consequently, studying the effect caused by a given parameter is not simple. In this sense, it is known that surface wettability influences the interactions between the implant surface and the surrounding milieu (Kilpadi & Lemons 1994), and different studies have analyzed the influence of this parameter on the cell proliferation (Arima & Iwata 2007, Schweikl et al. 2007). However, the variety of chemical groups (-COOH, -NH<sub>2</sub>, -CF<sub>3</sub>, -PEG, etc) bound to the modified surfaces in all these studies makes it difficult to establish a clear correlation between wettability and cell adhesion due to the ambiguous influence that may be exerted by different terminal chemical groups.

On the other hand, nanotopography seems to play an important role in these phenomena. Huang et al. (Huang et al. 2004) found a highly significant influence of surface roughness on osteoblast-like cell attachment, proposing an optimum roughness. Surface texturing has also been proposed in order to enhance adhesion and integration in biomedical systems (Mwenifumbo et al. 2007). However, separately influence of wettability and nanoroughness has not been already established (Cai et al. 2006).

1  
2  
3 Many studies have focused in the interaction between titanium and osteogenic cells (Bachle &  
4 Kohal 2004) because this material represents the gold standard in the osseointegration processes  
5  
6 (Branemark et al. 1977); however, it is not the unique biomaterial available for the development  
7 and achievement of biological interactions between bone and exogenic materials. Other  
8 biomaterials have shown suitability for procuring an adequate biological response in contact to  
9 bone. In this sense, silica derivatives have been introduced as bone substitutes (Wheeler et al.  
10 2000) and as biomimetic agents for implant surface coating (Aaritalo et al. 2007), reporting  
11 good clinical success rates in the promotion of new vital bone around this material (Galindo-  
12 Moreno et al. 2008). One of the most important features of silica biomaterials surfaces is its  
13 capacity to be modified easily regarding to its physicochemical properties by simple chemical  
14 treatments (Dotto & Kleinke 2001), what would allow us to study modified cell responses  
15 according to new biomaterial surface scenarios where it can be able to study, separately, some  
16 of these important properties, as the effect of surface wettability and roughness based on cell-  
17 artificial material interactions.  
18  
19

20 Consequently, the aim of this study was to analyze the correlation between the independently  
21 modified roughness and wettability of the silica surface, and the response of osteoblast-like cells  
22 in terms of proliferation and morphologic modifications.  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

## 33 **MATERIALS AND METHODS**

### 34 *Silica Surfaces*

35 Single-side polished silica wafers (p-type, 1-30  $\Omega$ cm resistivity, 525  $\mu$ m thickness) (Si-Mat®,  
36 Landsberg, Germany) were cut into 1 x 1 cm squares using a special wafer saw. These pieces  
37 were cleaned by immersion for 5 min in a boiling basic peroxide solution ( $H_2O:H_2O_2$  (30% v/v)  
38 :  $NH_4OH$  (25% v/v), ratio 5:1:1), rinsed in MilliQ water, immersion for 5 min in a boiling acidic  
39 peroxide solution ( $H_2O:H_2O_2$  (30% v/v) :  $HCl$  (37% v/v), ratio 6:1:1), and rinsed in deionized  
40 water. This protocol creates an oxidized layer with external hydroxyl groups providing  
41 hydrophilic surfaces.  
42  
43

### 44 *Hydrophobization of surfaces*



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Some hydrophilic pieces were turned hydrophobic by methylating the OH groups of the surface.

Silica pieces were extensively rinsed twice in ethanol and once in trichloroethylene (TCE, Fluka, Schnellendorf, Germany), incubated at room temperature for 10 min in organic solutions of dimethyldichlorosilane (DDS, Fluka) at 0.003%, 0.006%, 0.012% and 0.062% concentrations in TCE, and rinsed in ethanol, TCE, and ethanol once more. Finally, the surfaces were rinsed in deionized water. Different degrees of methylation were carried out to obtain a representative gamut gradient from highly hydrophilic to highly hydrophobic surfaces.

***Surface roughness generation***

Another group of clean hydrophilic silica pieces was subjected to caustic etching processes in aqueous sodium hydroxide solutions ([NaOH] = 0.1 M) at room temperature for 0, 22, 60 or 165 min. The specimens were then rinsed with water to remove the excess of alkali, and rinsed in deionized water.

***Surface wettability characterization***

For the surface wettability characterization, different samples were rinsed with deionized water and dried in N<sub>2</sub> gas for measuring the static contact angle ( $\theta$ ) of a sessile water droplet (5  $\mu$ l volume). The  $\theta$ -values were determined by using an axisymmetric drop shape analysis (ADSA) method in a thermostatically controlled room (20°C) (Rodriguez-Valverde et al. 2002), by means of a CCD monochrome camera (Sony SSC-M370CE) assembled to a microscope (Apozoom, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) horizontally orientated. Droplet images were processed in a PC by a frame grabber (DT 3155, Data Translation GmbH, Bietigheim-Bissingen, Germany). The reported  $\theta$ -data were obtained by averaging the values of six different and independent experiments for each samples group.

***Surface roughness characterization***

A quantitative analysis of surface roughness was performed by an Atomic Force Microscope (AFM) (Nanoscope IV MultiMode®, Digital Instruments, Santa Barbara, Ca, USA). Height images were captured at a scan rate of 1.49 Hz and scan sizes of 5 or 2 mm.

1  
2  
3 The parameters used to characterize the roughness and the texture of the surface were: the  
4  
5 *Arithmetic Average Roughness (Ra)*, which provides information on the average vertical  
6  
7 deviation of the absolute surface values from the mean line, and the *Root Mean Squared*  
8  
9 *Roughness (Rq or RMS)*, which indicates the deviation of the surface roughness respect to the  
10  
11 *Ra* value. Consequently, *Rq* is more sensitive than *Ra* to large deviations from the mean line.  
12  
13 However, for a more complete characterization of the surface roughness, two more parameters,  
14  
15 the *roughness surface ratio (r)*, and the *fractal dimension (Df)*, were also calculated. The “*r*”  
16  
17 parameter was defined as the ratio between the surface area computed by a simple triangulation  
18  
19 method and the projected surface area. The *fractal dimension* of the surface gives information  
20  
21 about its structural complexity.  
22  
23

