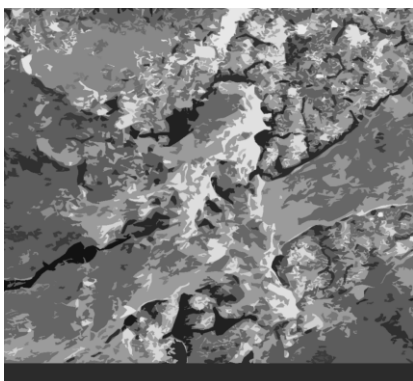
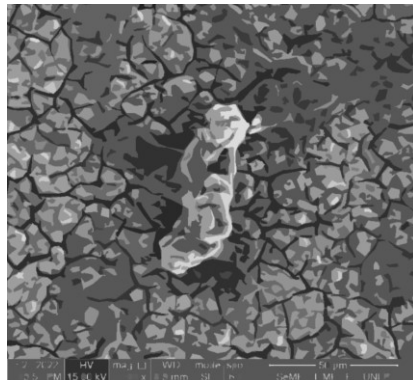
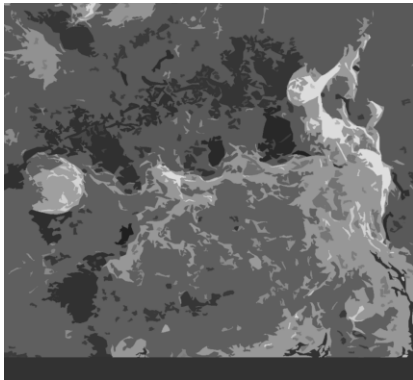


ESTUDIOS DE LA INTERACCIÓN IN VITRO DE CÉLULAS MADRE CON SUPERFICIES DE IMPLANTES DENTALES DE TITANIO.





Facultad de Ingeniería
Universidad Nacional de La Plata

----- TRABAJO FINAL -----

----- **AUTOR** -----

Juliana Inés Kohan

----- DIRECTORES -----

Dra. Karina Mayocchi
Inga. Lemos Barboza, Adriana Lucila

----- ESPECIALIDAD -----

Ingeniería en Materiales

----- Título -----

Estudios de la interacción *in vitro* de células madre con
superficies de implantes dentales de Titanio.

----- MESA EVALUADORA -----

Calificación en números y letras

Evaluador
Firma y aclaración

Evaluador
Firma y
aclaración
n

Evaluador
Firma y aclaración

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, compañeros/as y amigos/as que me acompañaron a lo largo de este camino, a mis directoras por su dedicación para enseñarme, a mis docentes por ampliarme la visión sobre el rol de la ingeniería para nuestra sociedad.

INDICE

OBJETIVO GENERAL	5
OBJETIVOS PARTICULARES	5
ALCANCE	5
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	6
1.1. Implantes dentales de Titanio	6
1.2. Métodos de modificación de superficie	9
1.3. Células madre mesenquimales: actividad celular	15
CAPÍTULO 2: TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	21
2.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	21
2.2. Espectrómetro dispersivo en energías (EDS)	24
2.3. Microscopía óptica	25
2.4. Método de conteo de celular: cámara de Neubauer	27
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1. Superficies	30
3.2. Cultivo de células – ensayos <i>in vitro</i>	31
3.3. Estudio de la pieza dental	32
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1. Superficies	33
4.2. Tiempos de ensayo	47
4.3. Tratamiento alcalino	47
4.4. Análisis de la pieza dental	48
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO	49
BIBLIOGRAFIA	51
ANEXO	55

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar superficies bioactivas, osteoinductoras y osteoconductoras para implantes dentales de Ti c.p que favorezcan la osteointegración de los dispositivos biomédicos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Desarrollar combinaciones de tratamientos superficiales en titanio para implantes dentales.
- Evaluar la biocompatibilidad entre las superficies de Titanio modificadas superficialmente y células madre mesenquimales (CMM) *in-vitro*.
- Caracterizar y comparar la influencia de los tiempos de cultivos y el comportamiento biológico de las CMM durante el cultivo *in-vitro*.

ALCANCE

El presente trabajo busca desarrollar superficies biocompatibles favoreciendo la regeneración ósea a partir de la disminución de los tiempos de cicatrización, y en consecuencia los tiempos de osteointegración del implante. Con las técnicas actuales, los tiempos entre la primera y segunda fase de cirugía son de cuatro a seis meses.

El estudio de dichas superficies es evaluado mediante ensayos *in-vitro* con células madre mesenquimales, particularmente el enfoque está dado hacia la evaluación de la interacción de las células con la superficie en estudio.

Se estudiarán las características físicas y químicas de las superficies y como éstas impactan en su biocompatibilidad. Para realizar la caracterización de las superficies y de los cultivos celulares, se utilizarán las técnicas de Microscopía Óptica, Microscopía Electrónica de Barrido y Espectroscopía Dispersiva en Energías.

RESUMEN CAPITULAR

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Los biomateriales son esencialmente materiales utilizados y adaptados para su uso médico. Como consecuencia de distintas afecciones médicas, en las últimas décadas se ha incrementado el uso de los biomateriales, ayudando de esta manera a mejorar la calidad de vida de los seres humanos. [1]

Se define a los biomateriales como sustancias implantadas dentro del cuerpo o utilizadas junto con él, diseñadas para tener propiedades que se asemejen a las del sistema biológico, sean lo suficientemente estables para el uso previsto, y tengan niveles apropiados de bioactividad, estando diseñados para cumplir parcial o totalmente las funciones de los tejidos y órganos enfermos, dañados o que funcionan mal. [2]

Particularmente, en el caso de implantes dentales, el incremento y la necesidad de su uso está relacionado con varios factores, que incluyen: el envejecimiento de la población que vive más tiempo, la pérdida de dientes en relación con la edad, las consecuencias de fallos de prótesis fijas, las consecuencias anatómicas del edentulismo (pérdida de piezas dentales), pobres resultados de las prótesis removibles, los aspectos psicológicos de la pérdida de dientes, las ventajas de las restauraciones soportadas con implantes y un mayor conocimiento de la población. [3]

En los últimos años, se ha puesto mucho esfuerzo en el diseño y proceso de fabricación de implantes, sobre todo desde la ingeniería de superficies, que permitan una mayor aceleración y robustez del proceso de osteointegración, contribuyendo a la disminución de la tasa de fracaso de los implantes por enfermedades periimplantarias. Se han desarrollado múltiples recubrimientos y tratamientos superficiales con el fin de estimular la osteogénesis mediante la diferenciación de las células madre mesenquimales a células osteoblásticas, con el propósito de conseguir una rápida y excelente calidad de osteointegración. [4] - [8]

No obstante, existe disparidad en cuanto a los efectos de las características superficiales generadas por los recubrimientos o tratamientos superficiales en la inducción de la diferenciación de células madre mesenquimales hacia células osteoblásticas [8] [9]. En la mayoría de los estudios realizados, se agregan factores de crecimiento exógenos o medios estimulantes, como las proteínas morfogenéticas óseas, para estimular la diferenciación de las células madre mesenquimales. [10] - [13].

1.1. Implantes dentales de Titanio

El Titanio y sus aleaciones son ampliamente utilizados como biomateriales debido a que cumplen con ciertos requisitos y ventajas frente otros materiales para esta aplicación. Se

destaca su biocompatibilidad, lo que refiere a la aceptación biológica y capacidad del material de ser utilizado en estrecha conexión con los tejidos vivos sin causar ningún tipo de reacción adversa (ya sea local o sistémica) sobre el organismo. [14] [1]. Dentro de los aspectos funcionales de la utilización de los implantes dentales, también se incluyen la transmisión de las fuerzas desde las superficies oclusales de los dientes a través de la corona, el puente y la región del conector del cuello del implante para asegurar la transmisión interfacial a los tejidos blandos y duros de soporte, sumado a que la parafunción (nocturna y/o diurna) puede ser enormemente perjudicial para el implante. Para soportar dichos esfuerzos y además conservar la integridad de la pieza como implante dental, deben ser consideradas las propiedades mecánicas del material a utilizar, tales como el límite máximo de resistencia, la resistencia a la fatiga, dureza, resistencia al desgaste, y ductilidad [3]. Teniendo en cuenta las mencionadas sollicitaciones, son destacables las propiedades mecánicas del Titanio en comparación con otras aleaciones utilizadas como implantes metálicos (Tabla 1). El Titanio además presenta una relativa baja densidad ($4,5 \text{ g/cm}^3$), por lo tanto, tiene una elevada relación resistencia mecánica/peso. Se debe mencionar la habilidad que presenta este material para pasivarse, es decir, formar espontáneamente una película de óxido (TiO_2) inerte, adherente y muy estable sobre la superficie del metal. Lo que le otorga excelentes propiedades respecto a resistencia a la corrosión en variados ambientes y la característica de ser un material bioinerte, ya que no genera ningún tipo de reacción ni modificación en el entorno del organismo y tampoco desarrolla una unión directa, adherente y fuerte con los tejidos duros y/o blandos. [15]

Tabla 1. Parámetros representativos de las propiedades mecánicas de implantes metálicos [16]

Material	Designación ASTM	Condición	Módulo de Young (GPa)	Límite elástico (MPa)	Tensión última (MPa)	Límite de fatiga (10^7 ciclos) (MPa)
Aceros inoxidables	AISI 316L	Recocido	190	221	483	221-280
	AISI 316 L	Recocido	190	331	586	241-276
		30% trabajado en frío	190	792	930	310-448
Aleaciones de Ti	F67	30% trabajado en frío Grado 4	110	485	760	300
	F136	Recocido	116	896	965	620
		Recocido tratado térmicamente	116	1034	1103	620-689

Es el Titanio seleccionado como el material de mejor opción debido a su naturaleza inerte y biocompatible, destacando como fue mencionado, su excelente resistencia a la corrosión.

En ausencia de movimiento interfacial o condiciones ambientales adversas, este estado pasivado (oxidado) superficial minimiza los fenómenos de biocorrosión. En situaciones en las que el implante estuviera colocado dentro de un receptor apropiado, lo suficientemente estrecho en su sitio dentro del hueso, las áreas ralladas o abrasionadas se repasivarían en vivo. Al ser el medio bucal un medio acuoso, los fenómenos electroquímicos actúan produciendo la repasivación. Esta característica es una propiedad importante a considerar relacionada con el uso de titanio para implantes dentales [3]

El diseño del implante y las condiciones de la superficie afectan a la dinámica de la osteointegración, lo cual es un requerimiento fundamental para el éxito de los implantes dentales. Se define osteointegración como el anclaje directo entre los tejidos periimplantarios y la superficie del implante mediante la formación de tejido óseo sin el crecimiento de tejido fibroso. [17] [3]. Este proceso se desencadena por un mecanismo que comienza con reacciones interfaciales (el cual será abordado más adelante).

Previo al estudio de la osteointegración, el uso de prótesis implantosoportadas daba lugar a menudo a la formación de una estructura fibrosa alrededor de los implantes, causando la movilidad y la pérdida posterior del implante. La observación de que el hueso puede crecer sobre estructuras de Titanio originó un nuevo camino en el estudio del anclaje intraóseo para prótesis dentales.

En el diseño de la interfase hueso-implante se presentan las siguientes cuatro fases diferenciadas:

1. Integración quirúrgica.
2. Dinámica de curación.
3. Período de carga precoz.
4. Período de carga tardía.

El período de curación inicial de un implante (que no está cargado inmediatamente) es la fase del proceso de osteointegración que está afectada principalmente por la condición superficial del implante. Por regla general, las superficies rugosas aumentan el porcentaje de contacto implante-hueso durante el proceso inicial de curación del hueso.

Una vez que el implante se inserta en su sitio del hueso (**Figura 1**), se inicia una cascada de acontecimientos biológicos. Al principio se produce la osteoconducción, que implica el reclutamiento y la migración de células osteogénicas a la superficie del implante. En segundo lugar, se produce la formación de hueso nuevo, causa de la formación de una matriz interfacial mineralizada seguida de un proceso de remodelación del hueso. Este fenómeno puede estar bajo la influencia de la microtopografía de la superficie [3]. El desarrollo del tratamiento entonces estará fuertemente influenciado por los mecanismos biológicos e interfaciales a ocurrir en la zona del implante. La segunda etapa del tratamiento de un implante dental consiste en la colocación de la corona al implante, lo que genera la aplicación

de carga sobre el mismo. Por lo tanto, para esta instancia, el proceso de curación debe haber sido exitoso. Los tiempos de tratamientos dependerán fuertemente de los tiempos de osteointegración. Además, una temprana colocación de la corona sobre implante dificultaría el paso de Oxígeno, interrumpiendo la diferenciación de las CMM al linaje osteoblástico, impidiendo que se lleve a cabo la osteointegración del implante. Por lo tanto, desde la ciencia e ingeniería de los materiales, se busca el desarrollo de superficies que favorezcan la actividad celular sobre la misma, generando una temprana osteointegración y acortando los tiempos de cicatrización de implantes dentales.

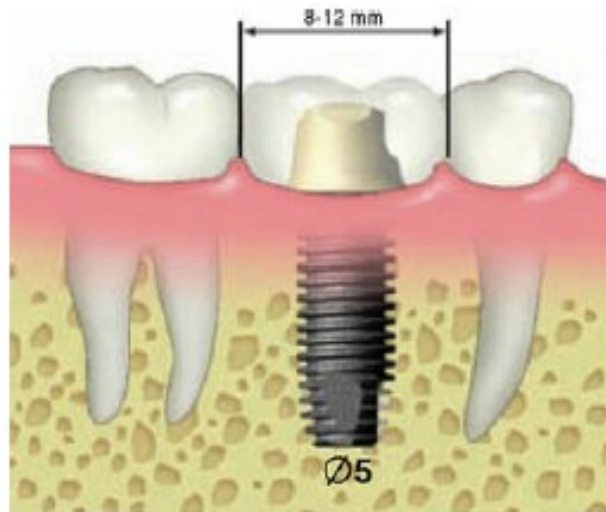


Figura 1. Implante dental insertado en el sitio del hueso. [3]

1.2. Métodos de modificación de superficie

Como se ha mencionado, las características superficiales tienen gran influencia en la interacción del implante con el organismo. Existen métodos de modificación de superficie realizados para mejorar las características del Titanio como biomaterial aumentando su bioactividad, lo cual refiere a interacciones o efectos que los materiales ejercen sobre las células con el fin de conducir o activar a las células hacia respuestas o comportamientos específicos. [18]. Particularmente en los implantes dentales, dicho comportamiento refiere a la adhesión y actividad celular, es decir, proliferación, diferenciación y producción de matriz extracelular, orientando a lograr la osteointegración del implante, disminuyendo los tiempos de tratamiento y la probabilidad de fracaso de los implantes. La bioactividad del material se ve fuertemente influenciada por las características superficiales. Un principio fundamental de la biología celular consiste en que lo que una célula toca tiene un papel importante en la determinación de lo que una célula hace. Dependiendo de la aplicación específica, un método adecuado de modificación de superficie puede resultar en un aumento o reducción de la adsorción de proteínas, alteración de la trombogenicidad superficial, control de adhesión celular, crecimiento y diferenciación,

modulación de la encapsulación fibrosa, etc. [14]. En los implantes dentales de Titanio se ha obtenido una buena osteointegración con modificaciones en la topografía de la superficie, sin embargo, se continúa con el estudio de una gran variedad de recubrimientos inorgánicos y orgánicos para alcanzar una mejora en la integración del tejido. [7]

Por lo tanto, se buscan establecer las mejores condiciones superficiales para lograr actividad celular sobre la superficie. Las propiedades de la superficie como la composición química, topografía (rugosidad), carga superficial, energía superficial y mojabilidad, tienen influencia en la respuesta biológica de un material implantado. [14]

La **composición química** es de importancia ya que define los grupos funcionales que tendrán interacción con las biomoléculas presentes en el organismo, las cuales tendrán mayor afinidad a determinadas superficies. En superficies de Titanio, los efectos biológicos de la química superficial están relacionados principalmente con la estructura de la capa de óxido de titanio (TiO_2). La adición de iones tales como Calcio, Azufre, Fósforo, o Magnesio a la capa de óxido de titanio nativo a través de los métodos de oxidación electroquímica se utilizan ampliamente para modificar la superficie química de los implantes metálicos. [14]. La composición química de la capa de adsorción de la superficie puede impactar en la progresión del linaje de las células, por lo que elementos presentes en la superficie beneficiarían el linaje a diferenciar. [14] [19].

La **topografía y rugosidad superficial** del implante es un factor clave que afecta la adhesión, morfología celular, auto orientación, proliferación y diferenciación, y tiene una influencia significativa sobre la señalización celular de células adherentes al implante. Además, se genera una mayor área superficial para la interacción con las células [14].

Todos los materiales de implante destinados a aplicaciones bioactivas deben contener características topográficas complejas. Este aspecto está inspirado en procesos biológicos que ocurren naturalmente en la remodelación ósea: la reabsorción de la superficie del hueso viejo por los osteoclastos proporciona una superficie topográficamente muy compleja donde se deposita la nueva matriz ósea. Se ha demostrado que la rugosidad de la superficie induce diferenciación de CMM a un fenotipo osteoblástico y mejora la maduración de los osteoblastos. Sin embargo, cómo exactamente la rugosidad de la superficie induce la diferenciación de CMM es un mecanismo que aún no está claro. [20]

La topografía de la superficie también se puede alterar creando estructuras porosas (por ejemplo, revestimientos porosos) de los biomateriales metálicos. Como resultado, el material poroso del implante puede adherirse fuertemente al hueso creciendo hueso en los poros interconectados. Se han realizado estudios donde concluyen que el tamaño de poros en el rango de 200-500 μm mejora la osteointegración [14]. Esta mejora se relaciona con que la formación de poros sobre la superficie de Titanio incrementa además la hidrofiliidad de la

superficie y la adsorción de proteínas, con un efecto significativo en la diferenciación y bioactividad celular logrando buenas características de adhesión. La superficie porosa resulta entonces una superficie biomolecular con gran potencial para aplicaciones de implantes óseos. [21]

En cuanto a la **carga superficial**, se tiene en cuenta el papel de las interacciones electrostáticas en muchos eventos biológicos, ya que la presencia de carga superficial en la interfase solido-solución es una de las principales propiedades metálicas que modulan tanto la adsorción de proteínas como la adhesión celular. Las superficies cargadas positivamente promueven la adhesión celular, mientras que las superficies cargadas negativamente la reducen.

