

ESTUDIO IN VITRO DE LA ADHESIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN SUPERFICIES DE IMPLANTES DENTALES DE TITANIO

Kohan, Juliana^a; Blasetti, Nahuel^b; Mayocchi, Karina^b; Lemos, Adriana^a; Kang, Kyung^a; Llorente, Carlos^a

^a LIMF, Centro asociado CICPBA, Facultad de Ingeniería-UNLP

^b LBMB, Facultad de Odontología-UNLP
kohanjuliana@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Los biomateriales son materiales utilizados y adaptados para su uso médico. En las últimas décadas se ha incrementado su uso, como consecuencia de distintas afecciones médicas, ayudando de esta manera a mejorar la calidad de vida de los seres humanos.

Particularmente, en el caso de los implantes dentales el incremento y la necesidad de su uso condujo a que, en los últimos años, se haya puesto mucho esfuerzo en el diseño y proceso de fabricación de implantes, sobre todo desde la ingeniería de superficies. Estos avances, permitieron una mayor aceleración y robustez en los procesos de osteointegración, contribuyendo a la disminución de la tasa de fracaso de los implantes por enfermedades periimplantarias. [1]

El Titanio y sus aleaciones son ampliamente utilizados como biomateriales debido a su excelente 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. Además, el titanio posee la propiedad de pasivarse frente a distintos medios acuosos, es decir, formar espontáneamente una película de óxido (TiO₂) inerte, adherente y muy estable sobre la superficie del metal. Esta película de óxido nativa (TiO₂), le otorga una excelente resistencia a la corrosión en variados ambientes y la característica de ser un material bioinerte (no se generan reacciones ni modificaciones en el entorno biológico, tampoco se desarrolla una unión directa, adherente y fuerte con los tejidos duros y/o blandos).

Dentro de las propiedades funcionales que lo hacen apto para su aplicación en la implantología dental, se destacan las buenas propiedades mecánicas (resistencia a tracción y a fatiga, dureza, resistencia al desgaste, y ductilidad y un peso específico relativamente bajo (densidad de 4,5 g/cm³), en comparación con otros biomateriales comerciales. [2].

Una de las propiedades fundamentales que debe satisfacer el titanio de manera de asegurar el éxito del dispositivo biomédico, es el de ser osteointegrable. Se define la 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. 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 (Figura 1). Las características superficiales tendrán gran influencia en la interacción del implante con el organismo. Es por esto que se han desarrollado métodos de modificación de superficie para mejorar las características del titanio como biomaterial, transformando su superficie bioinerte en bioactiva los implantes dentales, el comportamiento bioactivo de la superficie refiere a la adhesión y actividad celular, es decir; proliferación, diferenciación y producción de matriz extracelular, orientando a lograr la osteointegración, disminuyendo los tiempos de tratamiento y la probabilidad de fracaso de los implantes [3] [4]. En la **Figura 1** se presenta un esquema resumido del mecanismo de osteointegración.

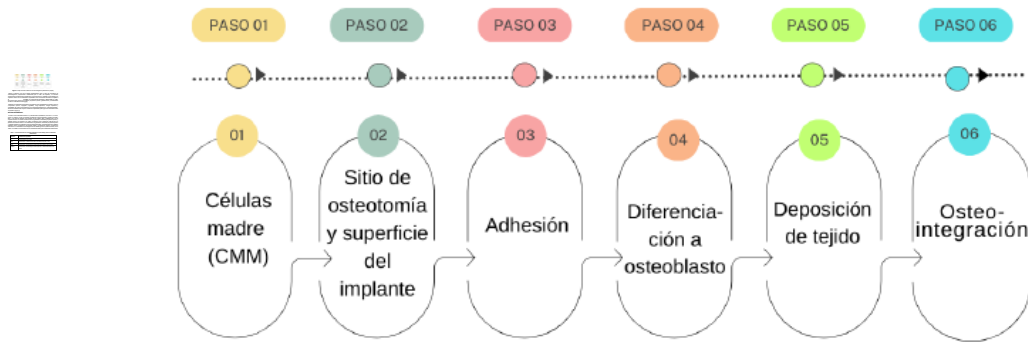


Figura 1. Esquema del mecanismo de osteointegración [Elaboración propia].