#### 24 ***Cell proliferation on silica surfaces***

25  
26 Human MG-63 osteoblast-like cells (supplied by the Scientific Instrumentation Center of the  
27  
28 University of Granada) were added at the same density (500 cells/ml) to the silica wafers placed  
29  
30 face-up in the tissue culture pools. Dulbecco’s modified Eagle medium (DMEM, Sigma, St  
31  
32 Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma) and 1%  
33  
34 penicillin/streptomycin were added. Culture plates were maintained at 37°C in a humidified 5%  
35  
36 CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere. Culture medium was exchanged every 48 h until 21 days after plating.  
37  
38 Then, adherent cells were released from the surface by two sequential incubations in a non-  
39  
40 enzymatic cell dissociation solution (Sigma) for 5 min at 37°C. Four fields were counted for  
41  
42 each cell suspension released from each surface in a Neubauer chamber and the arithmetic  
43  
44 average was calculated. All the experiments described above were carried out in triplicate.  
45  
46  
47

#### 48 ***Scanning electron microscopy (SEM) analysis***

49  
50 After cultures on silica wafers, another group of samples were immersed in a sodium  
51  
52 cacodylate-buffered formaldehyde–glutaraldehyde fixative for 24 h at room temperature, post-  
53  
54 fixed in 20% osmium tetroxide for 2 h, dehydrated by serial transfers in ascending  
55  
56 concentrations of acetone (50–100%), infiltrated with liquid carbon dioxide below the critical  
57  
58 drying point, and made electrically conductive by mounting them on aluminum slabs with a  
59  
60 silver point, followed by sputter coating with gold/palladium to a thickness of approximately

1  
2  
3 250Å. Cell morphology on the test surfaces was examined by Field Emission Scanning Electron  
4  
5 microscopy (FESEM) (LEO 1530 Gemini, Zeiss/LEO, Oberkochen, Germany) using 5Kv  
6  
7 intensity. The processes described above were performed in the Scientific Instrumentation  
8  
9 Center of the University of Granada.  
10

## 11 12 13 14 **RESULTS**

### 15 *Cell proliferation and surface hydrophobicity*

16  
17 Culture of osteoblast-like cells on silica surfaces with different wettability (water contact angles  
18  
19 ranging from  $<7^\circ$  to  $95^\circ$ ) showed a sigmoidal relation between cells released from the surface  
20  
21 and the methylation agent (DDS) concentration (figure 1A). The same type of correlation was  
22  
23 found for the dependency of the water contact angle of the surface on the DDS concentration.  
24  
25 This increase in the contact angle with the DDS added to TCE indicates that the surface  
26  
27 methylation successfully took place. The high similarity between the two curves suggests a  
28  
29 strong correlation between the number of adhering cells and the water contact angle. In fact, a  
30  
31 lineal relation was found when plotting cells versus  $\theta$ , giving a linear correlation coefficient  
32  
33 very close to unity ( $r = 0.98775$ ) (figure 1B).  
34  
35

### 36 *Cell proliferation and surface roughness*

37  
38  $Ra$  (ranging from 0.33 to 16.6 nm) and  $Rq$  (from 0.61 to 20.7 nm) increased with the etching  
39  
40 time (figure 2). A more precise analysis appears to indicate that  $Ra$  and  $Rq$  values saturate at a  
41  
42 critical value for etching times greater than those considered in this study. Otherwise,  $r$  (from  
43  
44 1.00 to 1.39) and  $Df$  (from 2.22 to 2.53) increase initially for etching times lower than 60 min,  
45  
46 but then their values saturate approximately at 1.35 and 2.5 for  $r$  and  $Df$ , respectively. The  
47  
48 trends of all our roughness parameters can be fit according to the Sigmoidal Boltzmann model  
49  
50 (solid lines in figure 2).  
51  
52

53  
54 An analysis of the correlation between surface roughness at a nanometer scale ( $Ra$ ) and cell  
55  
56 proliferation indicates that the number of cells rises with  $Ra$ , especially between 0 and 6 nm  
57  
58 (figure 3). Despite that  $Ra$ ,  $Rq$  and  $r$  give a saturation value with regard to cell proliferation, the  
59  
60 structural complexity of the surface, characterized by the *fractal dimension*, behaves in a

1  
2  
3 different way (figure 4). There is no plateau in this curve, and it shows that cell proliferation  
4  
5 increases with the fractal dimension. Initially, this increase was strong, but the cell proliferation  
6  
7 appears to have restrained its growth above certain  $D_f$  value.  
8

#### 9 10 ***Cell morphology and surface hydrophobicity***

11 Cultures on methylated wafers presented a clear tendency to cellular aggregation and  
12  
13 coaggregation: the higher the surface hydrophobicity, the greater the surface cell concentration,  
14  
15 including some layers of overlapped cells (figure 5). In addition, the surface hydrophobicity  
16  
17 promoted the formation of cell cytoplasmatic prolongations, which increased in number and  
18  
19 also in complexity. The primary prolongations were usually branched into numerous secondary  
20  
21 filaments, which often showed wider zones resembling knots (figure 6). In addition, the number  
22  
23 of secretal-like vesicles on the cell membrane significantly augmented with the surface  
24  
25 hydrophobicity (figure 7).  
26  
27

#### 28 29 ***Cell morphology and surface roughness***

30 Cultures on rougher surfaces showed high spreading, random distribution, and dispersion  
31  
32 (figure 8), and a more cubed shape with dendritic extensions (figure 9). They seem to grow in a  
33  
34 confluent way showing a flat shape with a clear tendency to form groups in the less rough  
35  
36 surfaces. A large number of spherical cells were observed too.  
37  
38

39 In addition, a great number of long and low diameters cytoplasmatic prolongations were  
40  
41 observed as roughness and structural complexity of the surface augment (figure 10).  
42  
43  
44

## 45 46 **DISCUSSION**

47 Previous reports have established that the wettability of the surface may be an important factor  
48  
49 during the initial interaction of a biomaterial with proteins and cells in bones (Kieswetter et al.  
50  
51 1996a). According these considerations, a hydrophilic surface might play an advantageous role  
52  
53 in the early phase of wound healing and in the cascade of events occurring during  
54  
55 osseointegration (Ellingsen et al. 2006). However, in the present work, our results showed that a  
56  
57 positive correlation between hydrophobicity and cell proliferation was clearly manifested. The  
58  
59 reason to observe different behavior in osteoblast-like proliferation in our experiments can be  
60