Por último, la **energía superficial y mojabilidad** de la superficie tendrán gran influencia en el comportamiento del biomaterial en el organismo.

La superficie de un material es la terminación de una estructura tridimensional extendida y por lo tanto, generalmente representa un aumento de energía, es decir, la energía superficial. Sobre los recubrimientos superficiales de los biomateriales metálicos, a escala atómica, esta energía está presente como enlaces químicos no enlazados. La energía de enlace de la molécula superficial es menor que la energía de enlace asociada con una molécula de fase masiva, los enlaces químicos se disponen en el espacio fuera del material sólido y darán como resultado que los átomos de la superficie tengan mayor energía que los átomos del interior. Los átomos de la superficie intentarán reducir la energía libre reorganizándose y/o uniéndose a cualquier molécula reactiva disponible, como aire o agua en una superficie metálica, para alcanzar un estado de energía más favorable. El término energía superficial también está estrechamente relacionado con la mojabilidad. Mientras que la energía superficial describe las interacciones con distintos materiales, la mojabilidad de la superficie (es decir, la hidrofiliidad e hidrofobicidad) describe estas interacciones con líquidos. La mojabilidad es el grado en que una superficie sólida es mojada por un líquido, generalmente expresado como ángulo de mojado. Dado que líquidos (cómo por ejemplo el agua) tienen una gran capacidad de mojado, un material de alta energía superficial puede tener mayor interacción con los líquidos y, en consecuencia, será más *hidrofilico*. Para superficies de implantes de Titanio, el ángulo de contacto las mediciones dan valores que van de 0° (hidrofilico) a 140° (hidrofóbico). Se ha demostrado que al aumentar hidrofiliidad se induce un mayor contacto hueso-implante, diferenciación de osteoblastos, producción de factores de crecimiento y expresión de genes osteogénicos.

Cuando se coloca un material de implante dentro del cuerpo humano, la mojabilidad del material se encuentra entre los primeros y más importantes eventos que tienen lugar por los fluidos fisiológicos. Esto controla la adsorción de proteínas, seguido de la adhesión de las

células a la superficie del implante. Por lo tanto, la mojabilidad de la superficie se considera un criterio importante que tiene influencia en la biocompatibilidad del implante.

Las características superficiales mencionadas afectarán entonces al comportamiento superficial del biomaterial, ya que cada una aportará modificaciones en el comportamiento biológico y además se relacionarán unas con otras, como por ejemplo, se menciona que los tres factores más importantes que afectan la mojabilidad de una superficie son su composición química, topografía microestructural y carga superficial.

La búsqueda de las mejores condiciones superficiales para los implantes dentales estará dada por el estudio de la modificación de estas características superficiales, sin afectar las propiedades volumétricas de la pieza (resistencia, relación densidad/peso, biocompatibilidad), con el fin de lograr superficies bioactivas, osteoinductoras y osteoconductoras para implantes dentales de Ti c.p que disminuyan los tiempos de osteointegración de los dispositivos biomédicos. [14] [22]

Dentro de esta búsqueda, existen distintos métodos de modificación de superficie, los cuales pueden ser químicos y/o mecánicos, entre ellos;

Granallado con partículas de fosfato de Calcio o blastinizado (B):

El blastinizado o *blasting*, es una técnica de proyección de partículas que genera una deformación plástica localizada y también una remoción de material. Es una técnica ampliamente utilizada para la remoción de contaminantes gruesos y como operación de terminación superficial en la manufactura de componentes metálicos.

Se agrega fosfato de Calcio sobre la capa de óxido de titanio y se obtiene en la superficie una modificación química inorgánica, la cual podría estimular la regeneración ósea y aumentar el entrelazamiento químico entre las proteínas de la matriz ósea y los materiales de la superficie, generando también modificaciones de carga superficial. El tratamiento de blastinizado crea una superficie rugosa irregular con surcos, crestas, valles, etc. (Figura 3 (a).) [23] [24].

Anodizado por plasma químico (APQ):

El anodizado por plasma químico (APQ), es utilizado para modificar las superficies de Ti-CP en aplicaciones biomédicas. Mediante la combinación de una modificación química y morfológica en un proceso simple, se modifica la composición del recubrimiento (con agregado de Ca/P), la microestructura, y además se produce una porosidad sobre la superficie que es beneficiosa para la posterior osteointegración. [25]

Es una técnica avanzada que produce recubrimientos cerámicos sobre superficies metálicas con óxidos nativos dieléctricos muy adherentes (como el Aluminio, Titanio,

Magnesio, entre otros). Se exhibe una topografía característica de microporos, la mayoría presentan una geometría circular, aunque también se pueden observar formas elipsoidales e irregulares (**Figura 3 (c).**) La porosidad es generada durante la etapa de ruptura dieléctrica del tratamiento de anodizado por plasma químico.

En comparación con la superficie de Titanio mecanizada, la superficie tratada por APQ tiene menor ángulo de contacto (mayor hidrofiliidad), y mayor micro rugosidad. Sin embargo, si la capa de óxido es relativamente gruesa en la superficie, se ve afectada la adhesión de las células, lo que podría relentecer el proceso normal de osteogénesis. [7] [26]

Grabado ácido con previo granallado con partículas de fosfato de Calcio:

El grabado ácido (GA), es un tratamiento llevado a cabo mediante un ataque con fuertes ácidos como ácido nítrico, ácido fluorhídrico y ácido sulfúrico, o sus combinaciones. El tratamiento de GA con previo granallado modifica la topografía, incrementando la hidrofiliidad y energía superficial. Estas características además se relacionan con la química superficial, que puede ser modificada incrustando determinados elementos según el tipo de ácido utilizado [19]. Se crea una rugosidad y composición que disminuyen los tiempos de osteointegración a través de un mayor contacto entre el hueso y el implante. [27]

En la **Figura 3 (e)**. se observa la topografía obtenida mediante el tratamiento de GA.

Tratamiento alcalino en NaOH

El tratamiento alcalino es un tratamiento químico que crea una capa con estructura de red tridimensional con poros de tamaño nanométrico [20]. Esta se desarrolla en forma de pluma, compuesta de un hidrogel de titanato de Sodio. Su desarrollo consiste en mantener la superficie de Ti mojada en una solución con concentración molar y temperatura determinadas por un cierto período de tiempo¹, de esta forma los iones de Sodio y Oxígeno serán incorporados en la superficie con una profundidad de 1 μm (**Figura 2**). [28]

¹ Las condiciones de concentración, tiempo y temperatura del tratamiento alcalino estarán definidas por la investigación a realizar.

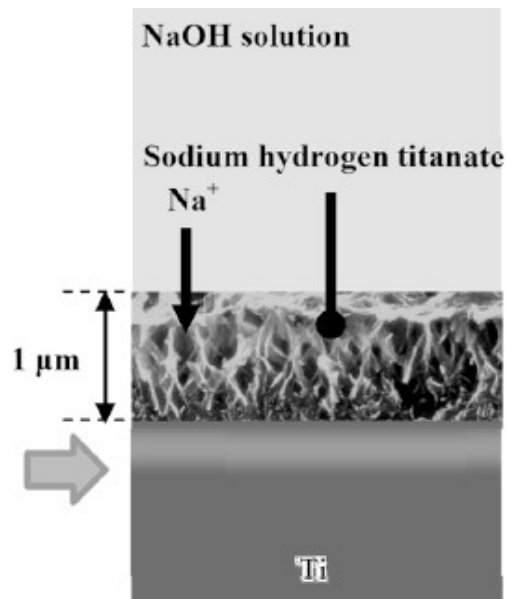
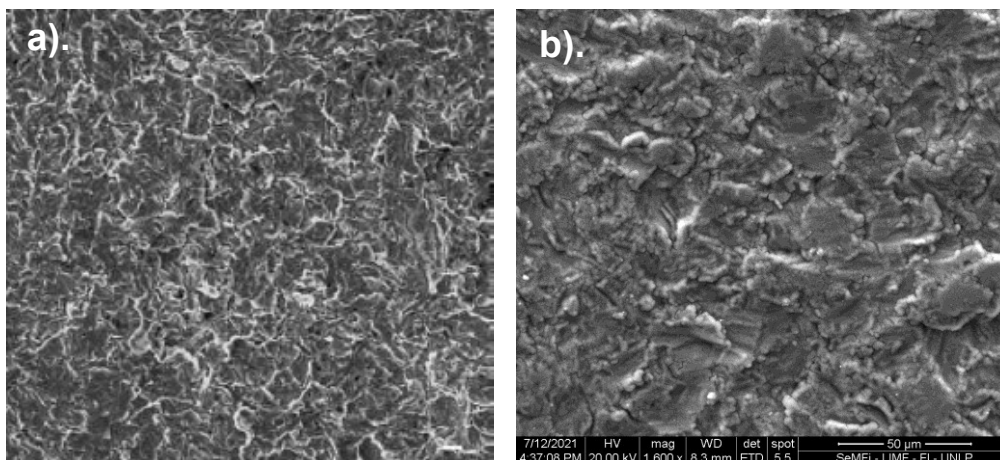


Figura 2. Cambios estructurales de la superficie de Titanio sujetos al tratamiento alcalino en NaOH [28].

La estructura observada correspondería al hidrogel de titanato de sodio. Según Wei y colaboradores, el espesor de hidrogel de titanato aumenta al aumentar la concentración de hidróxido de Sodio en la solución acuosa. Según Camargo y colaboradores, el tratamiento alcalino genera una superficie bioactiva, con una composición superficial que influencia positivamente la capacidad de formación de una matriz mineralizable, resultando esta mucho más rápida en comparación con superficies de Titanio sin tratamiento alcalino. [29]

Cuando las gotas de agua se depositan en la superficie de las muestras tratadas con NaOH se dispersan rápidamente, este resultado indicaría una alta energía superficial, adhesividad y mojabilidad de las superficies. Características superficiales que podrían acortar los tiempos de cicatrización y en consecuencia los tiempos de osteointegración de los implantes. [30]

En las figuras 3, (b), (c) y (d) se observan imágenes de superficies de Titanio con tratamiento alcalino en NaOH.



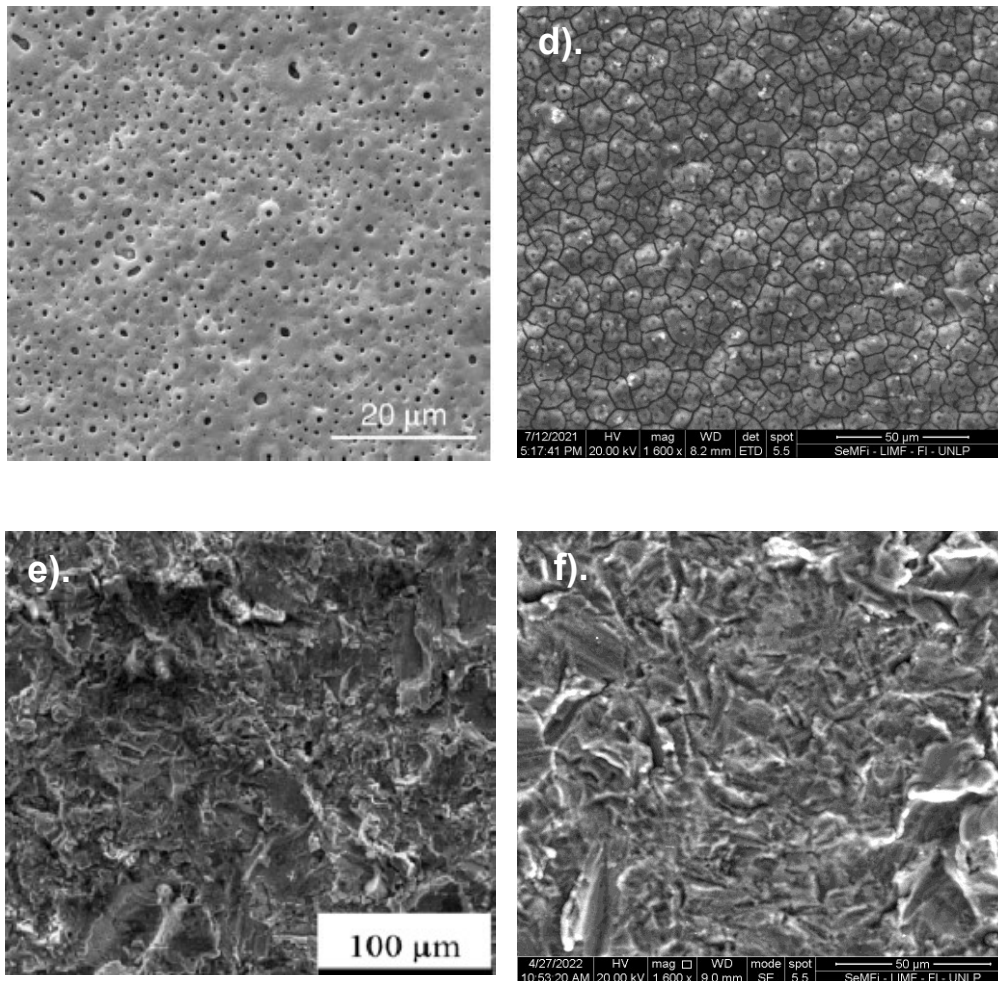


Figura 3. Imágenes SEM, correspondientes a las superficies en estudio. **a).** Blasting (1000x) [31] **b).** Blasting con tratamiento alcalino. **c).** Anodizado por plasma químico [32]. **d).** Anodizado por plasma químico y tratamiento alcalino. **e).** Grabado ácido [33] **f).** Blasting con grabado ácido y tratamiento alcalino.

1.3. Células madre mesenquimales: actividad celular

- **Células Madre (C.M.).** Las células madre son células indiferenciadas que tienen capacidad para autorrenovarse, ser clonogénicas y diferenciarse en distintas estirpes celulares [34]. Estas se clasifican según su origen (embrionario o adulto), el tejido sobre el que asientan (los nichos proveen a las células troncales las condiciones necesarias para regular su fisiología y preservar su estado de "célula troncal". Estos pueden ser: médula ósea, piel, tejido adiposo, cordón umbilical, folículo piloso, intestino, sistema nervioso y diente), potencial de diferenciación (totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales, oligopotenciales, unipotenciales). [35]
- **Células madre mesenquimales:** Los nichos de las células madre adultas llamadas células madre mesenquimatosas, se hallan en el tejido conjuntivo laxo del adulto.

Estas células dan origen a células diferenciadas que funcionan en la reparación y formación de nuevo tejido, como es el caso de la cicatrización de heridas y del desarrollo de nuevos vasos sanguíneos (neovascularización). Las células madre dentales tienen potencial de multidiferenciación y por tanto pertenecen al grupo de células madre adultas, tienen la capacidad de formar células con carácter osteo/odontogénico, adipogénico y neurogénico [35]. En la cavidad oral podemos encontrarlas en la pulpa, en el folículo dental y en el tejido conectivo gingival entre otros. La pulpa posee células mesenquimáticas indiferenciadas que derivan del ectodermo de la cresta neural, constituyendo una verdadera reserva celular, poseen capacidad de diferenciarse en nuevos odontoblastos o fibroblastos según el estímulo que actúe sobre ellas. [36]

- **Diferenciación:** Resulta de la especialización estructural y funcional de células individuales. La capacidad de una célula de diferenciarse en distintos tipos celulares se denomina potencia (por ej. La CMM es multipotente y de ella derivan osteoblastos, fibroblastos, condroblastos, etc.). [37]
- **Osteoblasto:** El osteoblasto es la célula formadora de hueso diferenciada que secreta la matriz ósea. Al igual que sus parientes cercanos, el fibroblasto y el condroblasto, el osteoblasto es una célula secretora versátil que conserva la capacidad de dividirse. Secreta tanto el colágeno tipo I (que constituye el 90 % de la proteína ósea) como las proteínas de la matriz ósea, que constituyen la matriz no mineralizada inicial, llamada **osteoide**. A medida que se deposita la matriz osteoide, el osteoblasto queda finalmente rodeado por ella y, por lo tanto, se convierte en un osteocito. El osteoblasto también es responsable de la calcificación de la matriz ósea. [38]
- **Adhesión:** La adhesión celular a la superficie del implante se define como el primer paso fundamental a ocurrir en las funciones biológicas para el desencadenamiento de un mecanismo de osteointegración [39]. En la caracterización celular, una condición necesaria de las CMM es su adherencia a una placa de plástico (placa de Petri).
- **Actividad celular:** El término refiere a la actividad biológica que desarrolla la célula sobre la superficie, es decir, crecimiento, síntesis de proteínas, comunicación intercelular. Con el microscopio electrónico se ve que los osteoblastos poseen proyecciones citoplasmáticas muy delgadas que se introducen en el osteoide producido por la célula y entran en contacto con las proyecciones similares de osteocitos vecinos mediante uniones de hendidura. Esta formación inicial de uniones entre un osteoblasto y los osteocitos contiguos (como así también entre los osteoblastos contiguos) permite que las células vecinas dentro del tejido óseo se comuniquen [38].