Siendo la adhesión una de las etapas fundamentales para el inicio del mecanismo de osteointegración (requerimiento fundamental para el éxito del implante), se estudian ampliamente los tratamientos superficiales a fin de favorecer la adhesión de las células a la superficie. Dentro de los tratamientos superficiales más comúnmente utilizados en implantes dentales se encuentran: el granallado con partículas biocompatible o RBM (siglas en inglés, Resorbable Blast Media) el anodizado por plasma químico, grabado ácido y el tratamiento alcalino en hidróxido de sodio [5] [6].

Mediante los tratamientos superficiales se modifican las propiedades de la superficie como la composición química, topografía (rugosidad), carga superficial, energía superficial y mojabilidad, las cuales tienen influencia en la respuesta biológica de un material implantado. Se buscan establecer las mejores condiciones superficiales para lograr actividad celular sobre la superficie [4] [5] [7].

MÉTODO EXPERIMENTAL

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 APQNa) todas con un espesor de 6mm. Se realizaron tratamientos de granallado, anodizado por plasma químico, y grabado ácido a las muestras, las cuales se utilizaron como material de sustrato para un posterior tratamiento alcalino. Los tratamientos de granallado, anodizado por plasma químico y grabado ácido fueron realizados en la empresa Kinetical SRL, quienes brindaron los distintos sustratos para la investigación del presente trabajo. El tratamiento alcalino en NaOH fue realizado en el Laboratorio de Investigaciones de Metalurgia Física (LIMF-FI-UNLP). En la Tabla 1 se exhibe la nomenclatura de las muestras utilizadas para los diferentes tratamientos.

Tabla 1. Nomenclatura de las muestras utilizadas en este trabajo para los diferentes tratamientos.

Muestra	Tratamiento Superficial
B	Blastinizado (2 min/ 6 Bar)
BNa	Blastinizado + Tratamiento alcalino en NaOH (10 M, 60 C, 24 h)
APQ	Blastinizado + Anodizado por Plasma Químico (CaHPO_4 - $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$)
APQNa	Blastinizado + Anodizado por Plasma Químico + Tratamiento alcalino en NaOH

GA	Grabado ácido
GANa	Grabado ácido + tratamiento alcalino en NaOH
Mec.	Sin tratamiento superficial