1  
2  
3 explained by taking into account the hydrophobic interactions that participate in protein  
4 adsorption processes. It is known that serum protein adsorption is generally encouraged by  
5 hydrophobic interactions between the surface and these macromolecules and it is one of the  
6 most important contributions controlling protein adsorption (Norde 1986). The spontaneous  
7 adhesion of these types of molecules onto hydrophobic surfaces is almost completely due to the  
8 entropy increase caused by the release to the bulk of the structured water in contact with  
9 hydrophobic components of the polypeptide chains and the surface. This interaction is usually  
10 higher for large, soft proteins and is lower for small, rigid ones (Norde 1986). In this sense,  
11 previously, our group demonstrated that fibrinogen (MW = 340 kD) interacts with a  
12 hydrophobic surface stronger than albumin (MW = 66 kD) (Ortega-Vinuesa et al. 1998).  
13 Therefore, when a hydrophobic material is exposed to cells suspended in a culture medium with  
14 fetal bovine serum, proteins in the serum must be rapidly adsorbed onto the material surface  
15 before the cells adhere (Davies 2003). The adsorbed proteins determine the subsequent cell  
16 adhesion behavior. There are many serum proteins, such as albumin, that lack cell specific  
17 domains, and thus do not support the receptor-mediated binding of cells to biomaterials (Wilson  
18 et al. 2005). Consequently, prior to the cell adhesion, it is mandatory for the biomaterial surface  
19 to have been coated by adhesive proteins, such as fibronectin (MW = 500 kD). However,  
20 albumin is, by far, the major protein component of the serum (Arima & Iwata 2007), and thus, it  
21 is more than likely that albumin covered most of our silica surfaces at the beginning of the cell  
22 incubation. Since albumin does not promote cell adhesion, as clearly demonstrated by Arima  
23 and Iwata (Arima & Iwata 2007), a displacement of this serum protein by other adhesive  
24 proteins is needed for cells to adhere to the surface material. Displacement will depend on the  
25 relative affinity existing between the surface and other proteins in solution. It is known that  
26 desorption of previously adsorbed macromolecules is easier for those that have few and/or weak  
27 contacts with the surface. In this sense, previously Ortega-Vinuesa et al. (Ortega-Vinuesa et al.  
28 1998) showed that albumin must not establish many contact points with methylated silica  
29 surfaces, as it was displaced from the hydrophobic surface more effectively than were other  
30 larger proteins (as IgG or fibrinogen). It has been also reported that albumin and fibronectin  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

coadsorbed to surfaces may have a synergistic role in cell adhesion, termed albumin 'rescuing', enhancing cell adhesion and spreading on hydrophobic surfaces (Lewandowska et al. 1989).

Taking into account the results shown in figure 1B, we consider that albumin adsorbed during the early phase of culture incubation might have to be significantly displaced by other adhesive serum proteins, which appear to show a higher affinity for adsorbing onto hydrophobic materials due to their bigger sizes. This reasoning would explain our correlation between hydrophobicity and cell proliferation, taking into account that our incubations lasted 21 days – that is, working with relatively long incubation times.

Our results differ from those reported by other authors who found maximum cell adhesion in materials at intermediate contact angles (40°-70°) (Lee et al. 1998). Other authors even state that hydrophilic surfaces support adhesion of various cell types whereas hydrophobic surfaces often inhibit the interaction between cells and artificial surfaces (Faucheux et al. 2004, Keselowsky et al. 2004). The heterogeneity of the studied surfaces, prepared by using polymers and copolymers with different chemical compositions, or by self-assembled monolayers carrying various terminal groups, as well as the use of different cell types, and cultures times, makes it impossible to give a general explanation for the discrepancies found among the reported results. At least, we are able to explain our results by means of a plausible reasoning based on the role played by the hydrophobic forces in the adsorption and displacement of serum proteins, which ultimately appears to be responsible for the cell attachment and proliferation. Other studies on biomaterials for dental implants (Sawase et al. 2008) are consistent with these arguments.

The cell activity was clearly manifested by the MG-63 adhering to highly methylated silica surfaces, suggesting a certain cell differentiation. In fact, the high cell proliferation observed on hydrophobic surfaces indicates that hydrophobicity must somehow catalyze the cell activity. Therefore, our results may indicate that the methylation of oxidized silica surfaces (which turns them from hydrophilic into hydrophobic) is a simple chemical treatment that promotes morphological changes that in turn increase the MG-63 osteoblast-like cell proliferation. Nevertheless, it should be noted that some studies do not coincide with ours results (Kim et al. 2007), but they are not comparable, since they report cultured cells after 1-day incubations.

1  
2  
3 Other research groups (Tamada & Ikada 1994) observed more cell adherence, spreading, and  
4  
5 growth on moderately hydrophilic surfaces (with water contact angles of around 40° to 70°)  
6  
7 when endothelial cells, HeLa S3, or fibroblasts are cultured onto various polymer substrates  
8  
9 with different surface wettabilities. The main discrepancy may arise from the differences in the  
10  
11 cell type, membrane properties, and integrin-receptor expression, as they firmly control the cell  
12  
13 interactions with surfaces (Webb et al. 2000).  
14

15  
16 Topographical features on material surfaces are also important for cellular as well as integrated  
17  
18 tissue response to implants (Aaritalo et al. 2007, Bachle & Kohal 2004, Cai et al. 2006,  
19  
20 Schweickl et al. 2007). Accordingly, our results showed that the cell proliferation become almost  
21  
22 constant above a given  $Ra$  (or  $Rq$ ) value, showing a plateau similar to that observed by other  
23  
24 studies (Linez-Bataillon et al. 2002). Once the roughness reaches a high value, this property  
25  
26 hardly affects cell proliferation. Dimensions in the sub-micrometer region have an influence on  
27  
28 focal contacts, cytoskeleton, adhesion, morphology, and orientation of cells; cell adhesion,  
29  
30 morphology, and orientation, as well as bone formation, are influenced by dimensions in the (1–  
31  
32 100)  $\mu\text{m}$  range, whereas vertical and lateral dimensions in the  $>100 \mu\text{m}$  range are important for  
33  
34 mechanical interlocking (Ellingsen et al. 2006). *In vitro* studies showed that surface  
35  
36 microtopography modulates phenotypic maturation of osteoblast-like cells and normal human  
37  
38 osteoblasts, as they exhibit a more differentiated phenotype when growing on micro-rough  
39  
40 surfaces (Batzer et al. 1998, Lohmann et al. 2002). Cells might “detect” contact points with the  
41  
42 surface, and thereby transfer information concerning roughness into their cytoplasm in order to  
43  
44 change their proliferative behavior. These studies suggested that the increased bone to material  
45  
46 contact observed in implants with micro-rough surfaces is due in part to the production of local  
47  
48 osteogenic factors (Hamilton & Brunette 2007, Kieswetter et al. 1996a). The role of nanometer  
49  
50 roughness is not unambiguously defined. Cai et al. (Cai et al. 2006) described no significant  
51  
52 effects on cell proliferation over different nano-topographies. Our results with respect to  $Ra$ ,  $Rq$ ,  
53  
54  $r$  and  $Df$  parameters usually described to measure biophysical properties of the dental implant  
55  
56 surfaces, showed clearly that roughness plays the main role in the cell proliferation on a silica  
57  
58 surface for etching times lower than 60 min; however, for etching times greater than 60 min,  
59  
60