- **Matriz extracelular:** Los espacios intercelulares están ocupados por un material producido por las células. Este material extracelular recibe el nombre de matriz extracelular. La índole de las células y de la matriz varía de acuerdo con la función del tejido. Por lo tanto, para la clasificación del tejido conjuntivo no sólo se tienen en cuenta las células sino también la composición y organización de la matriz extracelular. Por ejemplo, el hueso tiene una matriz mineralizada por Calcio y moléculas de fosfato que están asociadas con las fibras de colágeno [38].
- **Mineralización:** La mineralización se lleva a cabo en la matriz extracelular del hueso y del cartílago, y en la dentina, el cemento y el esmalte de los dientes. Es un fenómeno regulado por células. En los sitios donde se inicia la mineralización de hueso, cartílago, dentina y cemento, la concentración local de iones Ca^{+2} y PO_4^{-3} en la matriz deben exceder el nivel del umbral normal. Varios acontecimientos son responsables de esta mineralización: la fijación de Ca^{+2} extracelular por la osteocalcina y otras sialoproteínas crea una concentración local alta de este ion. La concentración alta de Ca^{+2} estimula los osteoblastos para que secreten fosfatasa alcalina (ALP), que aumenta la concentración local de iones PO_4^{-3} . La concentración alta de PO_4^{-3} estimula el aumento adicional de la concentración de Ca^{+2} en donde se iniciará la mineralización [38].

La osteogénesis, es el proceso de formación del hueso nuevo, lo cual es esencial para la función ósea normal. Se requiere una población de células osteoprogenitoras renovables (células precursoras de osteoblastos) que son sensibles a los estímulos moleculares que las transforman en células formadoras de tejido óseo. Las células osteoprogenitoras derivan de células madre mesenquimatosas de la médula ósea que tienen el potencial de diferenciarse en diferentes tipos celulares, incluidos fibroblastos, osteoblastos, adipocitos, condrocitos y células musculares [38].

En la colocación de implantes dentales, las células osteoprogenitoras, son las que migran hacia la superficie del implante desde el tejido circundante, siendo un evento clave para la osteointegración, para la cual es necesaria la diferenciación de CMM a osteoblastos. Por lo tanto, el estudio realizado *in-vitro* en CMM proporciona buena información acerca de la interacción implante-células [19].

Importancia de la osteointegración del implante

La osteointegración es un requerimiento fundamental para el éxito de los implantes dentales. Como ya ha sido mencionado, se define como el **anclaje directo entre los tejidos periimplantarios y la superficie del implante** mediante la formación de tejido óseo sin el crecimiento de tejido fibroso. Este proceso se desencadena por un mecanismo en cascada

que comienza con las reacciones interfaciales de la superficie del implante, las células sanguíneas, el tejido conectivo y las CMM provenientes del mismo.

En las condiciones ideales, luego de la colocación de un implante de Titanio, se forma un coágulo de sangre entre la superficie del implante y las paredes del lugar donde se efectuó la osteotomía. Las proteínas plasmáticas son atraídas al área, las plaquetas se activan y se liberan citoquinas y factores de crecimiento. Comienza la angiogénesis y las células madre mesenquimales migran a través de la estructura de fibrina del coágulo hacia el sitio de la osteotomía y la superficie del implante. Estas células se diferencian en osteoblastos y comienzan a depositar osteoide (matriz mineralizable). El tejido óseo es un tejido conectivo y como tal está compuesto por células y matriz extracelular. Existen cinco tipos de células presentes en el tejido óseo: las células osteoprogenitoras, los osteoblastos, los osteocitos, las células de revestimiento óseo y los osteoclastos.

La formación de tejido óseo ocurre a partir de las células osteoprogenitoras (células mesenquimales indiferenciadas) las cuales se diferencian en células osteoblásticas, a partir de distintos estímulos biológicos que se originan en el interior de las células osteoprogenitoras. Las células osteoblásticas secretan colágeno y distintas proteínas que compondrán la matriz ósea. Con el tiempo, la matriz se mineraliza (aumento en la concentración de Ca^{+2} y fosfatos), y las células rodeadas con matriz extracelular que quedan incluidas en lagunas denominadas osteoplastos, pasan a llamarse osteocitos. El hueso en este estadio tiene características membranosas y crece por un fenómeno llamado crecimiento aposicional en donde los osteoblastos secretan más matriz sobre la previamente formada, haciendo crecer esta estructura y dando, gradualmente, la configuración final al hueso [38].

La importancia de este mecanismo se debe a que una incorrecta osteointegración del implante podría concluir en el fracaso del tratamiento, generando efectos adversos en la salud del paciente. A su vez, el estudio del desarrollo de una superficie osteointegrable en tiempos más acotados, aseguraría el éxito del implante, generando beneficios al disminuir los tiempos de tratamiento y las probabilidades de la presencia de enfermedades periimplantarias [3].

Se describe el mecanismo de osteointegración en etapas;

1. Formación del coágulo de sangre en el sitio de la osteotomía.
2. Las células sanguíneas que están presentes generan una señal que atrae a las CMM hacia el sitio (las CMM tienen la característica de ser receptoras y migrar).
3. Migración de las CMM hacia el sitio de osteotomía y superficie del implante.
4. Adhesión de las CMM a la superficie.
5. Diferenciación de las CMM al tipo de célula osteoblástica.
6. Maduración de las células diferenciadas (se desarrollan como células osteoblásticas).

7. Las células diferenciadas generan colágeno, que luego genera la matriz mineralizable.
8. La matriz finalmente crecerá formando la estructura del hueso.

Se presenta dicho mecanismo en la **Figura 4**, de forma resumida. Haciendo principal hincapié en las etapas dónde es determinante el rol de la superficie.

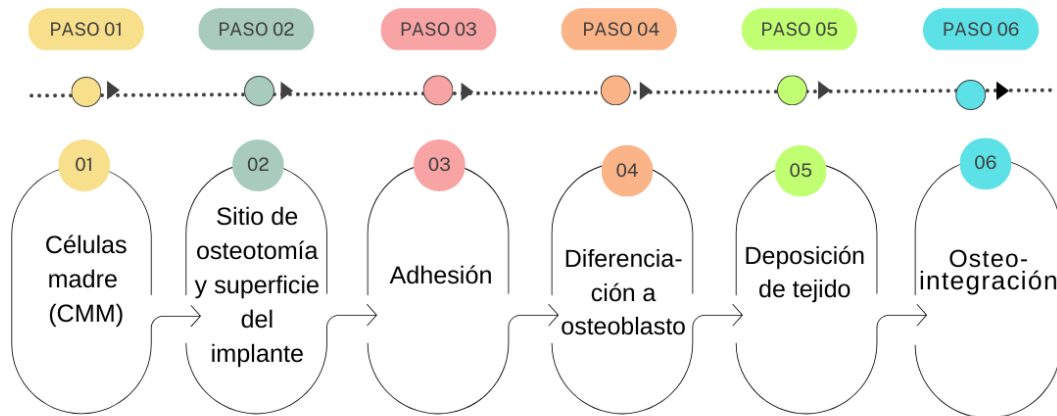


Figura 4. Representación esquemática del mecanismo en cascada de osteointegración [Elaboración propia].

Se logra entender la importancia de las características superficiales mencionadas en el apartado 1.2. Siendo que deben de ser adecuadas para lograr la adhesión y diferenciación celular, principales eventos dentro del mecanismo de osteointegración del implante. La característica que distingue el tejido óseo de otros tejidos conjuntivos es la mineralización de su matriz, que produce un tejido muy duro capaz de proporcionar sostén y protección. La composición química del mineral formado durante el proceso de osteointegración es fosfato de Calcio en forma de cristales de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. La matriz ósea contiene sobre todo colágeno tipo I junto con otras proteínas (no colágenas) de la matriz. Las proteínas son biopolímeros (macromoléculas orgánicas), constituidas básicamente por carbono (C), Hidrógeno (H), Oxígeno (O) y Nitrógeno (N); aunque pueden contener también Azufre (S) y Fósforo (P) y, en menor proporción, Hierro (Fe), Cobre (Cu), Yodo (Y) y Magnesio (Mg). La formación de la matriz mineralizada es un buen indicador del comportamiento osteointegrable del implante [38].

Cultivo de células

El cultivo de células está formado por células disgregadas directamente de un tejido vivo, de un cultivo primario o de una línea celular. Son células que se mantienen en suspensión o crecen formando una monocapa. Por lo general son cultivos que contienen uno o pocos tipos celulares.

El pequeño fragmento de tejido u órgano a partir del cual crecen las células ubicadas en las zonas más periféricas se denomina **explante primario**. Y los cultivos en los cuales las células crecen desde un explante o se aíslan mediante tratamiento mecánico o enzimático, son los **cultivos primarios**. Desde este cultivo primario, las células siguen creciendo por un número limitado de generaciones hasta que entran en senescencia (en el caso de una línea celular finita). Las células derivadas de un cultivo primario pertenecen al **cultivo secundario**. De esta forma se realizan **pasajes** celulares, que consisten en un ciclo donde las células crecen y se dividen mediante el mecanismo de mitosis. A medida que aumenta el número de pasajes, se homogeniza el tipo celular a CMM, y se libera de otros tipos de células como pueden ser fibroblastos u otros tipos celulares incluidos en los pasajes iniciales del cultivo, provenientes del explante primario.

El estudio *in vitro* consiste en células aisladas que no están organizadas como tejidos, derivadas de células dispersas obtenidas a partir del tejido original. En la mayor parte de los experimentos es necesario utilizar un único tipo celular para reducir la variabilidad. Para ello se pueden dejar a las células crecer (utilizar células correspondientes a un pasaje alto, que podría ser un pasaje siete u ocho), controlar la composición del medio de crecimiento, o separar las células mediante gradientes de densidad [40].

Objetivos del cultivo de células:

- Aislar células de diferentes tejidos que conserven las características morfológicas y funcionales similares a la situación *in vivo*.
- Lograr que las células proliferen de forma indefinida *in vitro*, constituyéndose en una herramienta (amplificación).
- Caracterizar los efectos del medio ambiente sobre la célula y determinar sus mecanismos.
- Reconstruir a la célula y su medioambiente como una unidad funcional.
- Reconstruir la célula y su medio en tejidos y órganos.

[41]

Ventajas del cultivo de células:

- Estudiar el comportamiento celular sin las variaciones que ocurren en el cuerpo o animal entero y evitar los problemas legales, éticos y morales de la experimentación con animales.
- Uniformidad en las muestras y reproducibilidad entre experimentos causada por el mantenimiento de las características de las células por varias generaciones.
- Exposición de los cultivos a diferentes reactivos en concentraciones definidas.

Desventajas del cultivo de células:

- Para mantener células saludables y experimentos reproducibles se requiere el desarrollo de técnicas estandarizadas.
- Requiere tiempo de aprendizaje de la técnica séptica de trabajo.
- A lo largo del cultivo puede ocurrir desdiferenciación y selección, y muchas de las funciones celulares se pueden perder.

[41]

CAPÍTULO 2: TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

El estudio del comportamiento celular sobre las superficies de Titanio es de relevada importancia ya que se aborda el análisis desde distintos aspectos y se brinda un mejor beneficio para el estudio posterior de los dispositivos biomédicos in-vivo. Las técnicas de caracterización como ser Microscopía Óptica, Microscopía Electrónica de Barrido (*SEM*) y Espectroscopía de dispersión de energía (*EDS*) serán las herramientas utilizadas en el presente trabajo para caracterizar el comportamiento celular.

A partir del análisis de las distintas técnicas de caracterización se evalúa el comportamiento de las células sobre las superficies para su uso en el campo de la biomedicina.

2.1. Microscopía electrónica de barrido (*SEM*)

El microscopio electrónico de barrido (*SEM*, siglas en inglés de *Scanning Electron Microscopy*) es utilizado para el examen y análisis de características microestructurales de objetos sólidos. Este equipo se caracteriza por su alta resolución (de 20 a 50 Å) y por la apariencia topográfica de la imagen de la muestra, resultado de su gran profundidad de foco [42].

Para obtener una imagen por microscopía electrónica de barrido, se enfoca un haz de electrones muy fino sobre la superficie de la muestra sólida [43]. Debido a las interacciones que se producen entre el haz primario de electrones y la muestra (dentro de la región conocida como volumen de interacción) se pueden generar diversos tipos de señales. Aquellos que resultan de interés para la técnica de *SEM*, corresponden a:

- **Electrones retrodispersados:** Corresponden a aquellos electrones del haz primario que interactúan de forma elástica² (debido al alto campo Coulombiano existente en las cercanías del núcleo de los átomos de la muestra) y que terminan desviando su trayectoria [42].
- **Electrones secundarios:** Son aquellos electrones de valencia³ de los átomos de la muestra que, por medio de una interacción inelástica⁴ con el haz incidente, reciben la energía suficiente para ser eyectados como electrones secundarios de baja energía. (<50eV) [42].

Los electrones retrodispersados de alta energía son útiles porque la intensidad de la señal retrodispersada refleja la densidad de masa o el número atómico promedio de la muestra y no sólo la topografía de la superficie. Las regiones más brillantes son, por lo tanto, una indicación clara de una zona más densa o con un número atómico medio más alto. Mientras que, la señal electrónica secundaria es la más útil para construir una imagen topográfica de alta resolución. Puesto que los electrones secundarios son generados con bajas energías (del orden de los eV), sólo alcanzan a abandonar la muestra los que fueron originados en una delgada capa, de unos pocos nm, sobre la superficie de la muestra. [44]

Las señales generadas provienen de distintas profundidades de la muestra, tal como se muestra en la [Figura 5](#). Volumen de interacción y volúmenes a partir de los cuales emergen cada una de las señales utilizadas en SEM (electrones secundarios y retrodispersados) y en la técnica de espectroscopía dispersiva en energías (rayos X característicos). Extraído de

² Interacciones elásticas: Son aquellas en donde la modificación en la energía cinética del electrón incidente es despreciable y existe un cambio en la trayectoria de este.

³ Los electrones de valencia corresponden a los electrones periféricos y más débilmente unidos al núcleo.

⁴ Interacciones inelásticas: Son aquellas en donde existe un cambio de energía de los electrones incidentes, pero cuyo cambio de trayectoria resulta despreciable. .

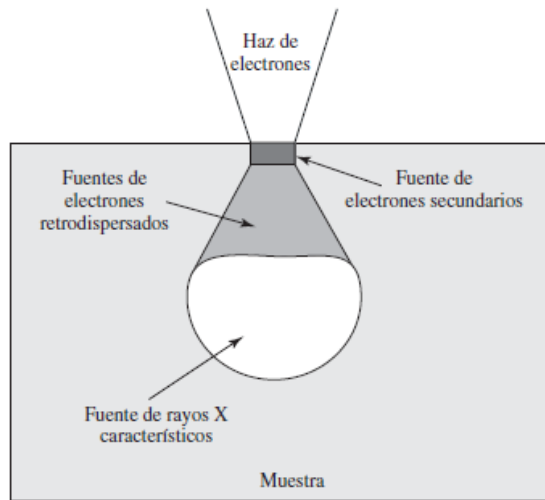


Figura 5. Volumen de interacción y volúmenes a partir de los cuales emergen cada una de las señales utilizadas en SEM (electrones secundarios y retrodispersados) y en la técnica de espectroscopía dispersiva en energías (rayos X característicos). Extraído de [43].

Los componentes principales de un SEM son; el sistema de vacío, la fuente y la columna de electrones, la cámara porta muestras y el sistema de adquisición y procesamiento de imágenes (ver **Figura 6**).

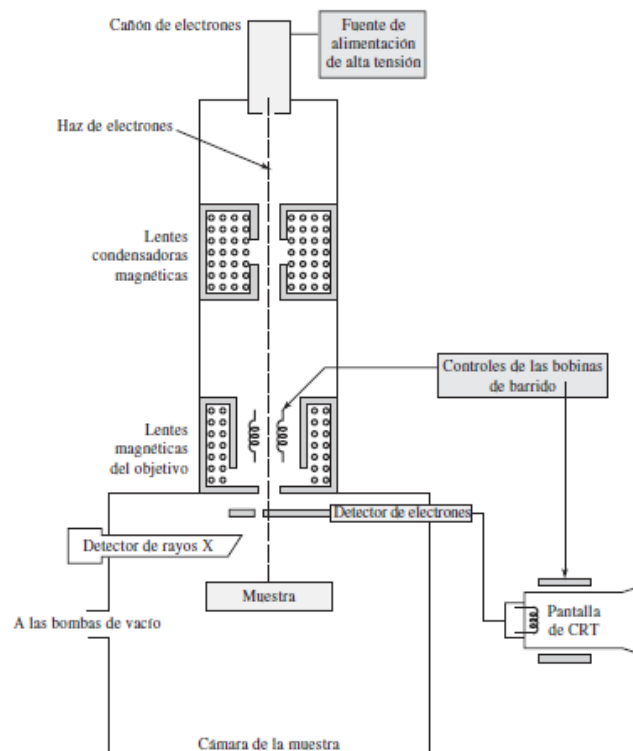


Figura 6. Diagrama esquemático de un microscopio electrónico de barrido con detector de rayos X adosado. Extraído de [43].

