

## INGENIERÍA DE SUPERFICIES EN ODONTOLOGÍA REGENERATIVA

### SURFACE ENGINEERING IN REGENERATIVE DENTISTRY

**Merino, G.; Mayocchi, K.; Blasetti, N.; Mayocchi, R. M.; Kang, K. W.; Lemos Barbosa, A.; Kohan, J.; Llorente, C.**

LBMB (Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología) Facultad de Odontología de La Plata.

LIMF (Laboratorio de Investigaciones de Metalurgia Física), Centro Asociado CICPBA, Departamento de Materiales, Facultad de Ingeniería-U.N.L.P.)

*Calle 50 1 y 115 SN, CP 1900. La Plata. Argentina. [karinamayocchi@gmail.com](mailto:karinamayocchi@gmail.com)*

Fuente de Apoyo Financiero: U.N.L.P.

“Sin conflicto de intereses”

## Resumen

La ingeniería de tejidos ha evolucionado en el campo del desarrollo de biomateriales para la creación y combinación de andamiajes, células y moléculas biológicamente activas para crear tejidos funcionales. Con el objetivo de estudiar la interacción de distintas poblaciones de células madre mesenquimales obtenidas de tejidos dentarios con matrices de distintas microestructuras y composición, y caracterizar dichas células, se realizó en el LBMB (Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología) de la Facultad de Odontología U.N.L.P. junto con el LIMF (Laboratorio de Investigaciones de Metalurgia Física), Centro Asociado CICPBA, Departamento de Materiales, Facultad de Ingeniería - U.N.L.P.), el aislamiento y cultivo de las células madre mesenquimales, analizando la expresión de marcadores antigénicos de superficie celular para la identificación de las mismas, y determinando su adhesión y viabilidad sobre distintas superficies de Titanio. Junto al desarrollo de los cultivos se confeccionaron distintas matrices biocompatibles para estudiar la interacción y capacidad inductora de las mismas con las células madre obtenidas. Este trabajo contribuyó a la caracterización morfofuncional de células madres de pulpa indicado en la odontología regeneradora, confirmando hallazgos y buscando nuevas matrices biocompatibles para trasladar a la clínica en una futura fase de la investigación.

**Palabras Clave:** Células madre-matrices-diferenciación

## Summary

Tissue engineering has evolved in the field of developing biomaterials for the creation and combination of scaffolds, cells and biologically active molecules to create functional tissues. With the objective of studying the interaction of different populations of mesenchymal stem cells obtained from dental tissues with matrices of different microstructures and composition, and characterizing these cells, it was carried out at the LBMB (Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology) of the Faculty of Dentistry UNLP together with the FMLI (Physical Metallurgy Research Laboratory , CICPBA Associated Center, Department of Materials, Faculty of Engineering-UNLP), the isolation and culture of mesenchymal stem cells, analyzing the expression of cell surface antigenic markers for identifying them, and determining their adhesion and viability on different Titanium surfaces. Along with the development of the cultures, different biocompatible matrices were made to study their interaction and inductive capacity with the stem cells obtained. This work contributed to the morphofunctional characterization of pulp stem cells indicated in regenerative dentistry, confirming findings and searching for new biocompatible matrices to transfer to the clinic in a future phase of research.