1  
2  
3 when surface roughness saturates, cell proliferation appeared to be controlled by the structural  
4  
5 complexity of the surface, that is, it depends on  $Df$  but not on  $Ra$ ,  $Rq$  or  $r$ .  
6

7  
8 If cell growth were governed exclusively by the surface roughness, then cells spreading,  
9  
10 distribution, and dispersion on the surface would be similar for etching times greater than 60  
11  
12 min. However, such similitude was not observed. This finding suggests that the cell growth may  
13  
14 be controlled mainly by the structural complexity of the surface (i.e. its fractal dimension) and  
15  
16 indicates a certain lack of cell adherence to the smoother silica surface, although such cells  
17  
18 would probably be adsorbed onto other ones located in a basal layer. In general, this  
19  
20 morphology was observed on other rough surfaces achieved by other techniques, and is typical  
21  
22 of a more differentiated osteoblast (Bachle & Kohal 2004, Kieswetter et al. 1996b). The  
23  
24 irregularity and complexity of the shape of the cells, as well as the density and length of  
25  
26 dendritic extensions, augmented with  $Df$ , suggesting that the structural complexity of the  
27  
28 surface plays a main role in these observations (Rico et al. 2009). These prolongations usually  
29  
30 grew from polarized regions of the cell, and they would act as a primary anchor from which  
31  
32 other secondary and narrow fibers could derive (Ismail et al. 2007). They were formed by a  
33  
34 cylindrical structure with a diameter of few nanometers, and showed an irregular surface. A  
35  
36 cytoplasmatic prolongation would act as a tightened fiber that maintains a cell adhering to the  
37  
38 surface. The osteoblast-like cell could be anchored onto the sorbent material or onto another  
39  
40 neighbor cell thanks to these prolongations, which could even act as elements for cell  
41  
42 intercommunication. Furthermore, the quality of the anchorage of cells to the surface is, *a*  
43  
44 *priori*, determined primarily by its complexity. Thus, by increasing the fractal dimension, the  
45  
46 quality of the cell-surface attachment and the quantity of anchored cells also increase. This can  
47  
48 be explained because the higher fractal dimension translates directly as a larger surface area  
49  
50 and, therefore, as an increase in anchorage points. Similar observations have been noted by  
51  
52 other authors (Anselme et al. 2000, Kieswetter et al. 1996b, Lauer et al. 2001). Recently, Gatti  
53  
54 et al. (Gatti et al. 2008) have visualized living osteoblasts and have correlated their morphology  
55  
56 and distribution with the underlying titanium topography. Their results agree with ours, and  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 with other studies conducted at a nanometer scale (Chesmel et al. 1995, Healy et al. 1996,  
4  
5 Thomas et al. 1997).  
6  
7

## 8 9 **CONCLUSIONS**

10 Model silica surfaces generated by simple chemical treatments enabled separate evaluations of  
11  
12 the influence of surface roughness and wettability on cell-substrate interactions. Cell attachment  
13  
14 efficiency and proliferation clearly depend on these physical factors, the influence of the surface  
15  
16 hydrophobicity being more important. The substrate nano-roughness also improves the MG-63  
17  
18 cell proliferation, although this improvement shows a plateau once a certain surface roughness  
19  
20 is reached ( $Ra > 6$  nm). Cell morphology is also influenced by the two physical parameters  
21  
22 studied, the effect provoked by hydrophobicity again being more significant than that caused by  
23  
24 the roughness. These general findings may be useful in optimizing implant design, where the  
25  
26 osteoblast behavior determines colonization and subsequent osseointegration. Our results  
27  
28 underscore the importance of studies geared toward elucidating the relationships between cell  
29  
30 behavior and interfacial physicochemical properties.  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37

## 38 **ACKNOWLEDGMENTS**

39  
40 This work was supported by the *Ministerio de Ciencia e Innovación de España* under the  
41  
42 projects MAT2007-66662-C02-01 and MAT2007-66117, by the *Junta de Andalucía* (Spain),  
43  
44 (projects P07-FQM3099, FQM392, and Research Group #CTS-583). Finally, we wish to thank  
45  
46 Professor M.A. Cabrerizo Vilchez for his accurate comments, suggestions and supervision.  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
**REFERENCES**

Aaritalo, V., Areva, S., Jokinen, M., Linden, M. & Peltola, T. (2007) Sol-gel-derived TiO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> implant coatings for direct tissue attachment. Part I: Design, preparation and characterization. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **18**: 1863-1873.

Anselme, K. (2000) Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* **21**: 667-681.

Anselme, K., Bigerelle, M., Noel, B., Dufresne, E., Judas, D., Iost, A. & Hardouin, P. (2000) Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *Journal of Biomedical Materials Research* **49**: 155-166.

Arima, Y. & Iwata, H. (2007) Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials* **28**: 3074-3082.

Bachle, M. & Kohal, R.J. (2004) A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. *Clinical Oral Implants Research* **15**: 683-692.

Batzer, R., Liu, Y., Cochran, D.L., Szmuckler-Moncler, S., Dean, D.D., Boyan, B.D. & Schwartz, Z. (1998) Prostaglandins mediate the effects of titanium surface roughness on MG63 osteoblast-like cells and alter cell responsiveness to 1 alpha,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. *Journal of Biomedical Materials Research* **41**: 489-496.

Branemark, P.I., Hansson, B.O., Adell, R., Breine, U., Lindstrom, J., Hallen, O. & Ohman, A. (1977) Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery. Supplementum* **16**: 1-132.

Cai, K., Bossert, J. & Jandt, K.D. (2006) Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation? *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* **49**: 136-144.

Chesmel, K.D., Clark, C.C., Brighton, C.T. & Black, J. (1995) Cellular responses to chemical and morphologic aspects of biomaterial surfaces. II. The biosynthetic and migratory response of bone cell populations. *Journal of Biomedical Materials Research* **29**: 1101-1110.