Los electrones se aceleran en un rango de voltaje de hasta 30kV. Un par de bobinas

electromagnéticas denominadas lentes condensadoras, demagnifican el haz una cierta cantidad dada por la corriente aplicada a las mismas, mientras que un segundo par de bobinas, llamadas lentes objetivo concentran el haz hasta una sección mínima, que puede variar de 1nm a 500nm. Un par de bobinas de deflexión electromagnéticas permiten realizar el barrido del haz de electrones en la muestra en sincronismo con la impresión en la pantalla del monitor de visión de la imagen [44]. Las señales que salen de la superficie de la muestra se recolectan por medio de detectores, se codifican y almacenan en forma digital. Finalmente, la reconstrucción de la imagen a partir del procesamiento de la información recibida aparece sobre la pantalla del monitor en escala de grises.

Mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido se caracteriza la adhesión de las células sobre la superficie de forma cualitativa. Buscando identificar la forma, cantidad (cualitativa), y disposición de estas [14].

2.2. Espectrómetro dispersivo en energías (EDS)

Más de la mitad de los SEM cuentan con capacidad analítica por rayos X, mediante el agregado de un detector de rayos X dispersivo en energías (EDS, siglas en inglés de *Energy Dispersive Spectrometer*). De esta manera puede obtenerse información topográfica y composicional rápida, eficiente y simultáneamente de la misma área donde se obtiene la imagen de SEM [42].

La información sobre la composición química y de las características microestructurales de los materiales es a menudo de primordial importancia y se ha dedicado un gran esfuerzo a la técnica de microanálisis con sonda de electrones (EPMA, siglas en inglés de *Electron Probe Microanalysis*) para complementar resultados obtenidos con otro tipo de técnicas. Así, el microanálisis con sonda de electrones es una técnica de caracterización no destructiva para determinar la composición química de distintos tipos de materiales orgánicos e inorgánicos con una resolución espacial entre 0,1 y 1 μ m.

Como se mencionó anteriormente, en la interacción del haz de electrones con la materia se generan múltiples fenómenos, entre ellos la interacción inelástica con los núcleos, en la cual la partícula incidente experimenta un cambio en su dirección inicial, y en algunos casos se emite un cuanto de radiación y la partícula interactuante pierde una cantidad equivalente de energía incidente, dando lugar al espectro continuo o *Bremsstrahlung*. Por otro lado, la interacción inelástica del electrón incidente con los electrones de los niveles atómicos internos del átomo da lugar al espectro de rayos x de líneas características de los elementos presentes en una muestra. De dicha interacción, se originan vacancias que se ocupan mediante el decaimiento de electrones procedentes de niveles más externos; cuando estas vacancias se llenan de manera radiativa, se emite un fotón característico. Debido a la

conservación de la energía, la energía de este fotón es igual a la diferencia de energía del átomo entre el estado inicial y final, por lo que, es característica de dicho decaimiento y del elemento en el cual se produjo.

La detección de los rayos X característicos emitidos por la muestra puede llevarse a cabo mediante espectrómetros dispersivos en energías (EDS) o espectrómetros dispersivos en longitudes de onda (WDS, siglas en inglés de *Wavelength Dispersive Spectrometer*). En ambos sistemas, la detección se basa en el efecto fotoeléctrico: el fotón de rayos X es absorbido por un átomo con la posterior expulsión de uno de los electrones unidos a ese átomo. Dicho fotoelectrón tiene una energía cinética igual a la energía del fotón menos la energía de enlace del electrón al átomo y el átomo queda en un estado excitado correspondiente a la energía de enlace del electrón emitido. El fotoelectrón se dispersa inelásticamente en el detector, depositando energía y creando como resultados portadores de carga. Estos portadores de carga se utilizan de diferentes maneras en los detectores, permitiendo el análisis composicional [44].

Los límites de detección de la técnica permiten asegurar la presencia de elementos por encima de este límite. La no detección de elementos no asegura que los mismos no estén presentes en la composición química, si no que la técnica no los ha detectado. Por lo tanto, es posible asegurar que los elementos no presentes en los resultados obtenidos se encuentran en cantidades por debajo del límite de detección de la muestra.

2.3. Microscopía óptica

La microscopía es el estudio de la fina microestructura y morfología de objetos con el uso de un microscopio [45].

En el microscopio óptico el objeto a analizar es iluminado y la luz que es reflejada o transmitida es recolectada por un sistema de lentes que forman la imagen. La imagen puede revelar finos detalles de la muestra, en un rango de magnificaciones de 2x a 2000x. La resolución se encuentra en el orden de los 0,5 μ m, limitada por la naturaleza de la muestra, las lentes y la longitud de onda de la luz [45].

Partes del microscopio:

Un esquema del microscopio óptico se presenta en la [Figura 6](#). El microscopio consiste en tres sistemas específicos: el *sistema de iluminación*, el cual provee la fuente de luz que ilumina la muestra, *la zona de la muestra* dónde se ubica la muestra y se controla la posición del área a observar a partir de las coordenadas en x, y y z, y el *sistema de imagen* el cual transfiere la magnificación e imagen sin distorsionar del plano de observación al sistema de adquisición de imágenes [46].

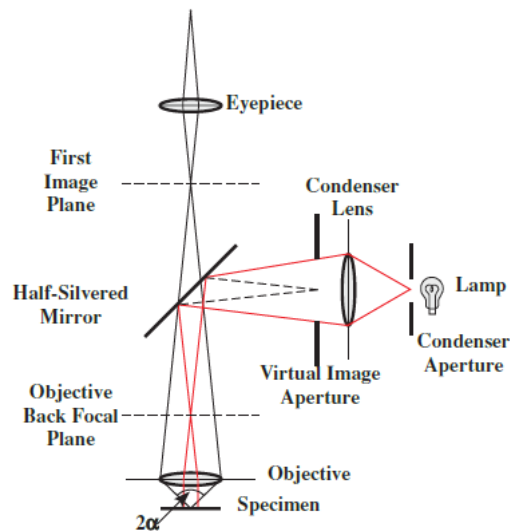


Figura 7. Principales componentes del microscopio óptico de reflexión [46].

Dentro de la microscopía óptica se presentan distintas clasificaciones;

En las ciencias médicas se utiliza microscopio óptico por transmisión, y se hace uso frecuente de imagen de contraste, uso de tintes fluorescentes, microscopía de campo oscuro e interferencia diferencial de contraste.

En la geología se trabaja principalmente por transmisión, puliendo las muestras minerales a un espesor muy fino y montadas en un soporte para su observación. La fuente más utilizada para el contraste es la luz polarizada.

Para muestras metalúrgicas se utiliza microscopio por reflexión, y el contraste de la imagen dependerá de la muestra y de los efectos ópticos asociados a la absorción y reflexión de la luz incidente.

Polímeros y plásticos pueden ser observados por reflexión o transmisión.

Cerámicos y semiconductores son generalmente observados por reflexión [46].

El microscopio óptico por **contraste invertido de fases** es el equipo utilizado para la observación y control de células y tejidos en cultivo. Dos factores propios de los cultivos celulares generan la necesidad de uso del microscopio invertido:

- El grosor de los soportes físicos (placas de Petri), hace inviable su colocación y observación en los microscopios ópticos convencionales.
- La ausencia de color, y por lo tanto de contraste, de las células en cultivo.

Se denominan microscopios invertidos (**Figura 8**), porque tal como su nombre lo indica, la estructura óptica del microscopio está colocada al revés que en un microscopio convencional. Este cambio de configuración física hace que sea posible la utilización en el condensador de ópticas de mayor longitud focal que permiten la separación del condensador de la platina dejando espacio libre suficiente para posibilitar la colocación de las placas de

cultivo. Mientras que para visualizar las células vivas y sin teñir se requieren configuraciones ópticas específicas. La técnica de microscopía de contraste de fases proporciona un método excelente para mejorar el contraste de las células vivas sin teñir. Esta se basa en el aprovechamiento de las pequeñas diferencias de densidad óptica que existen en los bordes de las membranas biológicas (membrana citoplasmática, nuclear, etc.) y el resto del citoplasma celular y el sustrato. Teniendo en cuenta que los bordes de membranas biológicas de las células son prácticamente esféricos, cualquier rayo de luz que pase por estas zonas tendrá que atravesar más materia que el rayo que pase por el centro de la célula. Estas zonas de densidad óptica superior alteran levemente la fase de la luz difractada por el espécimen, entonces la aceleración de la luz directa (no difractada por las células) generará una diferencia entre las ondas de luz difractada y directa que llegan al ocular, produciendo efectos de interferencia detectables por el ojo humano. [47]

La técnica de microscopía óptica invertida es utilizada para realizar el conteo de células y el control de estas durante las etapas de cultivo y ensayos. Se logra caracterizar cualitativamente las células sobre la superficie de la placa de Petri.

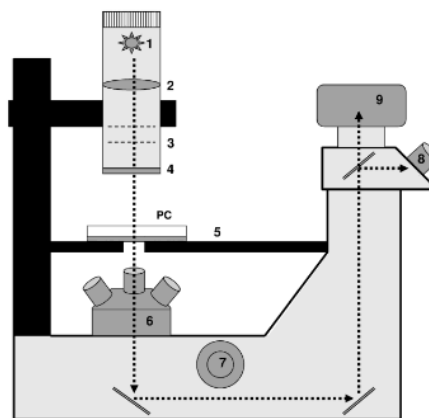


Figura 8. Esquema de un microscopio invertido en vista lateral. [47].

2.4. Método de conteo de celular: cámara de Neubauer

En cultivos de células generalmente es necesario determinar el número de células (para la estandarización de las condiciones, la estimación de reactivos de tinción requeridos o experimentos de cuantificación). La cantidad de células es esencial para evaluar la cinética de crecimiento celular [48]. Existen distintos métodos de conteo celular, entre ellos: método manual, semi automático y automático.

Los métodos automatizados (semi automático y automático), consisten en una cámara digital que obtiene una imagen y un procesador de información de datos que realiza el conteo

de la muestra en cuestión. Aunque la automatización del método facilita el proceso de análisis de muestras, se encuentra limitado por la disponibilidad de opciones de tinción de las células en análisis y puede ser impreciso en diferenciar algunos tipos celulares debido a limitaciones de hardware y software. Sin embargo, estos métodos brindan la posibilidad de analizar un amplio número de muestras en un corto período de tiempo, con resultados aceptables [48].

Mediante el método de conteo manual, las células se pueden contar directamente bajo el microscopio con el uso de un hemocitómetro, el cual es un portaobjetos de vidrio grueso con un área central diseñada como cámara de recuento. El diseño exacto puede variar; se describe aquí el **Neubauer (Figura 9)** [49]. La cámara de conteo de Neubauer se utiliza ampliamente para contar células en suspensión ya que su resultado se considera como una buena estandarización, en un rango entre 20 y 50 células por *ml* de solución, como máxima cantidad de conteo recomendada [49] [50]. El conteo manual bajo hemocitómetro ha sido el método más utilizado debido a su bajo costo y amplia versatilidad, pero por sobre todo cuenta con una buena calidad de resultados obtenidos. Sin embargo, el procedimiento lleva mucho tiempo, por lo que resulta dificultoso cuando se debe analizar una gran cantidad de muestras y, al ser un método manual su efectividad depende de la habilidad del analista [48].

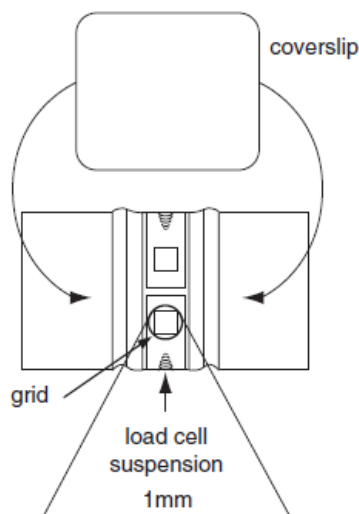


Figura 9. Esquema del hemocitómetro. [49]

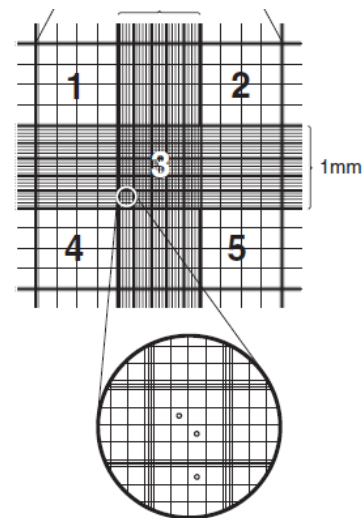


Figura 10. Cuadrantes en el hemocitómetro para conteo de células. [44]

Para el procedimiento de conteo, en primer lugar, se disuelven las células en solución salina y se colocan en el hemocitómetro. Con uso de la grilla mencionada (**Figura 10**) se cuentan las células de los cuatro cuadrantes exteriores y del central. Se realiza un promedio de lo contado, y se determina la cantidad células/ml según el cálculo:

- $\text{Células/ml} = \text{promedio contado por cuadrante} \times \text{factor de dilución} \times 10^4$.

- Células totales = células/ml x volumen original de células en suspensión .

10^4 es el factor de corrección de volumen del hemacitómetro: cada cuadrante es de 1x1mm y la profundidad es de 0.1mm. [49].

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se detallarán los materiales y superficies de base utilizados, condiciones de cultivo de células, ensayos *in vitro* y estudio de la pieza dental.

Es importante señalar que la diferenciación de CMM hacia un linaje osteoblástico en este estudio es el resultado de las propiedades de la superficie y el microambiente que las células produjeron *in vitro* y no es el resultado de factores osteogénicos añadidos al medio o del tratamiento con un medio osteogénico como se ha demostrado en otros trabajos [20].

El método experimental fue llevado a cabo en tres etapas:

Primera etapa: desarrollo y estudio de tratamiento bioactivo sobre Ti cp para implantes dentales.

Segunda etapa: preparación de los cultivos de CMM, ensayos *in-vitro* de las distintas superficies bioactivas en los cultivos celulares, estudio, caracterización y comparación de las superficies obtenidas luego de los ensayos *in-vitro*.

Tercera etapa: estudio y comparación de las características morfológicas y composicionales de una pieza dental ⁵, con las superficies bioactivas estudiadas *in-vitro* en CMM.

Los tratamientos superficiales estudiados sobre Ti cp fueron: blastinizado, anodizado por plasma químico y grabado ácido. Se planteó una combinación de estos tratamientos de modificación superficial, con un tratamiento alcalino en NaOH, los cuales según bibliografía mejorarían la bioactividad frente al medio biológico [51]. Además, se agrega al ensayo una superficie de Ti cp mecanizada sin tratamiento alcalino y una superficie de plástico como muestra de control en placa de Petri. Los tiempos de ensayo *in vitro* fueron de 24 horas, 4 y 6 días. La cantidad de muestras estudiadas fue un total de 23, las cuales fueron identificadas como se presenta en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Tratamientos superficiales y tiempos de cultivo de las muestras estudiadas

	Superficie		Tiempo de cultivo		
	Tratamiento superficial		24hs	4 días	6 días
1.	Blastinizado	B	B 24	B 4	B 6

⁵ Extraída en el hospital Universitario de la Facultad de Odontología de la UNLP.

2.	Blastinizado + tratamiento alcalino	BNa	BNa 24	BNa 4	BNa 6
3.	Blastinizado + anodizado por plasma químico	APQ	APQ 24	APQ 4	APQ 6
4.	Blastinizado + anodizado por plasma químico + tratamiento alcalino	AQPNa	AQPNa 24	AQPNa 4	AQPNa 6
5.	Blastinizado + grabado ácido	GA	GA 24	GA 4	GA 6
6.	Blastinizado + grabado ácido + tratamiento alcalino	GANa	GANa 24	GANa 4	GANa 6
7.	Mecanizada (sin tratamiento)	Mec.	Mec. 24	- ⁶	Mec. 6
8.	Placa de Petri	Control	Control 24	Control 4	Control 6

3.1. Superficies

Se utilizó como material de estudio Ti c.p ASTM Grado 4 (0.0039% N, 0.0112% C, 0.11% Fe, 0.24% O, 0.00% H, Ti bal) en muestras cilíndricas de 9mm de diámetro (muestras: B, BNa y Mec.) y de 6mm de diámetro (las muestras de GA, GANa, APQ y AQPNa) todas con un espesor de 6mm.

Las superficies de estudio de Titanio c.p fueron brindadas por la empresa [Kinetical SRL](#).

Los tratamientos superficiales de blastinizado, anodizado por plasma químico y grabado ácido, se realizaron en la empresa siguiendo el mismo procedimiento utilizado en la fabricación de implantes dentales. El blastinizado se realiza con partículas de fosfato de Calcio, el grabado ácido con ácido sulfúrico y clorhídrico, mientras que el anodizado por plasma químico utiliza partículas de P y Ca.

El tratamiento superficial alcalino en NaOH fue realizado en el Laboratorio de Investigaciones en Metalurgia Física (LIMF) de la facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de La Plata.

Para poder obtener resultados contrastables se siguieron los mismos procedimientos experimentales durante los ensayos *in-vitro*; la importancia radica en poder estudiar y comparar el comportamiento celular en las distintas superficies bioactivas.

Tratamiento alcalino:

El tratamiento alcalino fue realizado sobre las muestras con las tres distintas superficies brindadas por la empresa; blastinizado (B), grabado ácido (GA) y anodizado por plasma

⁶ La muestra de Titanio mecanizada (Mec.) fue estudiada a tiempos de cultivo de 24 horas y 6 días ya que al no tener recubrimiento superficial estos ensayos bastaron para caracterizar el comportamiento celular.

químico (APQ). Se utilizó una solución acuosa 10M de hidróxido de Sodio con una temperatura de tratamiento de 60°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de inmersión, las muestras se lavaron en agua bidestilada a 30°C y luego fueron secadas durante 24 horas en un ambiente controlado de temperatura.

Antes de realizar los ensayos *in-vitro*, todas las muestras fueron esterilizadas a partir de radiación gamma.