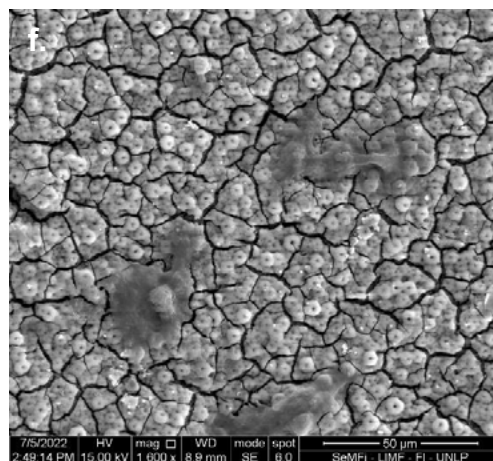
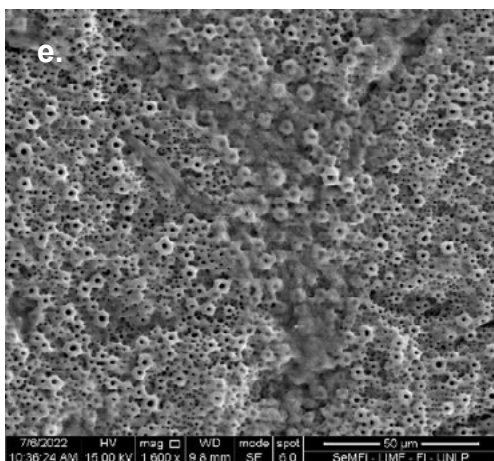
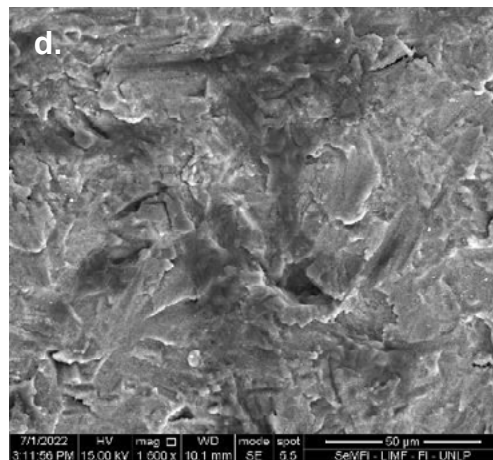
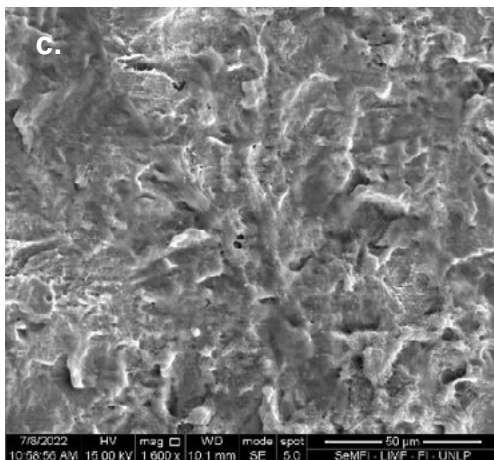
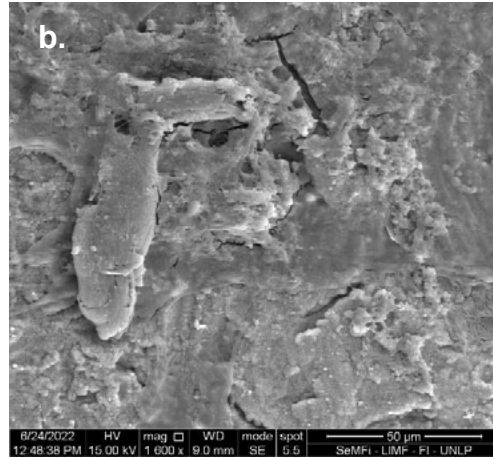
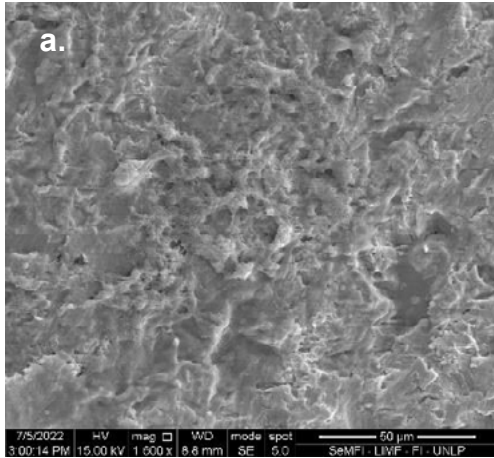
Se realizaron cultivos en células madre mesenquimales (CMM) durante 48 horas, en el Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología Odontológica de la Facultad de Odontología de la UNLP, según protocolo aprobado por el comité de Bioética de dicha institución. Las CMM se obtuvieron de pulpas de terceros 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/muestra de 20.000 para las superficies de 9mm de diámetro y 10.000 para las superficies de 6mm de diámetro.

Posteriormente se caracterizaron las superficies mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, siglas en inglés de *Scanning Electron Microscopy*), con imágenes topográficas y de contraste composicional para todas las superficies en estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 2 se exhiben los distintos sustratos modificados superficialmente luego del cultivo en CMM durante 48 h, en todas las superficies se evidenció adhesión celular, lo cual implica que la interacción implante-células es adecuada y podría desarrollarse actividad celular sobre la superficie. La adhesión celular no se presentó por igual en todas las superficies, esto indica que las características superficiales tendrán influencia en el comportamiento celular.

Las muestras B (fig. 2 (a).), BNa (fig. 2 (b).), GA (fig. 2 (c).) y GANa (fig. 2 (d).), presentaron un mejor comportamiento en comparación a las muestras APQ y APQNa. La mejora en el comportamiento se debe a la formación de un precipitado el cual es producto de la actividad celular desarrollada sobre la superficie, producido por las células adheridas a la superficie. Las muestras APQ (fig. 2 (e).) y APQNa (fig. 2 (f).), presentaron 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 (figura 3). La superficie Mec. (fig. 2 (g).) presenta 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 (figura 4). La pérdida de la disposición original de la célula como CMM podría indicar que ocurre una diferenciación. Sobre esta última superficie no se observa formación de precipitado.