- 1  
2  
3 Davies, J.E. (2003) Understanding peri-implant endosseous healing. *Journal of Dental*  
4  
5 *Education* **67**: 932-949.  
6  
7 Dotto, M.E.R. & Kleinke, M.U. (2001) Kinetic roughening in etched Si. *Physica A: Statistical*  
8  
9 *Mechanics and its Applications* **295**: 149-153.  
10  
11 Ellingsen, J.E., Thomsen, P. & Lyngstadaas, S.P. (2006) Advances in dental implant materials  
12  
13 and tissue regeneration. *Periodontology 2000* **41**: 136-156.  
14  
15 Faucheux, N., Schweiss, R., Lutzow, K., Werner, C. & Groth, T. (2004) Self-assembled  
16  
17 monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies.  
18  
19 *Biomaterials* **25**: 2721-2730.  
20  
21 Galindo-Moreno, P., Avila, G., Fernandez-Barbero, J.E., Mesa, F., O'Valle-Ravassa, F. &  
22  
23 Wang, H.L. (2008) Clinical and histologic comparison of two different composite grafts for  
24  
25 sinus augmentation: A pilot clinical trial. *Clinical Oral Implants Research* **19**: 755-759.  
26  
27 Gatti, R., Orlandini, G., Uggeri, J., Belletti, S., Galli, C., Raspanti, M., Scandroglio, R. &  
28  
29 Guizzardi, S. (2008) Analysis of living cells grown on different titanium surfaces by time-lapse  
30  
31 confocal microscopy. *Micron* **39**: 137-143.  
32  
33 Hamilton, D.W. & Brunette, D.M. (2007) The effect of substratum topography on osteoblast  
34  
35 adhesion mediated signal transduction and phosphorylation. *Biomaterials* **28**: 1806-1819.  
36  
37 Healy, K.E., Thomas, C.H., Rezanian, A., Kim, J.E., McKeown, P.J., Lom, B. & Hockberger,  
38  
39 P.E. (1996) Kinetics of bone cell organization and mineralization on materials with patterned  
40  
41 surface chemistry. *Biomaterials* **17**: 195-208.  
42  
43 Huang, H.H., Ho, C.T., Lee, T.H., Lee, T.L., Liao, K.K. & Chen, F.L. (2004) Effect of surface  
44  
45 roughness of ground titanium on initial cell adhesion. *Biomolecular Engineering* **21**: 93-97.  
46  
47 Ismail, F.S., Rohanizadeh, R., Atwa, S., Mason, R.S., Ruys, A.J., Martin, P.J. & Bendavid, A.  
48  
49 (2007) The influence of surface chemistry and topography on the contact guidance of MG63  
50  
51 osteoblast cells. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **18**: 705-714.  
52  
53 Keselowsky, B.G., Collard, D.M. & Garcia, A.J. (2004) Surface chemistry modulates focal  
54  
55 adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. *Biomaterials* **25**:  
56  
57 5947-5954.  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 Kieswetter, K., Schwartz, Z., Dean, D.D. & Boyan, B.D. (1996a) The role of implant surface  
4 characteristics in the healing of bone. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **7**: 329-  
5  
6 345.  
7  
8  
9  
10 Kieswetter, K., Schwartz, Z., Hummert, T.W., Cochran, D.L., Simpson, J., Dean, D.D. &  
11  
12 Boyan, B.D. (1996b) Surface roughness modulates the local production of growth factors and  
13  
14 cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. *Journal of Biomedical Materials Research* **32**: 55-63.  
15  
16 Kilpadi, D.V. & Lemons, J.E. (1994) Surface energy characterization of unalloyed titanium  
17  
18 implants. *Journal of Biomedical Materials Research* **28**: 1419-1425.  
19  
20  
21 Kim, M.S., Shin, Y.N., Cho, M.H., Kim, S.H., Kim, S.K., Cho, Y.H., Khang, G., Lee, I.W. &  
22  
23 Lee, H.B. (2007) Adhesion behavior of human bone marrow stromal cells on differentially  
24  
25 wettable polymer surfaces. *Tissue Engineering* **13**: 2095-2103.  
26  
27  
28 Lauer, G., Wiedmann-Al-Ahmad, M., Otten, J.E., Hubner, U., Schmelzeisen, R. & Schilli, W.  
29  
30 (2001) The titanium surface texture effects adherence and growth of human gingival  
31  
32 keratinocytes and human maxillar osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* **22**: 2799-2809.  
33  
34  
35 Lee, J.H., Khang, G., Lee, J.W. & Lee, H.B. (1998) Interaction of different types of cells on  
36  
37 polymer surfaces with wettability gradient. *Journal of Colloid and Interface Science* **205**: 323-  
38  
39 330.  
40  
41  
42 Lewandowska, K., Balachander, N., Sukenik, C.N. & Culp, L.A. (1989) Modulation of  
43  
44 fibronectin adhesive functions for fibroblasts and neural cells by chemically derivatized  
45  
46 substrata. *Journal of Cellular Physiology* **141**: 334-345.  
47  
48  
49 Linez-Bataillon, P., Monchau, F., Bigerelle, M. & Hildebrand, H.F. (2002) In vitro MC3T3  
50  
51 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates. *Biomolecular*  
52  
53 *Engineering* **19**: 133-141.  
54  
55  
56 Lohmann, C.H., Tandy, E.M., Sylvia, V.L., Hell-Vocke, A.K., Cochran, D.L., Dean, D.D.,  
57  
58 Boyan, B.D. & Schwartz, Z. (2002) Response of normal female human osteoblasts (NHOst) to  
59  
60 17beta-estradiol is modulated by implant surface morphology. *Journal of Biomedical Materials*  
*Research* **62**: 204-213.

- 1  
2  
3 Mwenifumbo, S., Li, M., Chen, J., Beye, A. & Soboyejo, W. (2007) Cell/surface interactions on  
4 laser micro-textured titanium-coated silicon surfaces. *Journal of Materials Science. Materials in*  
5  
6  
7 *Medicine* **18**: 9-23.  
8  
9  
10 Norde, W. (1986) Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. *Advances in*  
11  
12 *Colloid and Interface Science* **25**: 267-340.  
13  
14 Ortega-Vinuesa, J.L., Tengvall, P. & Lundstrom, I. (1998) Aggregation of HSA, IgG, and  
15  
16 fibrinogen on methylated silicon surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **207**: 228-  
17  
18 239.  
19  
20 Rico, P., Rodriguez Hernandez, J.C., Moratal, D., Altankov, G., Monleon Pradas, M. &  
21  
22 Salmeron, M. (2009) Substrate-induced assembly of fibronectin into networks. Influence of  
23  
24 surface chemistry and effect on osteoblast adhesion. *Tissue Engineering. Part A* **21**. [Epub  
25  
26 ahead of print].  
27  
28  
29 Rodriguez-Valverde, M.A., Cabrerizo-Vilchez, M.A., Rosales-Lopez, P., Paez-Dueñas, A. &  
30  
31 Hidalgo-Alvarez, R. (2002) Contact angle measurements on two (wood and stone) non-ideal  
32  
33 surfaces. *Colloids and Surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects* **206**: 485-495.  
34  
35  
36 Sawase, T., Jimbo, R., Baba, K., Shibata, Y., Ikeda, T. & Atsuta, M. (2008) Photo-induced  
37  
38 hydrophilicity enhances initial cell behavior and early bone apposition. *Clinical Oral Implants*  
39  
40 *Research* **19**: 491-496.  
41  
42  
43 Schweickl, H., Muller, R., Englert, C., Hiller, K.A., Kujat, R., Nerlich, M. & Schmalz, G. (2007)  
44  
45 Proliferation of osteoblasts and fibroblasts on model surfaces of varying roughness and surface  
46  
47 chemistry. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **18**: 1895-1905.  
48  
49 Tamada, Y. & Ikada, Y. (1994) Fibroblast growth on polymer surfaces and biosynthesis of  
50  
51 collagen. *Journal of Biomedical Materials Research* **28**: 783-789.  
52  
53  
54 Thomas, C.H., McFarland, C.D., Jenkins, M.L., Reznia, A., Steele, J.G. & Healy, K.E. (1997)  
55  
56 The role of vitronectin in the attachment and spatial distribution of bone-derived cells on  
57  
58 materials with patterned surface chemistry. *Journal of Biomedical Materials Research* **37**: 81-  
59  
60 93.