3.2. Cultivo de células – ensayos *in vitro*

Los cultivos en células madre mesenquimales (CMM) se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología Odontológica de la Facultad de Odontología de la UNLP, según protocolo aprobado por el comité de Bioética de dicha institución. Las CMM se obtuvieron de pulpas de terceros molares retenidos con indicación de extracción y de dientes supernumerarios extraídos en el hospital Universitario de la Facultad de Odontología de la UNLP.

Para el cultivo se utilizaron células correspondientes a un pasaje 7 (P7), lo que significa que las células se replicaron 7 veces luego del explante. Se utilizó como medio de cultivo de las CMM DMEM-F12 suplementado con SFB al 10% y antibióticos; se sembró una cantidad de células/muestra⁷ de 20.000 para las superficies de 9mm de diámetro y 10.000 para las superficies de 6mm de diámetro, adoptando como tiempos de ensayo 48 horas, 4 días y 6 días, en una incubadora (Thermo Scientific Series 3 Water Jacketed) a 37°C en una atmósfera controlada con 95% de aire y 5% de CO₂. Como control de crecimiento se utilizó un cultivo de células en placa de Petri con las mismas condiciones iniciales.

Una vez finalizado el tiempo de cultivo de cada ensayo, se realizó la fijación en formaldehído al 10% y una posterior deshidratación en alcoholes al 35, 70, 96 y 100 %.

El equipamiento utilizado para el cultivo se presenta en la **Figura 11**:

⁷ El conteo para la cantidad de CMM a sembrar por superficie se realizó bajo el método de conteo manual de Neubauer, desarrollado en el apartado 2.4. [Método de conteo de celular: cámara de Neubauer.](#)



Figura 11. Equipamiento utilizado para la etapa de ensayo *in-vitro*. a). Estufa b). Microscopio óptico c). Campana. Las imágenes corresponden al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNLP.

3.3. Estudio de la pieza dental

La pieza dental utilizada para comparar con los resultados obtenidos de los distintos ensayos *in-vitro*, fue extraída en el hospital de la Facultad de Odontología de la UNLP.

Se realizó una limpieza con alcohol, y un corte en sentido transversal y otro en sentido longitudinal. El diente humano, la dentina y el esmalte presentan una estructura tipo compósito formada por cristales de hidroxiapatita (HAP) de tamaño nanométrico

embebidos en una matriz de material orgánico [52] . La información obtenida de la imagen topográfica de SEM y el análisis composicional de EDS, permiten comparar las superficies en estudio con la pieza dental, orientando los resultados a la formación de matriz extracelular y diferenciación de células madre al tipo osteoblástico.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados fueron evaluados mediante las técnicas de caracterización de microscopía electrónica de barrido (SEM), con imágenes topográficas. Se realizaron mapeos y espectros de composición mediante la técnica de espectroscopía de dispersión de energía (EDS), para todas las superficies en estudio.

La combinación de ambas técnicas permite un estudio puntual de la superficie, ya que brinda información composicional mediante EDS del sitio especificado en la imagen topográfica de SEM. De esta forma se pueden obtener resultados de la matriz celular formada en cada superficie a los distintos tiempos de ensayo [42].

4.1. Superficies

En las figuras 12 a 26, se presentan los resultados obtenidos de la caracterización realizada en SEM. Se presenta una imagen característica a una magnificación de 1600x de cada muestra. En todas las superficies se evidenció adhesión, crecimiento y comunicación intercelular. Se considera que a medida que se incrementa el tiempo de cultivo aumenta la proliferación celular en las distintas superficies; se estima que las superficies BaNa y GANa tienen mayor crecimiento, asociado al aumento de la mojabilidad superficial y la topografía obtenida mediante el método de modificación de superficie, generando un aumento de las características bioactivas de la superficie.

Se cree que los micro huecos y los picos afilados formados en la superficie GA aumentan el área superficial, beneficiando la proliferación de células y la formación de matriz extracelular.

De los resultados obtenidos mediante las técnicas de caracterización SEM-EDS se evidencia la presencia de elementos característicos (C, Na, Ca, P) correspondientes a la actividad biológica de las CMM sobre la superficie. Es de importancia la similitud de elementos que se encuentra entre las superficies ensayadas *in-vitro* y la matriz extracelular original [38].

Los resultados obtenidos a partir del ensayo EDS son semi cuantitativos, a fin de representar la presencia de determinados elementos sobre la superficie, pero sin determinar cómo están presentes estos elementos en química composicional. Los resultados se presentan en formato de tabla, dónde se presentan los elementos

correspondientes la superficie original (sin ensayo en CMM), a 48 horas, 4 y 6 días de cultivo, y en gráficos dónde se representa la variación composicional del elemento según el tiempo de ensayo. Los resultados presentados en color rojo indican que la detección del elemento se encuentra sobre el límite de detección de la técnica.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos mediante SEM-EDS (imágenes topográficas, tablas y gráficos de composiciones químicas) de las distintas superficies bioactivas ensayadas *in-vitro* en CMM.

Superficie B

La muestra B (Figura 12) presenta adhesión celular, con la formación de precipitados sobre la superficie; estos precipitados corresponderían a la formación de matriz extracelular [53].

En las imágenes se observa la superficie cubierta mayoritariamente por compuestos orgánicos (células y matriz). Las imágenes obtenidas de los distintos tiempos de cultivo indicarían que la adherencia de las células aumenta con el tiempo de cultivo, en la figura 12c, correspondiente al ensayo a 6 días, las células se observan muy adheridas a la superficie. La presencia de C (Tabla 3) en la superficie, indicaría el desarrollo de actividad biológica celular, dando lugar a la formación del precipitado observado en la Figura 12. En las muestras a 4 días se puede observar una disminución del wt% de Ti respecto a las muestras a 48hs. La disminución en la concentración másica del Ti indicaría que los datos recolectados por la técnica de EDS provienen en su mayoría del precipitado y en menor cantidad de la superficie base del Ti. Por lo tanto, que el precipitado formado es de mayor volumen ya que abarca una zona más amplia de la gota de interacción del ensayo EDS que el Ti base de origen de la superficie. Los precipitados están compuestos por Na, Cl, P, la presencia de estos elementos indicaría la formación de matriz extracelular. [54]

En el ensayo a 6 días se observa un aumento de wt% de Ti, esta observación puede derivar en tres teorías: la muerte celular, la diferenciación de estas (las cuales al diferenciarse se despegan de la superficie) o podría ocurrir que al presentar gran adherencia las células en la superficie, el fino espesor de estas genera que la gota de interacción para recolección de datos de la técnica, abarque mayor parte de la superficie base de Titanio.

La presencia de Cl en la superficie de la muestra B, aparece generalmente como elemento de segregación celular en la formación de matriz extracelular [55].

La variación de la concentración de los elementos según el tiempo de ensayo se encuentra representada en el gráfico de la Figura. 13.

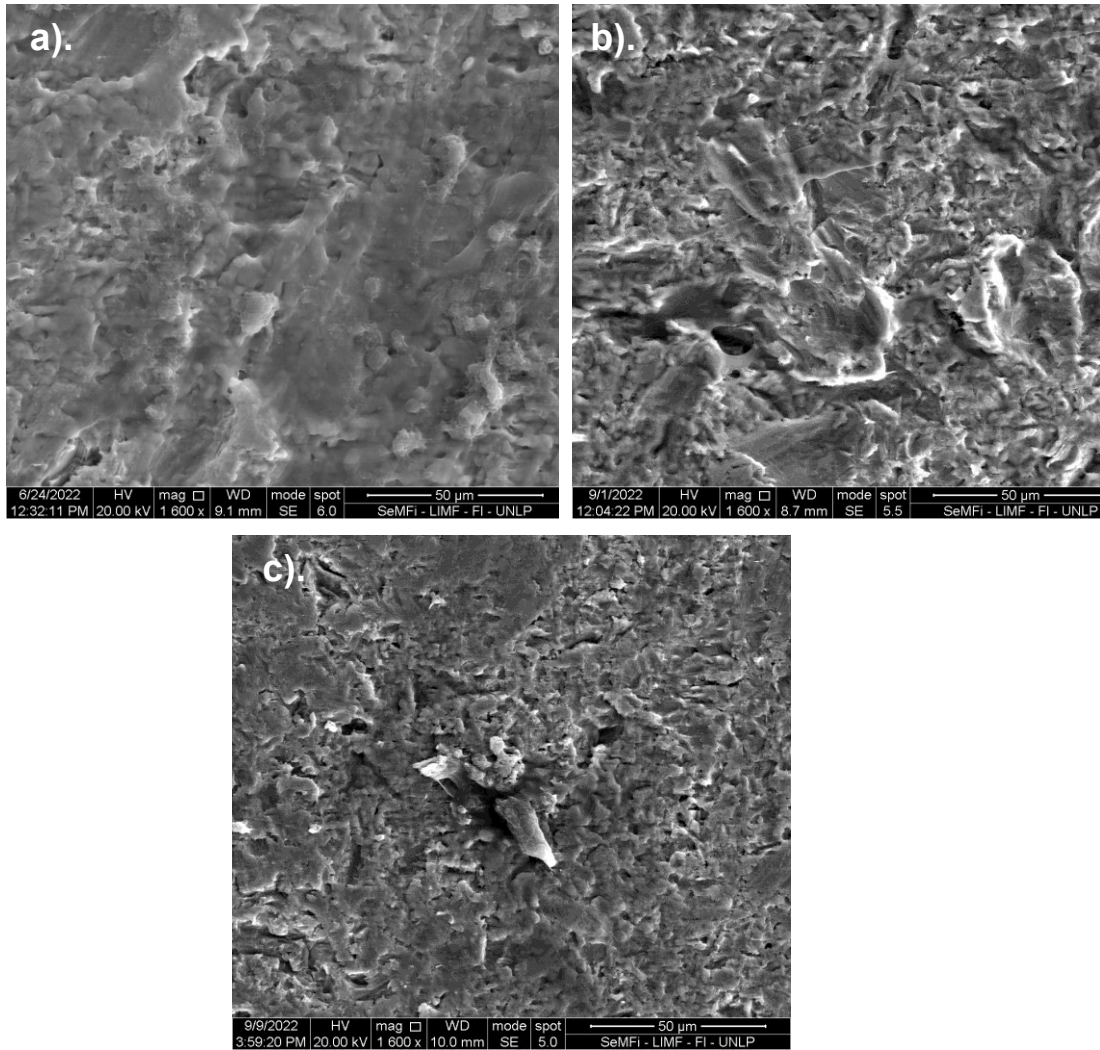


Figura 12. Superficies B a distintos tiempos de cultivo. a). 48hs b). 2 días c). 4 días

Tabla 3. Resultados EDS - Superficie B

B	Superficie	48 horas	4 días	6 días
	wt%	wt%	wt%	wt%
C	-	44,6	25,4	22,3
Ti	91,8	37,7	53,9	61,4
O	8,44	16,5	20,2	16,2
Cl	-	0,4	0,2	-
Na	-	0,3	0,3	-
Ca	0,12	0,1	-	0,1
P	0,35	0,2	-	-
S	-	0,2	-	-
Mg	-	-	-	-

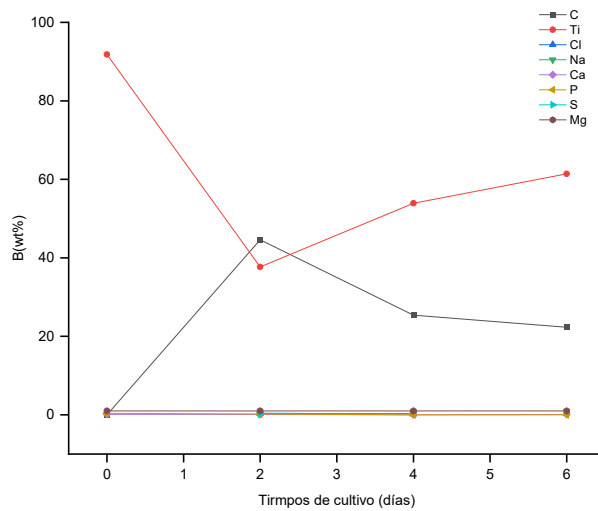


Figura. 13. Variación de la concentración wt% de los elementos según el tiempo de ensayo en la superficie B.

Superficie BNa

En la muestra BNa (**Figura 14**), al igual que en la superficie B, se observa la formación de un precipitado sobre la superficie, el cual evidencia menor porosidad que el precipitado formado en B. Al igual que en la superficie B el aumento de tiempo de ensayo indicaría un aumento en la adhesión de las células o de lo contrario la des adhesión de las mismas.

En el ensayo a 48hs se observa la presencia de los elementos Na, Ca, P, Cl; la presencia de estos elementos indicaría la posible formación de una matriz mineralizada sobre la superficie. Las estructuras de colágeno mineralizadas contienen altos niveles de Ca y P [56]. Este evento sería consecuencia de la actividad celular desarrollada sobre la superficie.

A diferencia de la superficie B, se observa Mg lo cual se podría asociar a secreción de proteínas, como parte de la actividad celular desarrollada sobre la superficie.

La variación de la concentración de los elementos según el tiempo de ensayo se encuentra representada en el gráfico de la **Figura 15**.

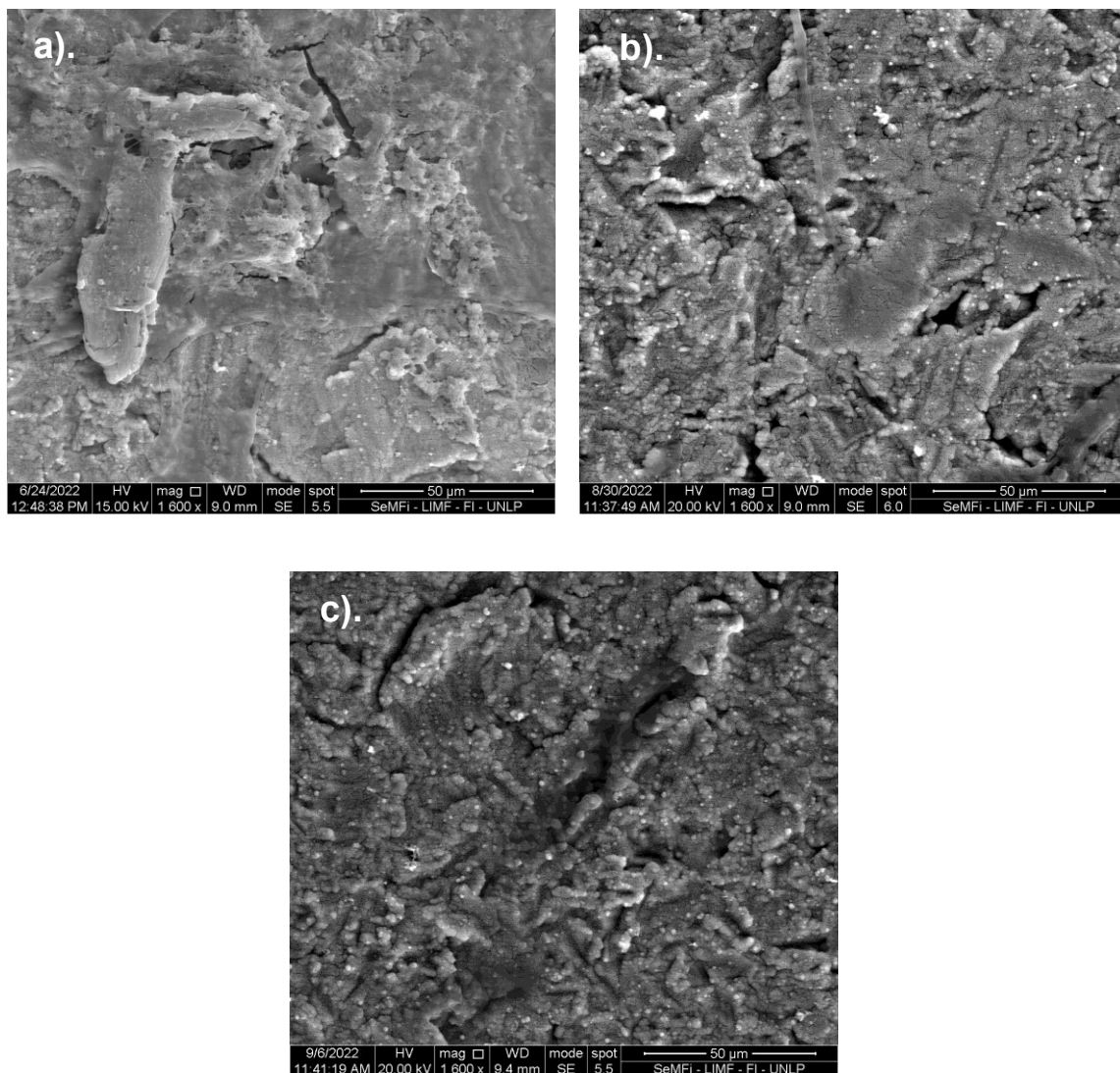


Figura 14. Superficies BNa a distintos tiempos de cultivo a). 48hs b). 2 días c). 4 días

Tabla 4. Resultados EDS – Superficie BNa

BNa	Superficie	48 horas	4 días	6 días
	wt%	wt%	wt%	wt%
C	-	28	11,2	12,6
Ti	58,9	27,4	43,1	40,1
O	38,46	35,3	43,7	44,9
Cl	-	3,4	0,1	0,2
Na	1,7	4,2	0,7	0,7
Ca	0,85	1,3	0,9	1,1
P	-	0,1	0,2	0,2
Mg	-	0,1	0,2	0,2
S	-	0,1	-	0,1