**Keywords:** Stem cells-scaffold-differentiation

## Introducción

El presente proyecto surge del estudio de Células Madre Mesenquimales (CMM) de origen pulpar, proyecto I+D 2015-2018. La caracterización de células madre de origen pulpar y la producción por parte de las mismas de una matriz mineralizable sobre la superficie del plástico, aportó los datos básicos para llevar el cultivo de CMM sobre otras superficies que actúen como matrices biocompatibles y así evaluar la posible diferenciación de las mismas hacia un linaje osteoblástico. A través de ello, se desarrolla la bioingeniería de tejidos en el campo del desarrollo de biomateriales para la creación y combinación de andamiajes, células y moléculas biológicamente activas para crear tejidos funcionales. Las características de las superficies de Ti bioactivas en cuanto a topografía y energía superficial (mojabilidad) son suficientes para inducir la diferenciación de CMM en ausencia de factores de crecimiento exógenos o medios estimulantes *in vitro*. En este proyecto, en su etapa inicial, se inició el estudio de diferentes matrices, entre ellas Ti, Peek y matrices óseas biológicamente activas <sup>6-8</sup>. En el año 2020, el Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología Odontológica (LBMB), Facultad de Odontología – U.N.L.P. y el Laboratorio de Investigaciones de Metalurgia Física (LIMF), Centro Asociado CICPBA, Departamento de Materiales, Facultad de Ingeniería – U.N.L.P., realizaron los primeros experimentos conjuntos en el marco de una tesis doctoral en ingeniería centrada en el desarrollo de nuevos tratamientos superficiales para implantes dentales de titanio con el objetivo de mejorar la osteointegración. La ingeniería tisular es un campo multidisciplinario para el desarrollo de sustitutos biológicos que pueden restaurar, mantener y mejorar la función de los tejidos. Los elementos esenciales de la ingeniería de tejidos son los factores de crecimiento, las células madre y las matrices extracelulares que constituyen el microambiente para su crecimiento. Con el estudio de propiedades como osteoconducción, osteoinducción y osteogénesis en regeneración ósea se inició la aplicación de matrices biodegradables o "andamios biológicos" con estructura porosa, trabecular o reticular, que pueden ser sintéticas o naturales. Estas matrices biológicas se colocan en el tejido dañado para promover el microambiente apropiado, el crecimiento y propagación *in situ* de las células sanas circundantes o bien de células madre que pueden implantarse en ese tejido o estar incorporadas al biomaterial que integra la matriz, con la finalidad de acelerar la regeneración. En esta combinación, las células vivas suministran los componentes biológicos, mientras que el material de andamio sirve para apoyar y favorecer la proliferación celular <sup>4-5</sup>. La interacción entre las células y su matriz extracelular juega un papel crucial en la regulación de las funciones celulares. La regeneración tisular puede obtenerse por métodos *in vivo* e *in vitro*. La regeneración *in vivo* puede producirse por dos mecanismos básicos: la desdiferenciación de células diferenciadas capaces de multiplicarse y diferenciarse ulteriormente en otras estirpes celulares, y la existencia de células madre que permanecen sin diferenciarse desde la época embrionaria para ser utilizadas posteriormente. Ambos caminos están regulados por moléculas como factores de crecimiento, citoquinas y hormonas. Por su parte, la ingeniería de tejidos *in vitro* comprende la obtención de tejidos en el laboratorio para su posterior implantación en el sitio dañado. Las células ideales para la ingeniería de tejidos deben ser fáciles de obtener y de expandir, conservar el fenotipo, mantener su función y ser multipotenciales para diferenciarse o transdiferenciarse a una variedad de células

especializadas, específicas de tejidos u órganos y no deben generar respuestas inmunes.<sup>1-2</sup>

Las células madre mesenquimales (MSCs, acrónimo derivado de *MesenchymalStromal/StemCells*) son células de origen adulto o somático, indiferenciadas, dotadas de la capacidad de originar células comprometidas en determinadas rutas de desarrollo mesodérmico que se convertirán finalmente, por diferenciación, en tipos celulares especializados morfológica y funcionalmente (Friedestein *et al.* 1970).<sup>3</sup> Para definir las MSCs, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, *Internacional Society for Cellular Therapy*) estableció que se debe demostrar su morfología fibroblastoide y la adherencia al plástico. De igual manera, expresar como mínimo los marcadores de superficie CD105, CD90 y CD73 y no mostrar expresión de marcadores de células hematopoyéticas como CD34 y CD45. Actualmente se busca que un injerto natural tenga precursores osteogénicos y factores que promuevan el crecimiento del nuevo tejido. 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.<sup>6</sup> Además, el titanio posee la propiedad de pasivarse frente a distintos medios acuosos, es decir, formar espontáneamente una película de óxido (TiO<sub>2</sub>) inerte, adherente y muy estable sobre la superficie del metal. Esta película de óxido nativa (TiO<sub>2</sub>),<sup>8</sup> 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/cm<sup>3</sup>), en comparación con otros biomateriales comerciales. Una de las propiedades fundamentales que debe satisfacer el titanio de manera de asegurar el éxito del dispositivo biomédico, es el de ser osteointegrable. 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. 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.<sup>5-6-7-8-9</sup>

## Objetivo

Estudiar la interacción de distintas poblaciones de células madre mesenquimales obtenidas de tejidos dentarios con Superficies de Ti modificadas.