1  
2  
3 Webb, K., Hlady, V. & Tresco, P.A. (2000) Relationships among cell attachment, spreading,  
4  
5 cytoskeletal organization, and migration rate for anchorage-dependent cells on model surfaces.  
6

7  
8 *Journal of Biomedical Materials Research* **49**: 362-368.

9  
10 Wheeler, D.L., Eschbach, E.J., Hoellrich, R.G., Montfort, M.J. & Chamberland, D.L. (2000)  
11  
12 Assessment of resorbable bioactive material for grafting of critical-size cancellous defects.  
13

14  
15 *Journal of Orthopaedic Research* **18**: 140-148.

16  
17 Wilson, C.J., Clegg, R.E., Leavesley, D.I. & Percy, M.J. (2005) Mediation of biomaterial-cell  
18  
19 interactions by adsorbed proteins: A review. *Tissue Engineering* **11**: 1-18.  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1a:** Water contact angle of the surfaces (squares) and number of cells released from the samples (circles) as a function of the added amount of DDS.

**Figure 1b:** Number of released cells as a function of the water contact angle of the surfaces.

**Figure 2:** Relationship between different roughness parameters used in this work (*Ra* appears with squares, *Rq* with circles, *r* with triangles, and *Df* with diamonds) versus the etching time. It was possible to generate a master sigmoidal Boltzmann curve to fit the behavior of each roughness parameter used in this work (solid lines).

**Figure 3:** Relationship between the amount of cells released from the samples and surface roughness described by statistical roughness parameters: *Ra* (squares) and *Rq* (circles).

**Figure 4:** Relationship between the amount of cells released from the samples and surface roughness described by non-statistical roughness parameters: *r* (triangles) and *Df*(diamonds).

**Figure 5:** Culture on methylated silica wafers presenting a clear tendency to cellular aggregation and coaggregation. Layers of overlapped cells are found sometimes.

**Figure 6:** Primary prolongations branched into numerous secondary filaments.

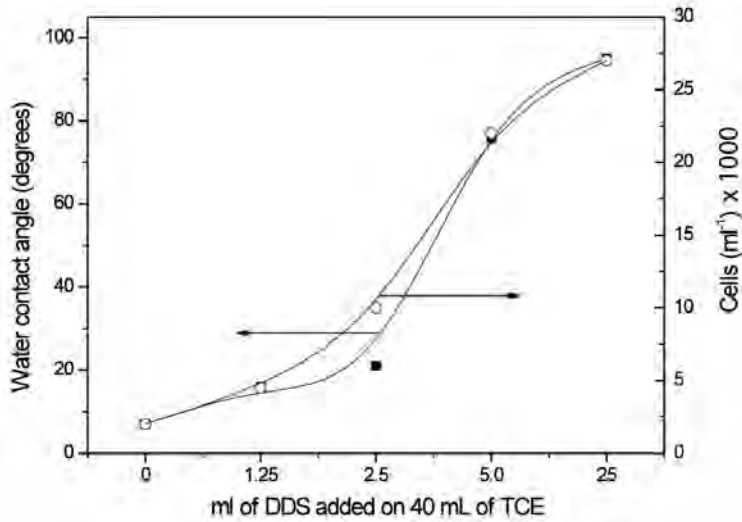
**Figure 7:** Secretal-like vesicles on the cell membrane.

**Figure 8:** Culture on a highly rough surface (*Ra*=16.6 nm) showing a high spreading, random distribution and dispersion. Some spherical cells can be seen.

**Figure 9:** Cell morphology on highly rough silica surface showing a cube shape with dendritic extensions.

**Figure 10:** Cytoplasmatic prolongations from cells interacting among themselves and with the surface.

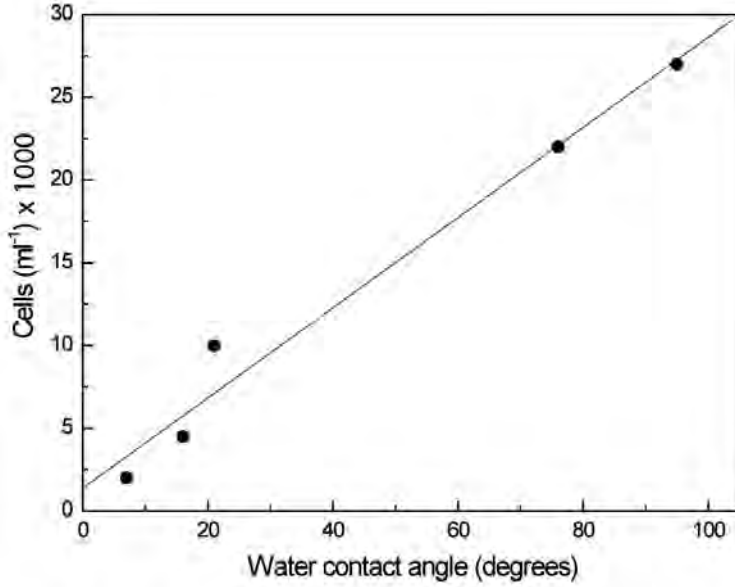
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Water contact angle of the surfaces (squares) and number of cells released from the samples (circles) as a function of the added amount of DDS  
95x68mm (300 x 300 DPI)