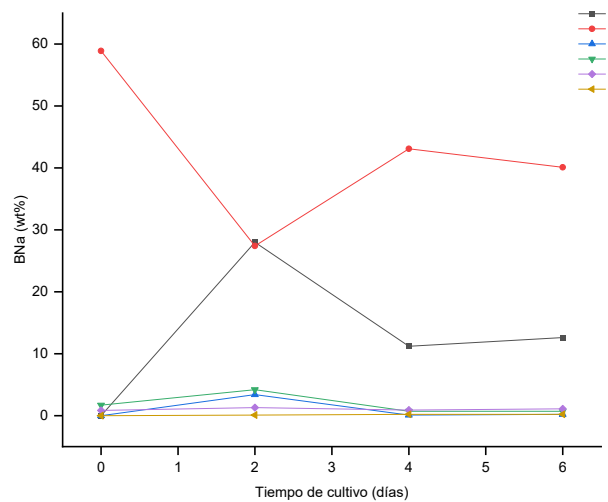


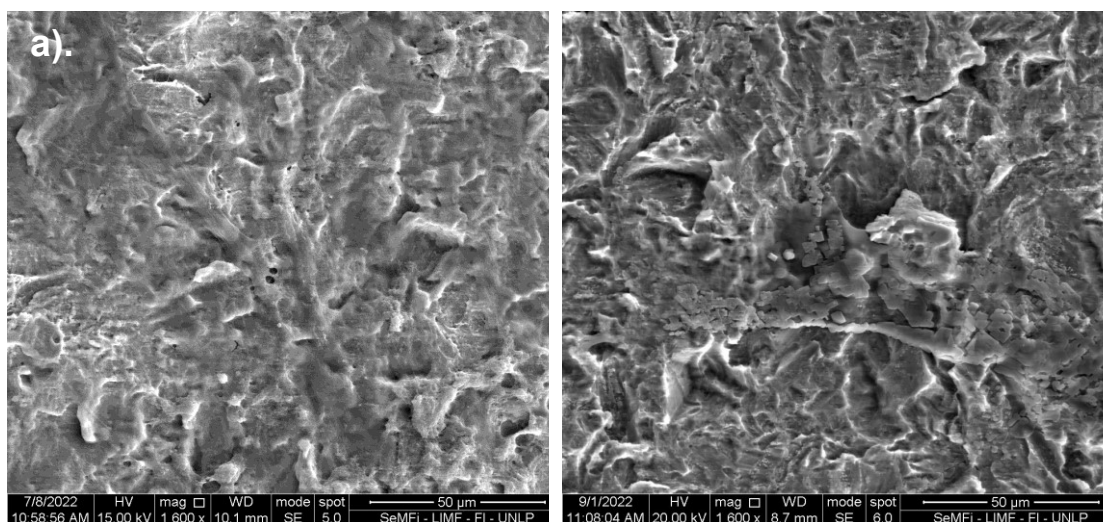
Figura 15. Variación de la concentración wt% de los elementos según el tiempo de ensayo en la superficie BNa.

Superficie GA

La muestra GA, presenta una mayor cantidad de células adheridas a la superficie en comparación con las muestras BA y BNa. Se observa que las células adquieren una orientación característica, la cual estaría influenciada por la topografía de la superficie. El precipitado encontrado en la superficie se identificaría como matriz extracelular con una cierta porosidad (ver anexo, Figura 28), la cual se asemejaría estructura porosa de un osteoide [57] [58].

La presencia de C, indica la presencia de actividad celular sobre la superficie. Además, la presencia de Na y P a 48hs indicarían la formación de una matriz mineralizada. Sin embargo, a 4 y 6 días estos elementos no están presentes. Al igual que en la superficie B, en el ensayo a 6 días se observa un aumento de wt% de Ti. Esta observación puede derivar en las mismas tres teorías ya mencionadas.

La variación de la concentración de los elementos según el tiempo de ensayo se encuentra representada en el gráfico de la Figura 17.



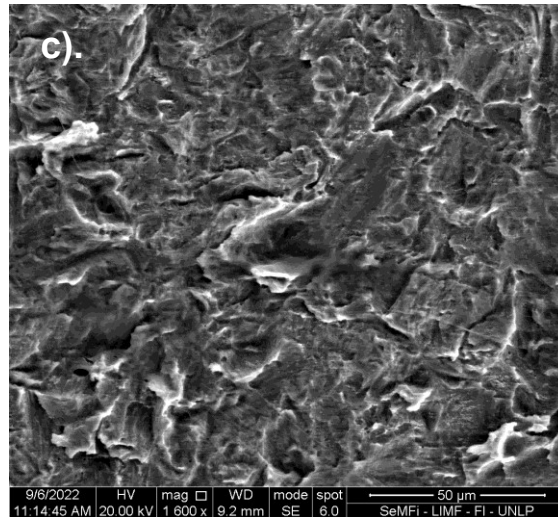


Figura 16. Superficies GA a distintos tiempos de cultivo a). 48hs b). 4 días c). 6 días

Tabla 5. Resultados EDS – Superficie GA

GA	Superficie	48 horas	4 días	6 días
	wt%	wt%	wt%	wt%
C	-	52,7	19,4	17,2
Ti	97,4	22,5	67,6	75,2
O	2,6	23,3	8,5	7,5
Cl	-	0,5	1,6	0,1
Na	-	0,7	-	-
Ca	-	-	-	-
P	-	0,1	-	-
Mg	-	-	-	-
S	-	0,3	0,1	0,1

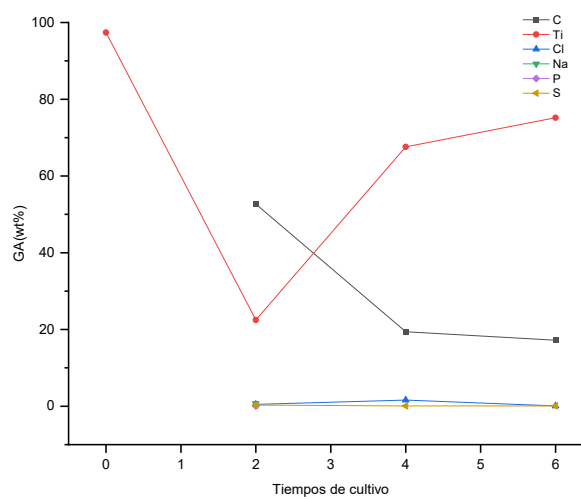


Figura 17. Variación de la concentración wt% de los elementos según el tiempo de ensayo en la superficie GA.

Superficie GANa

La muestra GANa (**Figura 18**), evidencia adhesión celular. La presencia de los elementos Cl, Na, Mg, Ca, P y S, al igual que en la muestra BNa, indicarían la formación de matriz, la cual aparece en forma de precipitados de volumen considerable sobre la superficie y de forma más compacta a comparación de la matriz porosa formada en la superficie GA, y con cierta similitud al precipitado formado en la muestra de BNa.

La variación de la concentración de los elementos según el tiempo de ensayo se encuentra representada en el gráfico de la **Figura 19**.

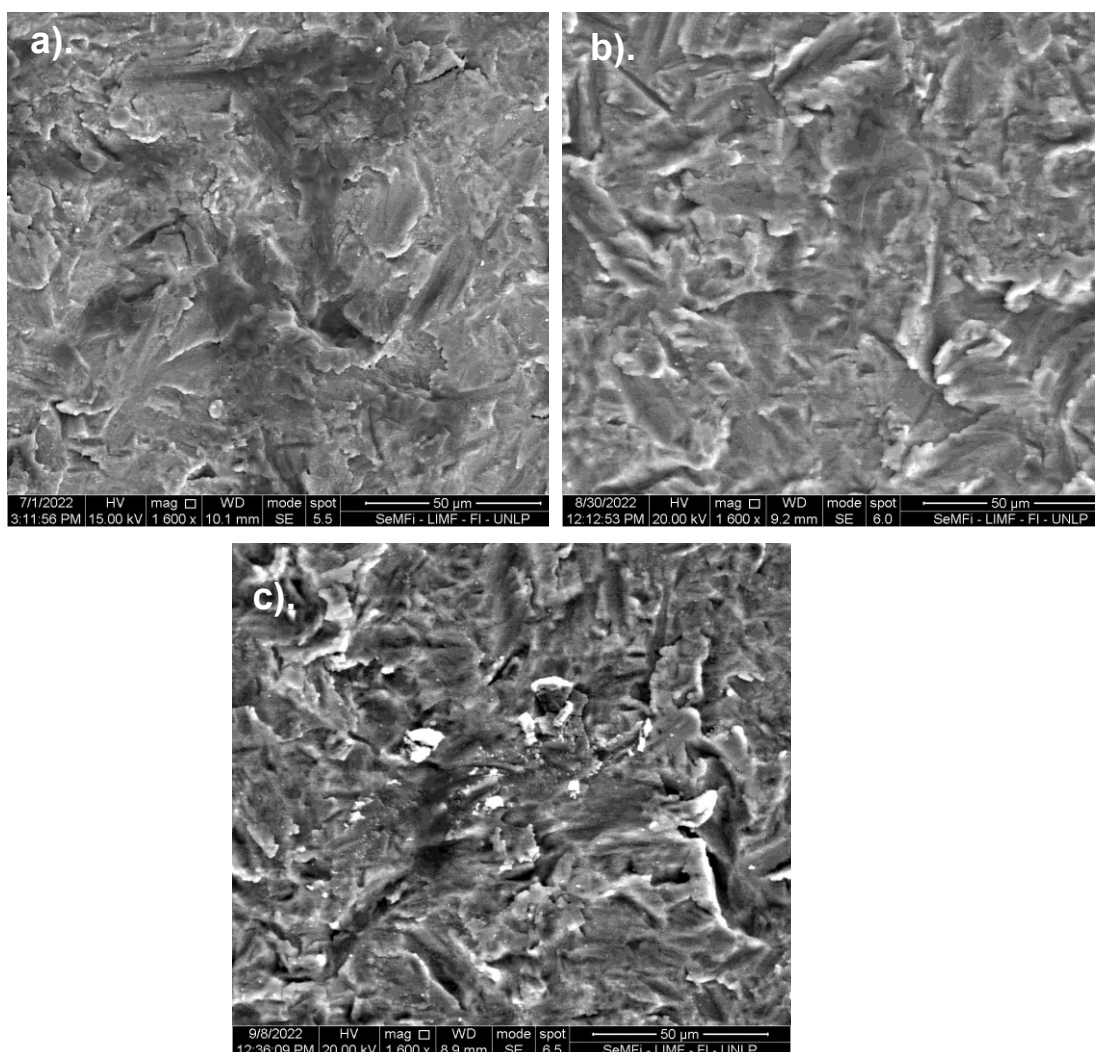


Figura 18. Superficies GANa a distintos tiempos de cultivo a). 48hs b). 4 días c). 6 días

Tabla 6. Resultados EDS – Superficie GANa

GANa	Superficie	48 horas	4 días	6 días
	wt%	wt%	wt%	wt%
C	-	22,4	12	22,2
Ti	62,4	35,2	40,7	18,3
O	35,4	39,1	45,8	58

Cl	-	0,6	0,1	0,1
Na	1,9	1,6	0,5	0,6
Ca	0,4	0,6	0,7	0,4
P	-	0,1	0,1	0,1
Mg	-	0,1	0,1	0,2
S	-	0,3	-	0,1

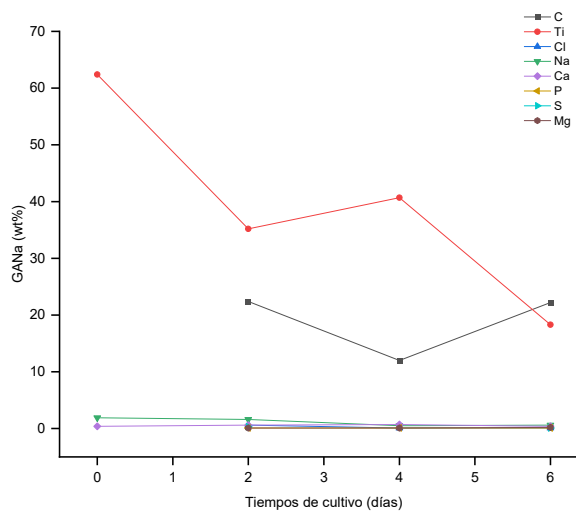
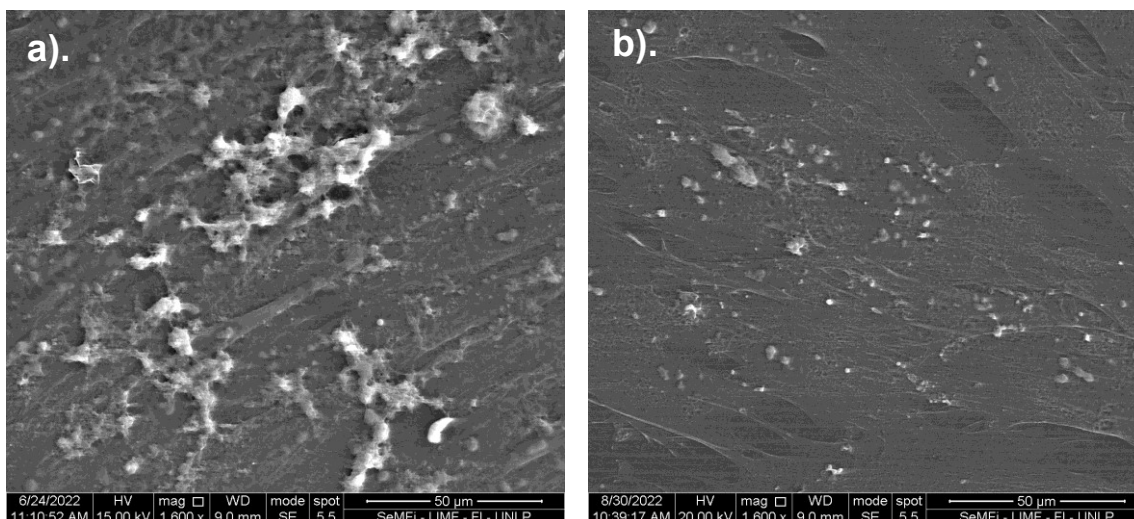


Figura 19. Variación de la concentración wt% de los elementos según el tiempo de ensayo en la superficie GANa.

Superficie control

La muestra de control (**Figura 20**), presenta adhesión celular de forma aislada. No se observa la formación de precipitados sobre la superficie como en las superficies B, BNa, GA y GANa. El estudio composicional se corresponde a la presencia de células adheridas a la superficie, debido a la presencia de C.

La variación de la concentración de los elementos según el tiempo de ensayo se encuentra representada en el gráfico de la **Figura 21**.



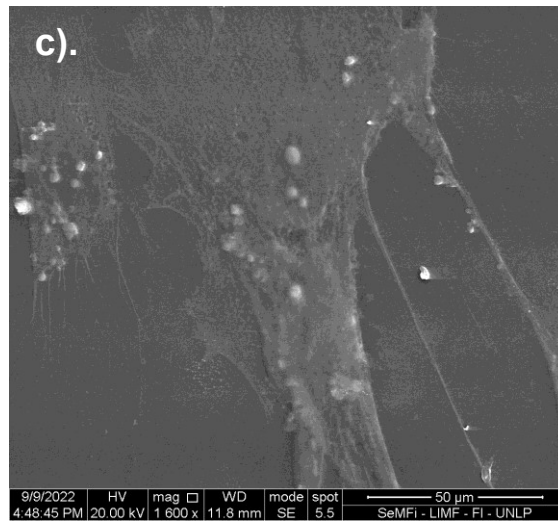


Figura 20. Muestras de control en placa de Petri a distintos tiempos de cultivo a). 48 hs b). 4 días c). 6 días

Tabla 7. Resultados EDS – Superficie CONTROL.

Control.	48 horas	4 días	6 días
	wt%	wt%	wt%
C	70	84,3	91
O	19	15,5	9
N	10,9	-	-
Ca	-	0,1	-
P	-	0,1	-
Cl	-	-	0,1

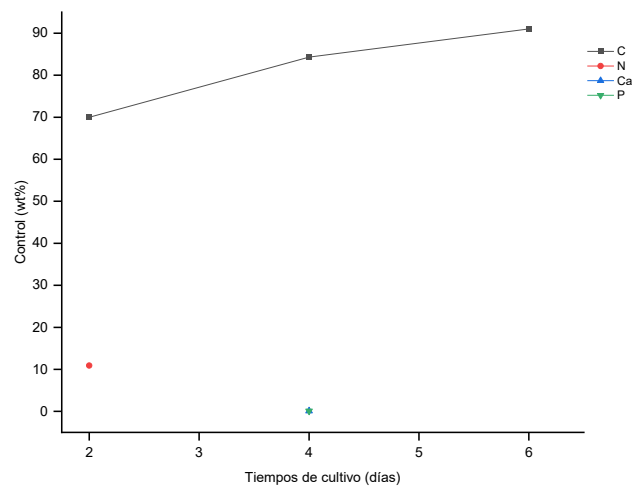


Figura 21. Variación de la concentración wt% de los elementos según el tiempo de ensayo en la superficie control.

Superficie APQ

La muestra APQ (Figura 22), presenta adhesión celular y formación de precipitado de forma aislada sobre la superficie, resultando zonas no cubiertas por células pudiéndose apreciar la topografía característica de la superficie base. (Anexo, Figura 29).

Se evidencia la presencia de Ca y P en la superficie, estos elementos son fundamentales en el proceso de mineralización de la matriz. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la superficie base cuenta con dichos elementos (tabla 9, primera columna) por lo tanto, esta información no indicaría necesariamente la existencia de actividad celular desarrollada por las células. Por lo contrario, una disminución en el %wt de Ca y P a medida que aumenta el tiempo de ensayo (Figura 23), este resultado podría indicar que no se desarrolla la actividad celular que sí se presenta en las muestras de B, BNa, GA y GANa.