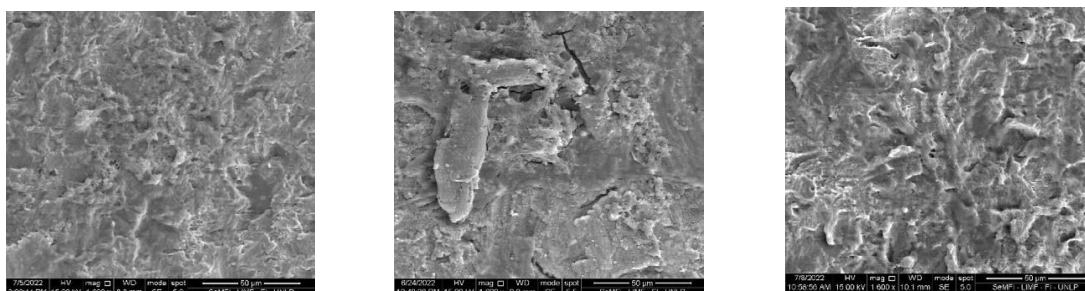
## Materiales y Métodos

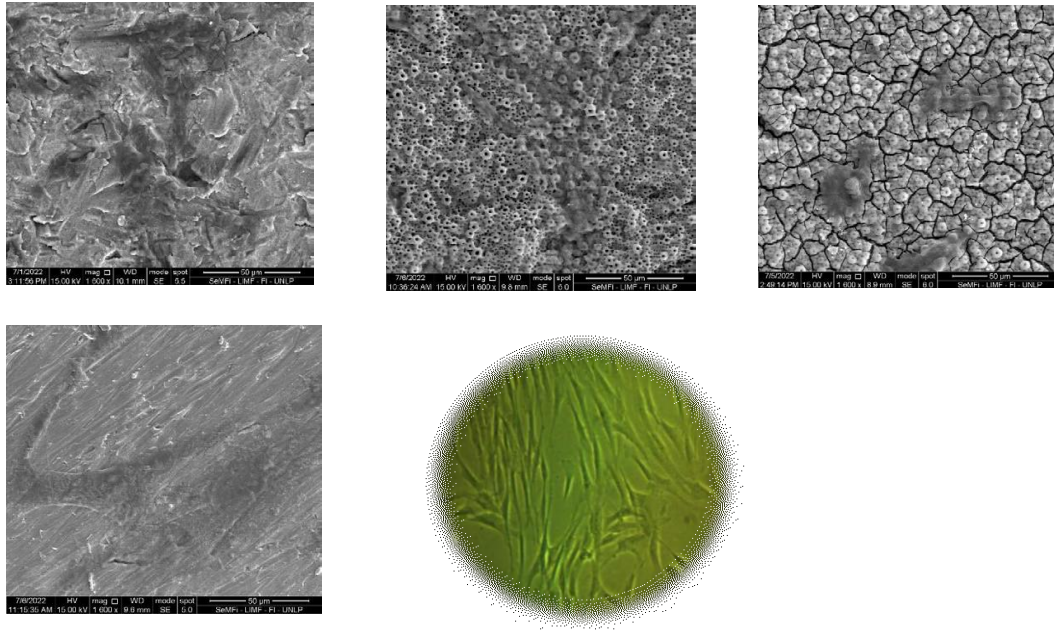
Se utilizó como material de estudio Ti c.p ASTM Grado 4 (0.0039% N, 0.0112% C, 0.11% Fe, 0.24% O, 0.00% H, Ti bal) en muestras cilíndricas de 9mm de diámetro (muestras: B, BNa y Mec.) y de 6mm de diámetro (las muestras de GA, GANa, APQ y APQNa) todas con un espesor de 6mm. Se realizaron tratamientos 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. El tratamiento alcalino en NaOH fue realizado en el Laboratorio de Investigaciones de Metalurgia Física (LIMF-FI – U.N.L.P.). 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 U.N.L.P., según protocolo aprobado por el comité de Bioética. Las CMM se obtuvieron de pulpas de terceros molares retenidos con indicación de extracción y de dientes supernumerarios extraídos en el Hospital Odontológico Universitario de la Facultad de Odontología de la U.N.L.P. Para el cultivo se utilizaron células correspondientes a P<sub>7</sub>. Se utilizó como medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con SFB al 10% y antibióticos; se sembró una cantidad de células/muestra de  $2 \times 10^4$  para las superficies de 9 mm de diámetro y  $1 \times 10^4$  para las superficies de 6 mm de diámetro. Posteriormente se caracterizaron las superficies mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) con imágenes topográficas y de contraste composicional para todas las superficies en estudio.