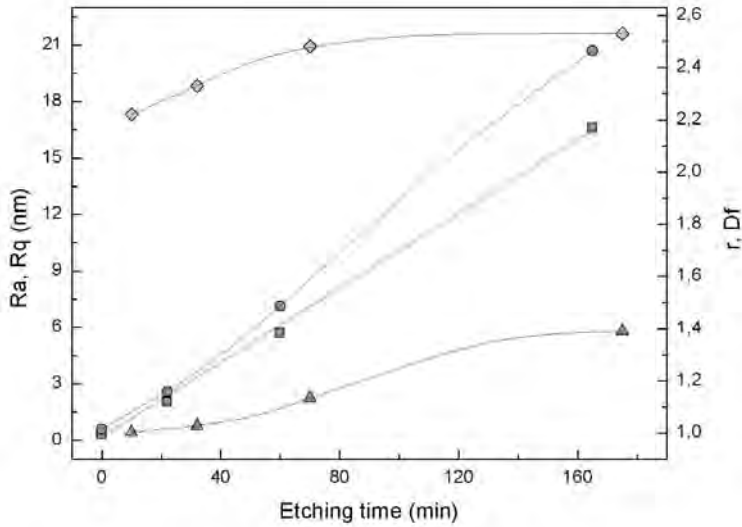
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Number of released cells as a function of the water contact angle of the surfaces  
88x70mm (300 x 300 DPI)

Clinical Oral Implants Research

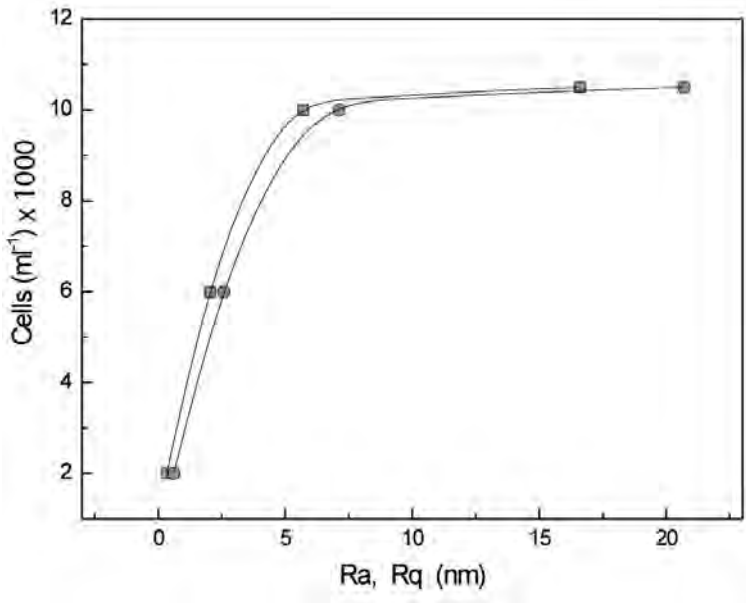
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Relationship between different roughness parameters used in this work (Ra appears with squares, Rq with circles, r with triangles, and Df with diamonds) versus the etching time. It was possible to generate a master sigmoidal Boltzmann curve to fit the behavior of each roughness parameter used in this work (solid lines)  
86x64mm (300 x 300 DPI)

S Research

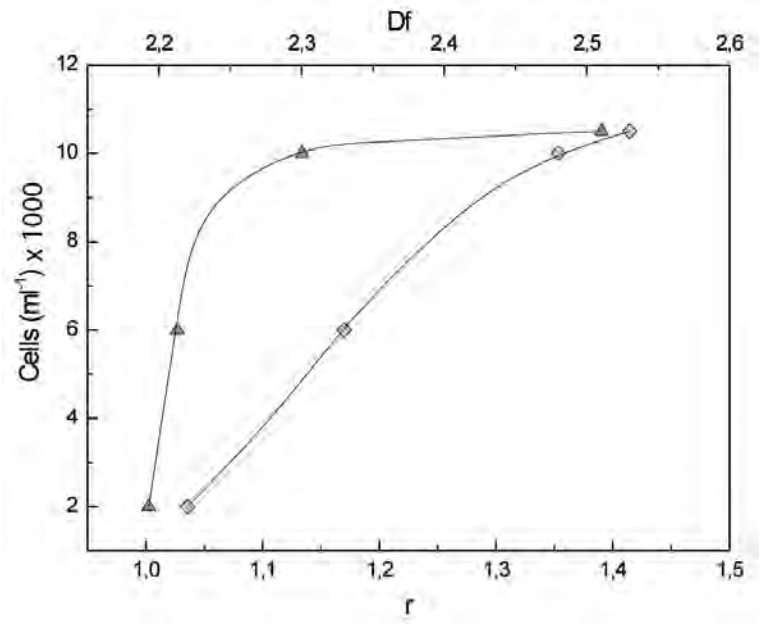
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Relationship between the amount of cells released from the samples and surface roughness described by statistical roughness parameters: Ra (squares) and Rq (circles)  
88x70mm (300 x 300 DPI)