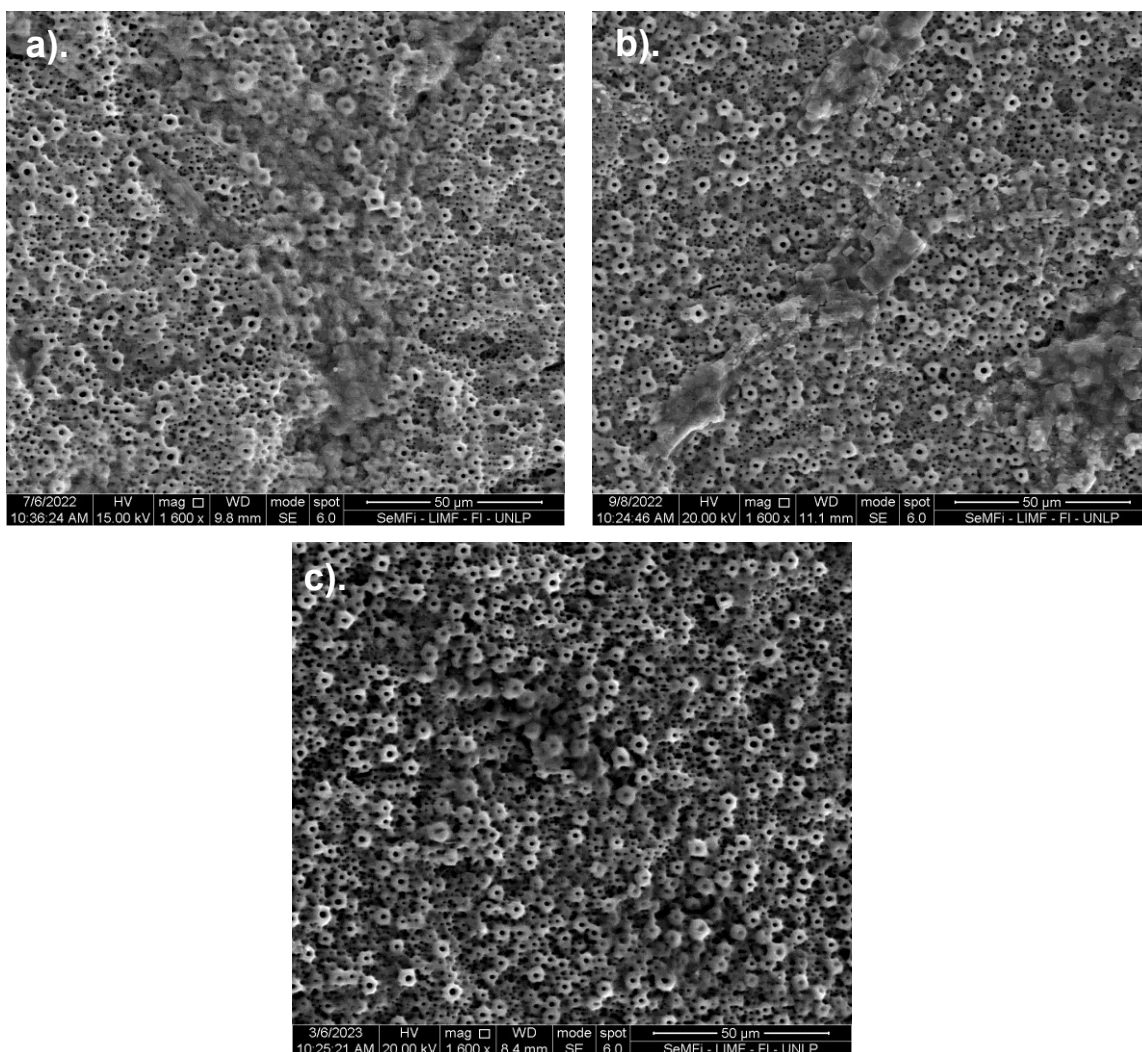


Figura 22. Superficies APQ a distintos tiempos de cultivo a). 48hs b). 4 días c). 6 días

Tabla 8. Resultados EDS – Superficie APQ

APQ	Superficie	48 horas	4 días	6 días
	wt%	wt%	wt%	wt%

C	-	33,6	15,7	6,4
Ti	38,1	16,5	23,8	31,1
O	46,8	33,2	46,3	48,4
Cl	-	3,8	1,5	0,3
Na	0,4	4	2,9	0,5
Ca	8,2	5,2	5,7	7,5
P	6,5	3,4	4,1	5,6
Mg	-	-	-	0,1
S	-	0,2	-	0,1
N	-	0,1	-	-

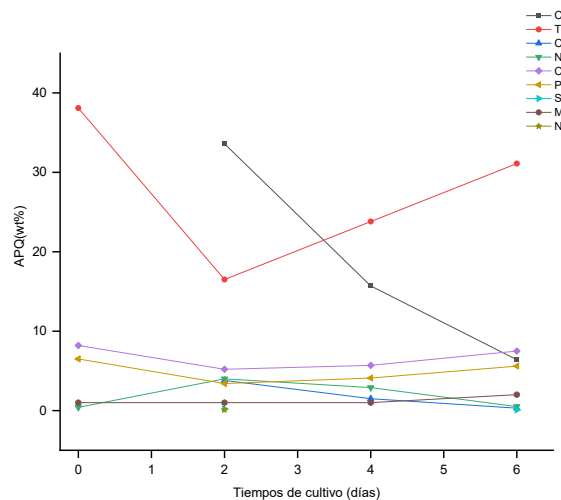


Figura 23. Variación de la concentración wt% de los elementos según el tiempo de ensayo en la superficie APQ.

Superficie APQNa

La muestra APQNa (Figura 24), presenta una superficie similar a la muestra APQ. Se observa adhesión celular y formación de precipitado sobre la superficie de forma aislada. Como se observa en la imagen topográfica tomada por SEM, gran parte de la superficie no está cubierta por células. El comportamiento en el análisis composicional es similar al de la muestra de APQ; con la presencia de elementos Ca y P los cuales disminuyen su porcentaje composicional al aumentar el tiempo de ensayo (Figura 25), y los presentes en la superficie pueden ser propios de la superficie base.

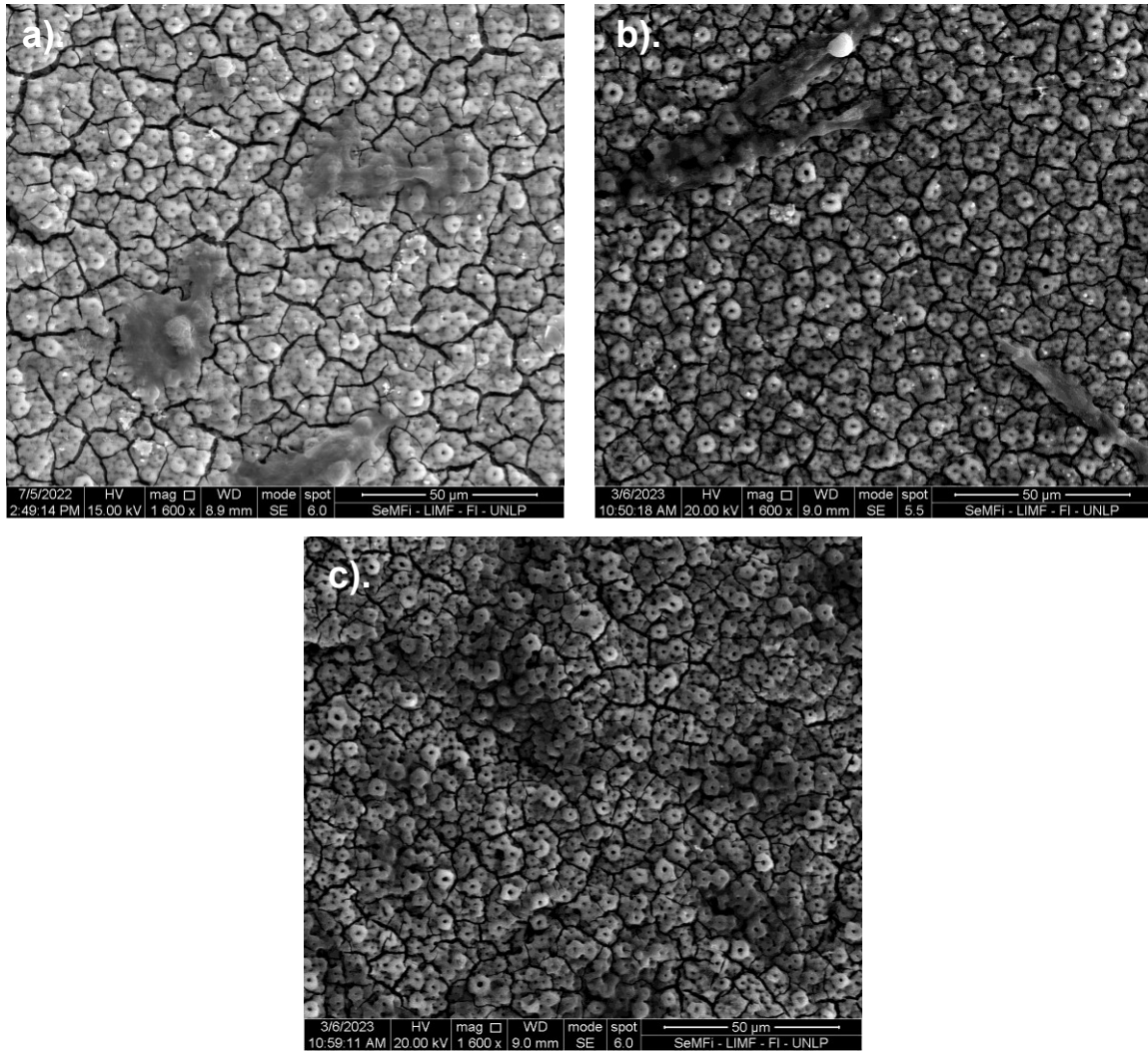


Figura 24. Superficies APQNa a distintos tiempos de cultivo a). 48hs b). 4 días c). 6 días

Tabla 9. Resultados EDS – Superficie APQNa

APQNa	Superficie	48 horas	4 días	6 días
	wt%	wt%	wt%	wt%
C	-	24,4	14,2	22,9
Ti	43,3	23,3	24,4	27,8
O	48,7	46,6	56,3	44
Cl	-	0,2	0,3	0,3
Na	3	1,1	1,2	1,5
Ca	4,6	3,6	2,9	3,2
P	0,4	0,5	0,5	0,3
Mg	-	0,2	0,2	-
S	-	0,1	-	-

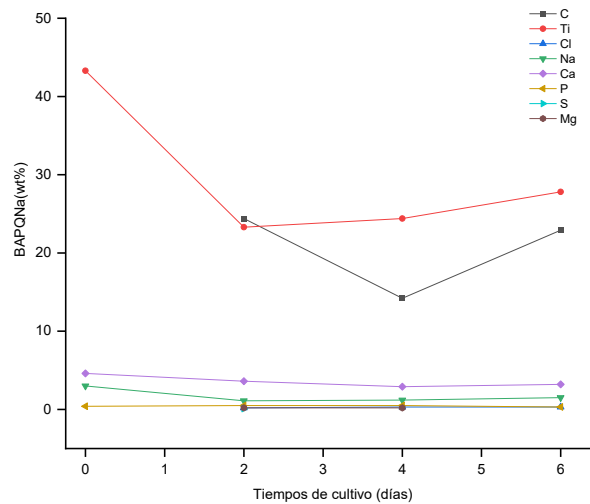


Figura 25. Variación de la concentración wt% de los elementos según el tiempo de ensayo en la superficie APQNa.

Superficie Mec.

La **Figura 26**, se corresponde a la imagen de la superficie mecanizada con ensayo a 48 h y 6 días de cultivo en células. Se observa una disposición preferencial de las células adheridas a la superficie, distinguida de la disposición original de una CMM, la cual se presenta de forma entramada y paralela, (anexo, [Figura 30](#)). La pérdida de la disposición original de la célula como CMM podría indicar que ocurre una diferenciación. Sin embargo, no se observa en la superficie la formación de precipitado como sí en las superficies estudiadas. Del análisis composicional a 48 h de cultivo, se presentan pocas cantidades de Ca, P, Mg y Cl. Del ensayo a 6 días, no se evidenciaron cantidades considerables de los elementos característicos que permiten la formación de matriz extracelular.

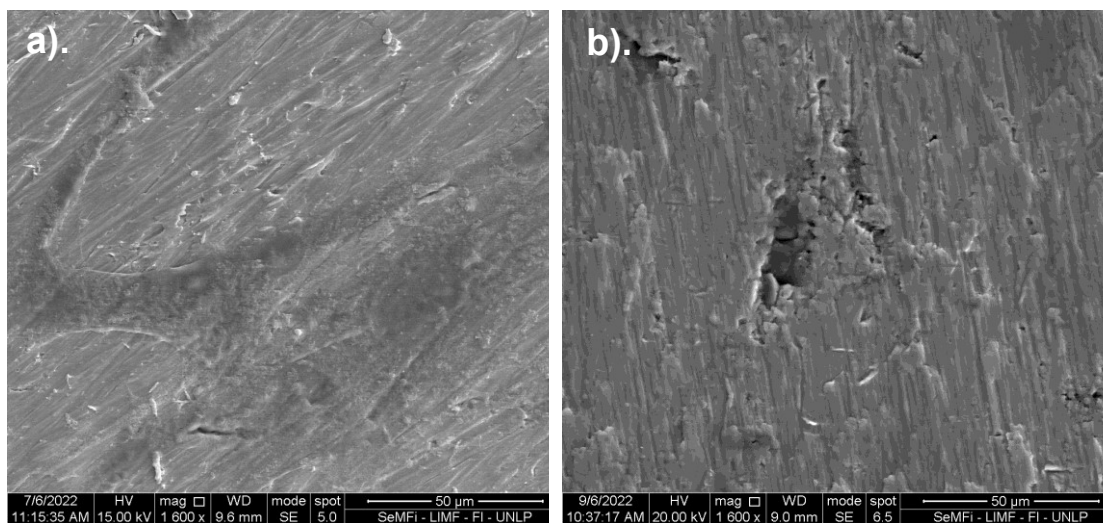


Figura 26. Superficies Mec a distintos tiempos de cultivo a). 48hs b). 6 días

Tabla 10. Resultados EDS – Superficie Mec.

Mec.	48 horas	6 días
	wt%	wt%
C	29,3	14,6
Ti	47,5	72,4
O	20,2	13,1
Cl	1	-
Na	1,5	-
Ca	0,1	-
P	0,1	-
Mg	0,1	-
S	0,2	0,1

4.2. Tiempos de ensayo

De los resultados obtenidos para el ensayo a 48 h, se observa la formación de un precipitado que se podría asociar a una matriz mineralizada. Este fenómeno indicaría una temprana diferenciación temprana de las células sobre la superficie, mecanismo necesario para la satisfactoria osteointegración del implante dental [38].

Al aumentar los tiempos de ensayo, a 4 y 6 días, se logró una buena adhesión de las células. Sin embargo, la resolución de la técnica en estudio no permite identificar claramente la forma y distribución del precipitado formado sobre la superficie. Según lo observado no se logra identificar si las células están fuertemente adheridas sobre la superficie, han diferenciado o se han despegado. Sin embargo, el estudio composicional de la superficie da indicios que existió formación de matriz debido a la presencia de Na, Ca, y P, principalmente. Los resultados obtenidos en el ensayo a 6 días fueron similares a los de 4 días.

4.3. Tratamiento alcalino

Según los resultados presentados en el apartado 4.1. se puede destacar el comportamiento de las superficies que fueron tratadas con NaOH. Se observa en las muestras BNa y GANa (Figura 14 y Figura 18), que existe una excelente adherencia de las células sobre la superficie, y además la presencia de elementos que indicarían el desarrollo de una matriz mineralizada, como Cl, Na, Mg, Ca, P y S se presenta mejorado en estas superficies.

Por otro lado, la muestra APQNa, no presentó el mismo comportamiento que las muestras BNa y GANa. Esto indicaría que, si bien el tratamiento alcalino es satisfactorio para

comportamiento biológico de las CMM sobre la superficie, el sustrato base influiría en las características superficiales del recubrimiento bioactivo y en consecuencia en los procesos de diferenciación de las CMM.

4.4. Análisis de la pieza dental

En la **Tabla 11** se presentan los resultados del análisis de EDS realizado sobre la cara interior de la pieza dental. En la misma se puede observar similitud de los elementos presentes en la composición química de las superficies estudiadas *in-vitro*.

La similitud se presenta mayormente con las superficies de BNa y GANa debido a la presencia de Ca, Na, P, Mg, Cl y S.

Tabla 11. Resultados EDS –Pieza dental

Diente.	wt%
C	56,2
O	25,7
Ca	11,3
P	5,6
S	0,6
Mg	0,3
Na	0,3
Cl	0,1

En la **Figura 27**, se observa la superficie de la matriz celular mineralizada presente en la pieza dental, la cual recubre la zona ósea [38]. La **Figura 27** b). y c)., corresponden a la predentina.

Las imágenes obtenidas permiten observar las similitudes entre la matriz extracelular y los precipitados formados en las superficies en estudio. Presentando formas porosas y precipitados interconectados con la matriz.