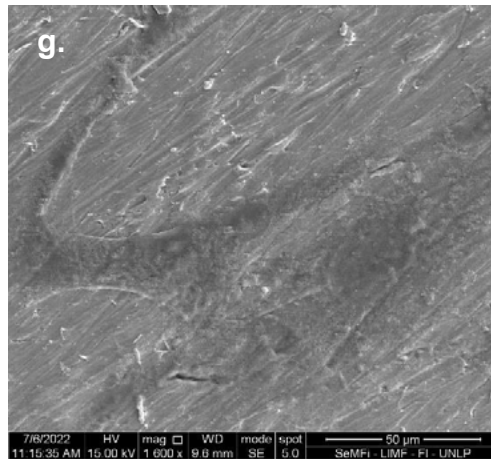


Figura 2. Células adheridas sobre la superficie. SEM SE. (a). B (b). BNa (c). GA (d). GANa (e). APQ (f). APQNa (g). Mec.

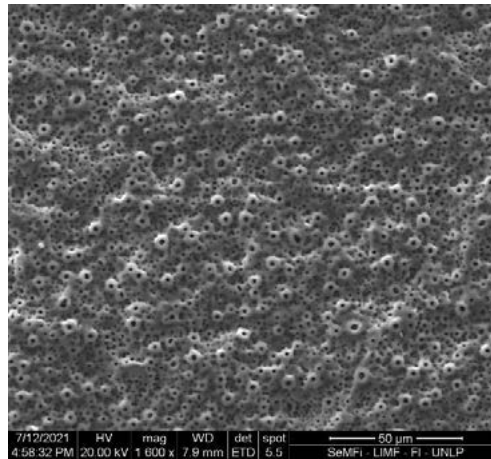


Figura 3. Superficie APQ

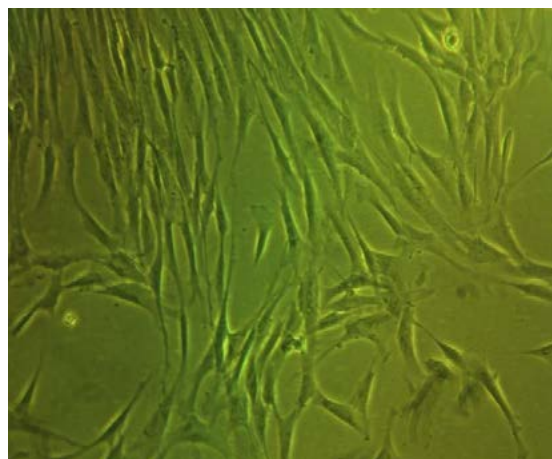


Figura 4. Disposición característica de forma paralela y entrada de una CMM.

CONCLUSIONES

Del análisis de los distintos resultados obtenidos se concluye que:

- Todos los sustratos en estudio presentaron adhesión celular. No se observaron efectos citotóxicos en ningún caso.
- Las superficies de BNa y GANa presentaron una mayor adhesión y actividad celular en comparación a las demás superficies.
- Se evidenció que las muestras BAPQ y BAPQNa presentaron una menor actividad celular en la superficie en comparación a las demás superficies de estudio.
- 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.

BIBLIOGRAFÍA

- [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*, New York, NY 10013, U.S.A.: Springer, 2018.
- [3] T. Larry L. Hench¹, "Twenty-first century challenges for biomaterials," 2010.
- [4] C. Wen, "Surface Coating and Modification of Metallic Biomaterials," 2015.
- [5] J. Lausmaa, "8 Mechanical, Thermal, Chemical and Electrochemical Surface Treatment of Titanium," in *Titanium in Medicine. Engineering Materials*, Springer, Berlin, 2001.
- [6] L. Anthony Citeaua, "In vitro biological effects of titanium rough surface obtained by calcium phosphate grid blasting," Francia, 2004.
- [7] Rene Olivares-Navarrete, "Direct and indirect effects of microstructured titanium substrates on the induction," NW, Atlanta, GA, 30332-0363, USA, 2009.