## Resultados

En la Fig. 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. 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.





4

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

### Discusión

La plasticidad de las células madre permite controlar el proceso de diferenciación hacia distintos tipos celulares y tisulares para un mayor control de las condiciones experimentales, y ya se conoce un gran número de factores implicados en la diferenciación celular con los que dirigir la evolución de estas células. <sup>2</sup>Los grupos de investigación sobre factores osteoinductivos, muestran que tienen efectos sobre la regulación fenotípica y la producción de matriz ósea por parte de los fibroblastos, condrocitos y osteoblastos <sup>7</sup>. El desarrollo de dispositivos implantables que favorezcan la osteointegración y, al mismo tiempo, reduzcan los riesgos de infección es crucial en la rehabilitación ósea. Los tratamientos superficiales bioactivos en titanio, como el tratamiento alcalino y la hidroxiapatita, pueden mejorar significativamente la osteointegración del implante. <sup>8-9</sup>

### 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. Este trabajo contribuyó a la caracterización morfofuncional de células madres de pulpa indicado en la odontología regeneradora, confirmando hallazgos y buscando

nuevas matrices biocompatibles para trasladar a la clínica en una futura fase de la investigación.

### Referencias Bibliográficas

1. Katarzyna Stefańska, Rut Bryl, Lisa Moncrieff, Nelson Pinto, Jamil A. Shibli, Marta Dyszkiewicz-Konwińska, Mesenchymal stem cells – a historical overview. *Medical Journal of Cell Biology*. Vol.8 (2020) DOI: <https://doi.org/10.2478/acb-2020-001>
2. Mikołaj Lorenz . Application potential and plasticity of human stem cells. *Medical Journal of Cell Biology*, 2019. DOI: <https://doi.org/10.2478/acb-2019-0019>
3. Friedenstein A.J, Chailakhjan R.K, Lalykina K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970;3:393–403.
4. José Gobbi, “Requirements for Selection/Development of a Biomaterial”, *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, pp. 10670-107679, Feb. 2019.
5. Vasif Hasirci, NH: *Fundamentals of biomaterials*, New York, NY 10013, U.S.A.: Springer, 2018.
6. C. Wen, “Surface Coating and Modification of Metallic Biomaterials,” 2015.
7. Rene Olivares-Navarrete, “Direct and indirect effects of microstructured titanium substrates on the induction,” NW, Atlanta, GA, 30332-0363, USA, 2009.
8. Kohan, J; Blasetti, N; Mayocchi, K; Lemos, A; Kang, K ; Llorente, C. Estudio in vitro de la adhesión de células madre mesenquimales en superficies de implantes dentales de titanio. VII Jornadas de Ingeniería en Materiales (JIMA) Universidad Nacional de San Martín, 2022. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/151593>
9. Kohan, J; Blasetti, N; Mayocchi, K; Lemos Barboza, A; Kang, KW; Llorente, C. Estudio in vitro de la adhesión de células madre mesenquimales en superficies de implantes dentales de titanio. VII Jornadas de Investigación, Transferencia y Extensión de la Facultad de Ingeniería. 2023. ISBN: 978-950-34-2256-4 Páginas: 747-752