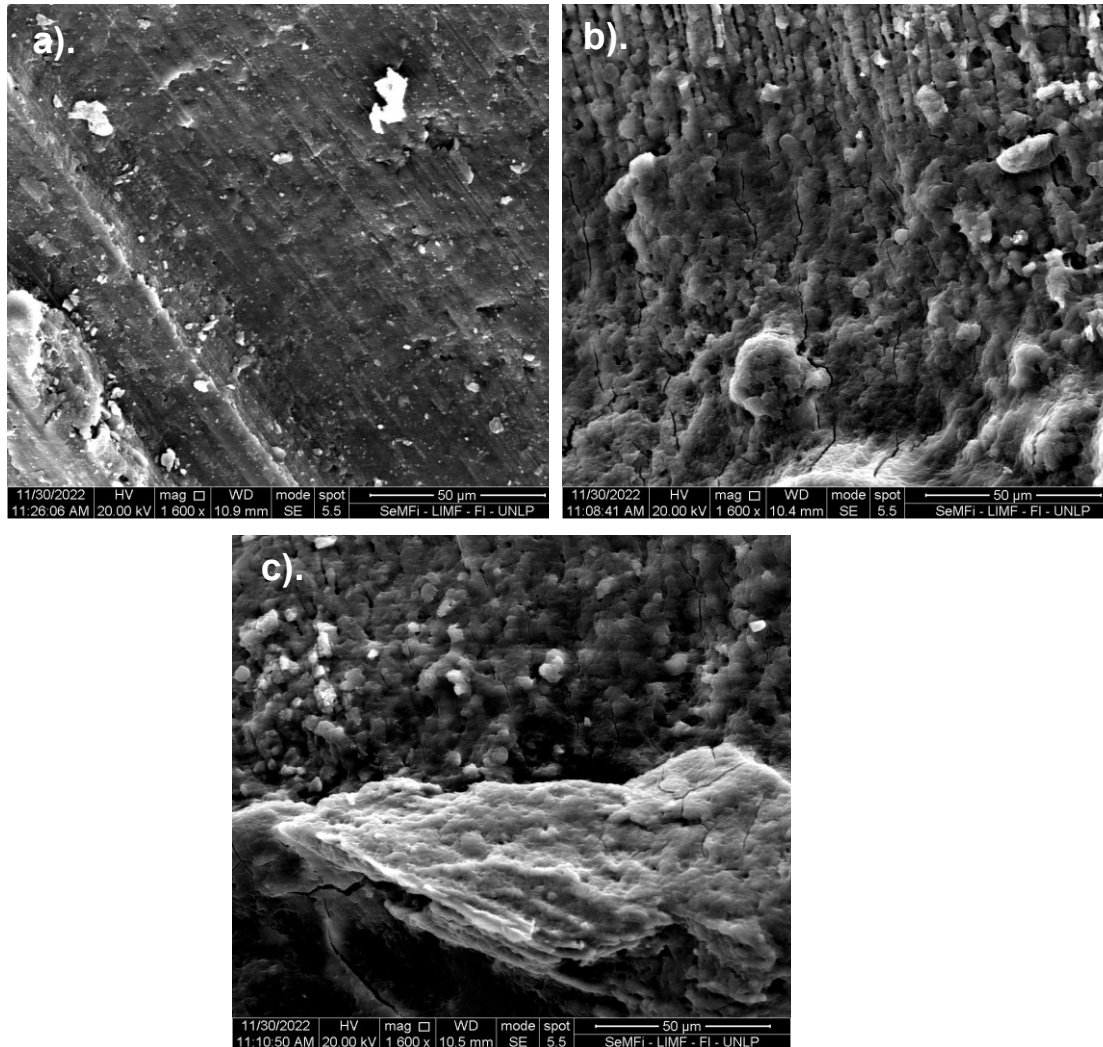


Figura 27. Imágenes SEM de la pieza dental. a). Borde de la pieza dental b) y c). Predentina

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO

Luego del análisis de los resultados arrojados por las distintas técnicas de caracterización se detallan las conclusiones abordadas; además de presentar distintas líneas futuras que podrían sumar conocimiento al estudio de los tratamientos superficiales para implantes dentales.

De las muestras estudiadas se concluye que:

- Las superficies biocompatibles desarrolladas mediante el tratamiento alcalino en NaOH favorecen la adhesión y actividad celular sobre la superficie.
- Se logra la adhesión celular en todas las superficies.
- No se observaron efectos citotóxicos en ningún caso.

- En todas las superficies se evidenció adhesión, crecimiento y comunicación intercelular, considerado este como uno de los factores más importantes para la diferenciación celular.
- Se observa que el tratamiento superficial tendrá gran efecto en la disposición y actividad metabólica celular.
- Se evidenció que las muestras BAPQ y BAPQNa presentaron una menor actividad celular en la superficie en comparación a las demás superficies de estudio.
- Se observa que existió una diferencia en la química superficial antes y después del ensayo *in vitro*.

Se propone como trabajo a futuro, la caracterización de la matriz segregada por las células adheridas a las superficies modificadas en cultivo *in vitro*, y determinar si existe diferenciación celular sobre la superficie estudiada. Se propone la caracterización de las superficies a partir del uso de microscopio confocal, logrando mayor especificidad para muestras biológicas. Además, contribuiría a la investigación la realización de ensayos *in vitro* siguiendo los mismos procedimientos a mayores tiempos de cultivo, a fin de obtener información del comportamiento celular sobre las superficies modificadas.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] José Gobbi, "Requirements for Selection/Development of a Biomaterial", *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, pp. 10670-107679, Feb. 2019.
- [2] N. H. Vasif Hasirci, "[Fundamentals of Biomaterials by (z-lib.org)]".
- [3] C. E. Misch, *Implantología contemporánea*, España: Elsevier mosby, 2009.
- [4] ALESSANDRO RALLS, "Material Design and Surface Engineering for Bio-implants," *he Minerals, Metals & Materials Society*, 2019.
- [5] A. Francesca Accioni, "Latest Trends in Surface Modification for Dental Implantology:," *Academic Editor: Dong Keun Han, 2022*.
- [6] D. Losica, "Advancing of titanium medical implants by surface," 2021.
- [7] C. Heng Dong, "SurfaceModified Techniques and Emerging Functional," 2020.
- [8] T. Hanawa, "Titanium–Tissue Interface Reaction," Tokyo, Japan, 2019.
- [9] Koon Gee Neoh, "Balancing osteoblast functions and bacterial adhesion on functionalized titanium," Singapore, 2012.
- [10] W. Fritz Thorey, "Osseointegration by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta2 coated titanium implants in femora of New Zealand white rabbits," in *Indian Journal of Orthopaedics*, 2011.
- [11] P. Carlo Mangano, "The osteoblastic differentiation of dental pulp stem cells and bone formation on different titanium surface textures," 2010.
- [12] Ying Li, ". Surface Immobilization of TiO₂ Nanotubes with Bone Morphogenetic Protein-2 Synergistically Enhances Initial Preosteoblast Adhesion and Osseointegration.," in *BioMed Research International*, China, 2019.
- [13] Youn, "Simple and facile preparation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 immobilized titanium implant via initiated chemical vapor deposition technique to promote osteogenesis for bone tissue engineering application," in *Materials Science & Engineering*, Republic of Korea, 2019.
- [14] C. Wen, ""Surface Coating and Modification of Metallic Biomaterials," 2015.
- [15] N. H. Vasif Hasirci, *Fundamentals of biomaterials*, New York, NY 10013, U.S.A.: Springer, 2018.
- [16] P. Buddy D. Ratner, *Biomaterials science*, London WC1X 8RR, UK, 2004.
- [17] T. Albrektsson, "Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration," 2001.
- [18] T. Larry L. Hench¹, "Twenty-first century challenges for biomaterials," 2010.

- [19] Rene Olivares-Navarrete, "Direct and indirect effects of microstructured titanium substrates on the induction," NW, Atlanta, GA, 30332-0363, USA, 2009.
- [20] Rene Olivares-Navarrete, "Coordinated regulation of mesenchymal stem cell differentiation on microstructured titanium surfaces by endogenous bone morphogenetic proteins," West Main Street, Richmond, VA, USA, 2015.
- [21] H. Ying-Sui Sun, "Enhancing the biological response of titanium surface through the immobilization of bone morphogenetic protein-2 using the natural cross-linker genipin," Taiwan, 2016.
- [22] J. Vlacic-Zischke, "The influence of surface microroughness and hydrophilicity of titanium on the up-regulation of TGF β BMP signalling in osteoblasts," Australia, 2011.
- [23] J. Lausmaa, "8 Mechanical, Thermal, Chemical and Electrochemical Surface Treatment of Titanium", in *Titanium in Medicine. Engineering Materials*, Springer, Berlin, 2001.
- [24] L. Anthony Citeaua, "In vitro biological effects of titanium rough surface obtained by calcium phosphate grid blasting," Francia, 2004.
- [25] M. Frauchigera, "Anodic plasma-chemical treatment of CP titanium surfaces for biomedical applications," Zurich , 2003.
- [26] S. C. Gao, "Role of adsorbed proteins on hydroxyapatite-coated titanium in osteoblast adhesion and osteogenic differentiation," 2014.
- [27] Ahmed El-Bannaa, "Surface modification techniques of dental implants," University, Cairo, Egypt, 2020.
- [28] T. K. a. S. Yamaguchi, "Bioactive Metals Prepared by Surface Modification: Preparation and Properties," Japón, 2011.
- [29] L. Winston A. Camargo, "Effect of surface alkali-based treatment of titanium implants on ability to promote in vitro mineralization and in vivo bone formation," Tokyo, Japon, 2017.
- [30] In-Hye Kim, "Wetting Behavior of Dental Implants," 2015.
- [31] L. Anthony Citeaua, "In vitro biological effects of titanium rough surface obtained by calcium phosphate grid blasting," Francia, 2004.
- [32] F.M. Frauchigera, "Anodic plasma-chemical treatment of CP titanium surfaces for biomedical applications," Zurich, 2003.
- [33] S. Jie Li, "Innovative Surface Modification Procedures to Achieve Micro/Nano-Graded Ti-Based Biomedical Alloys and Implants," China, 2021.
- [34] G. Luis Jesús González Orta, "Investigación con células madre de origen dentario," in *Gaceta dental*, Madrid, 2011.

- [35] G. Alelí Julieta Izquierdo-Vega a, "Células madre de origen dental, una alternativa en tratamientos odontológicos," in *Boletín Científico Instituto de Ciencias de la Salud*, Hidalgo, 2021.
- [36] GALLEGUILLOS, A. F. CARRIÓN, P. C. CABRERA and C. P. & I. S. C. LUZ, "Aislación y Caracterización de Células Madre Mesenquimales Provenientes de Pulpa y Folículo Dentario Humano," in *Int. J. Morphol.*, Chile, 2013.
- [37] G. d. Ferraris, "Histología y embrología bucodental," Córdoba, Argentina, 2004.
- [38] W. P. Michael H. Ross, "Histología, texto y atlas," 2001.
- [39] W. L. S. W. S. a. S. W. Haijun Cui, "Superwetable Surface Engineering in Controlling Cell Adhesion for Emerging Bioapplications," Beijing, China, 2020.
- [40] J. M. García, "Introducción al cultivo de tejidos," Buenos Aires, 2002.
- [41] K. Joffé, "Introducción al curso de cultivo y tejidos," 2022.
- [42] R. Bonetto, "El microscopio electrónico de barrido," in *Caracterización de Materiales – Facultad de Ingeniería – UNLP*.
- [43] C. Douglas A. Skoog, "Principios de Análisis Instrumental," in *Cengage Learning*, 2008.
- [44] J. I. Goldstein, *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, Amherst, MA, USA: Springer, 2018.
- [45] M. Linda C. Sawyer, "Polymer Microscopy," Estados Unidos, 2008.
- [46] KAPLAN, "Microstructural Characterization of Materials," Israel, 2008.
- [47] L. Francisco Carricondo Orejana, "Cultivo de células animales y humanas," in *Aplicaciones en medicina regenerativa, Vision*, Madrid, 2011.
- [48] I. Daniela Cadena-Herrera, "[Validation of three viable-cell counting methods: Manual, semiautomated and automated]," Colombia, 2015.
- [49] MG. Lawler, "Cell Counting - Commonly used techniques," 1997.
- [50] D. Minghao Zhang Lingui Gu, "Improvement of cell counting method for Neubauer counting," Chongqing, China, 2017.
- [51] L. a. Winston A. Camargo a, "Effect of surface alkali-based treatment of titanium implants on ability to promote in vitro mineralization and in vivo bone formation".
- [52] J. Reyes-Gasgaa, "Estudio del esmalte dental humano por microscopía electrónica," in *Universidad Nacional Autónoma de México*, 2021.
- [53] L. Meseguer-Olmoa, "Ingeniería tisular del tejido óseo. Diseño y desarrollo de materiales híbridos biológicamente activos basados en vitrocerámicas para sustitución ósea.," in *Revista Española de Cirugía* , Murcia, España, 2010.
- [54] F. Lozano, "Matriz ósea y consolidación," in *Medwave*, 2009.

- [55] H. V. LLano, "Desarrollo y caracterización de matrices extracelulares artificiales para regeneración ósea," in *Universidad del Valle*, Valle del Cauca, Santiago de Cali, 2016.
- [56] Addison a, "Extracellular matrix mineralization in murine MC3T3-E1 osteoblast cultures: An ultrastructural, compositional and comparative analysis with mouse bone," Quebec, Canadá, 2014.
- [57] R. y. Cotran, "Atlas de Anatomía Patológica," in *Elsevier Inc.*, Barcelona, 2007.
- [58] "Ectopic Osteoid and Bone Formation by Three Calcium-Phosphate Ceramics in Rats, Rabbits and Dogs," [Online]. Available: <https://journals.plos.org/plosone/article/figure?id=10.1371/journal.pone.0107044.g002>. [Accessed 12 Febrero 2023].
- [59] Qingge Wang, Peng Zhou, Shifeng Liu, Shokouh Attarilar , Robin Lok-Wang Ma, "Multi-Scale Surface Treatments of Titanium Implants," 2020.
- [60] [Online]. Available: <https://dle.rae.es/adhesi%C3%B3n> . [Accessed 5 Febrero 2023].
- [61] K. Hyeongil Kim, "The biocompatibility of SLA-treated titanium implants," in *Biomedical Materials*, Buffalo, nueva York, 2008.

7. ANEXO

Formación de matriz porosa en la superficie GA a mayores aumentos (6000x).

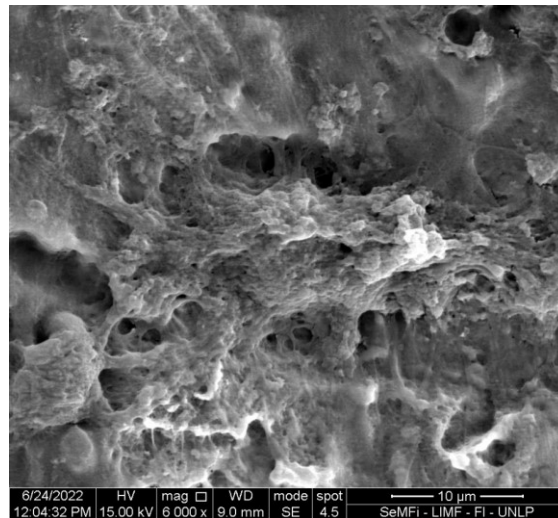


Figura 28. Superficie GA a 6000x

Superficie APQ base sin ensayo con CMM *in-vitro*. Se observa la topografía superficial a fin de comparar la superficie ocupada por las células luego del ensayo *in vitro*.

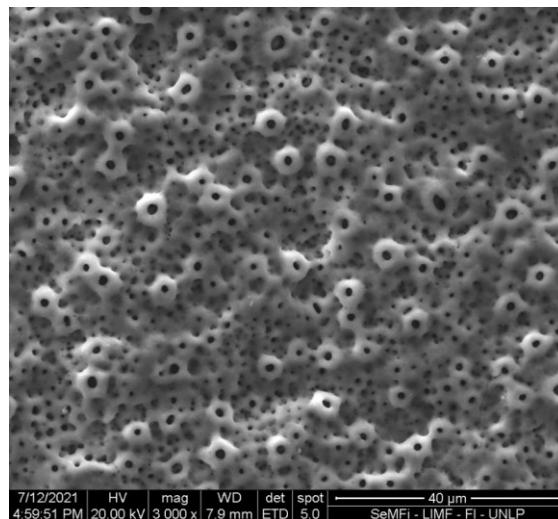


Figura 29. Superficie APQ

Disposición característica en forma entramada y paralela de las células madre mesenquimales adheridas sobre una placa de Petri.

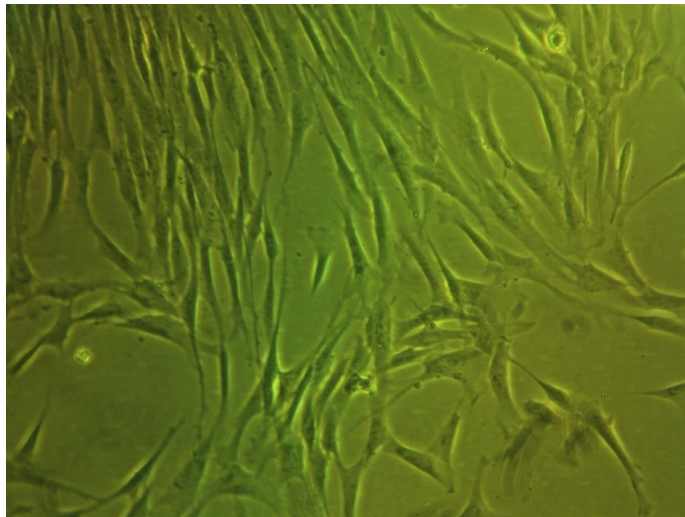


Figura 30. CMM sobre placa de Petri.