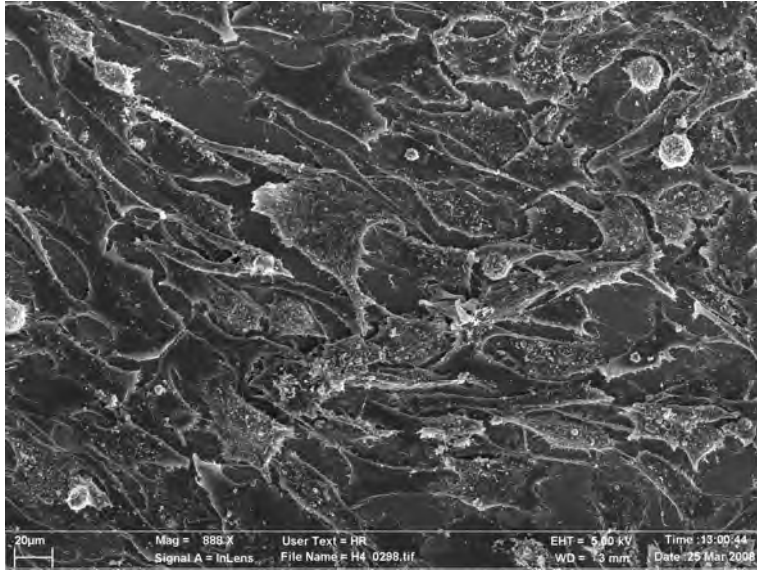
Research

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



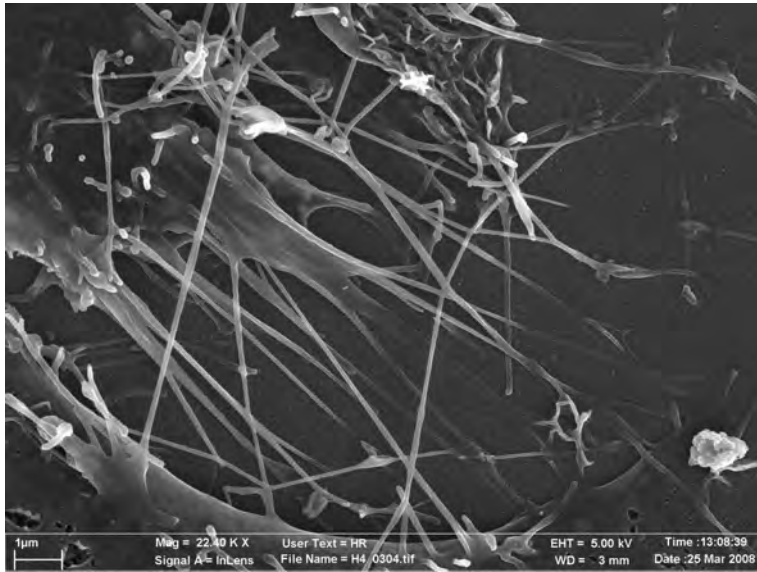
Relationship between the amount of cells released from the samples and surface roughness described by non-statistical roughness parameters: r (triangles) and Df (diamonds) 90x76mm (300 x 300 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Culture on methylated silica wafers presenting a clear tendency to cellular aggregation and coaggregation. Layers of overlapped cells are found sometimes  
52019x39014mm (1 x 1 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Primary prolongations branched into numerous secondary filaments  
52019x39014mm (1 x 1 DPI)

Clinical Oral Implants Research

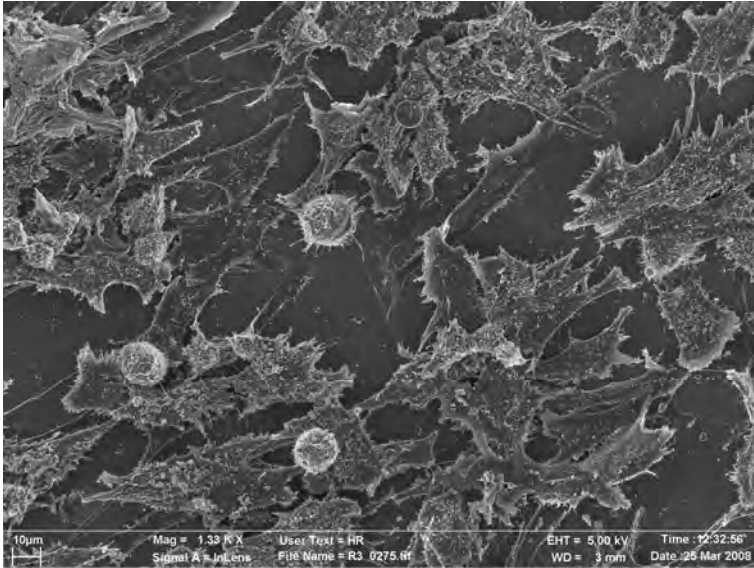
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Secretal-like vesicles on the cell membrane  
52019x39014mm (1 x 1 DPI)

Clinical Oral Implants Research

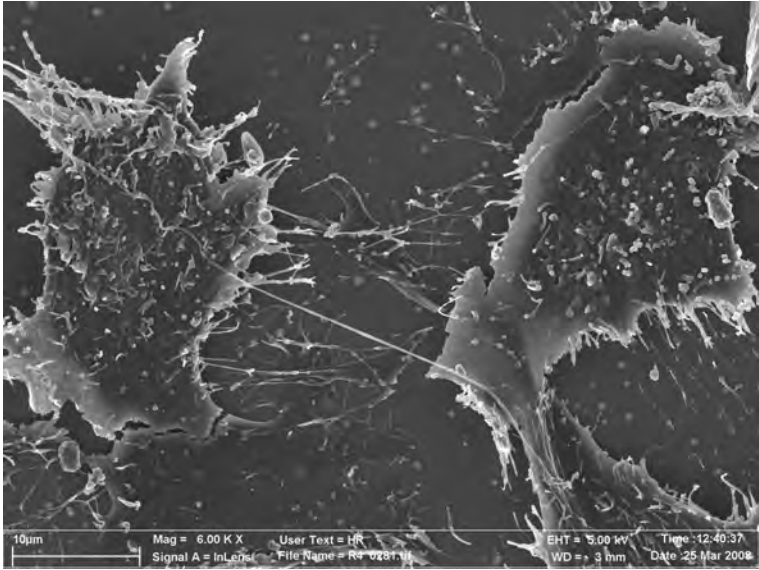
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Culture on a highly rough surface ( $R_a=16.6$  nm) showing a high spreading, random distribution and dispersion. Some spherical cells can be seen  
52019x39014mm (1 x 1 DPI)

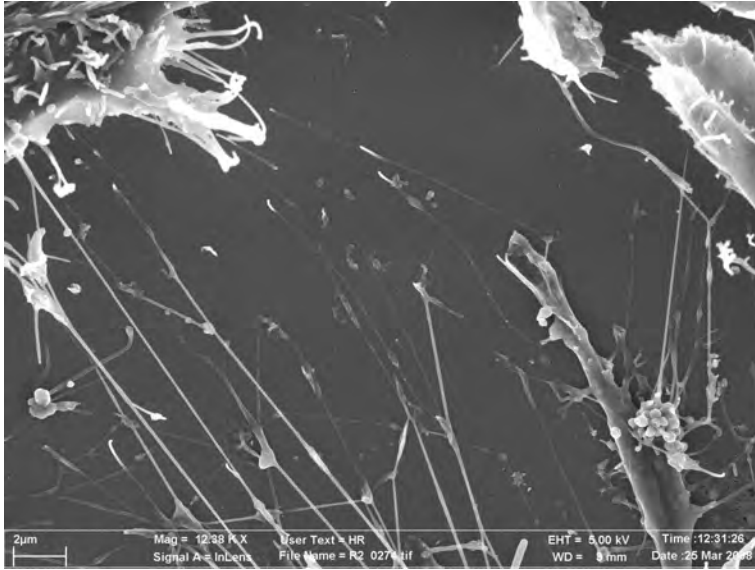


1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Cell morphology on highly rough silica surface showing a cube shape with dendritic extensions  
52019x39014mm (1 x 1 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Cytoplasmic prolongations from cells interacting among themselves and with the surface  
52019x39014mm (1 x 1 DPI)

its Research