


Estudio de la interacción de bacterias implicadas en la formación de placa dento-bacterina con superficies de titanio comercialmente puro *in vitro* y su asociación con la peri-implantitis.

Memoria de Tesis presentada por:

MCO. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández



Para optar por el grado de Doctor por la
Universitat Politècnica de Catalunya

Dirigida por:

Dr. Francisco Javier Gil Mur
Dra. Elisabeth Engel

Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica
Universitat Politècnica de Catalunya

Barcelona

UPC

2009

MOTIVACION Y OBJETIVOS

Los implantes dentales han llegado a ser un tratamiento rutinario altamente exitoso en la restitución de piezas dentales que se han perdido, con un tasa de supervivencia reportada >89% entre 10 y 15 años de seguimiento. Se estima que 2 millones de implantes son colocados por año y que este valor ira en aumento debido al incremento de la longevidad a nivel mundial.

Aunque la tasa de éxito del uso de implantes dentales es alta, algunos de los implantes colocados tienen que ser removidos debido a algún tipo de fallo. Estos fallos, clínicamente son divididos en dos tipos, biológicos y biomecánicos. Los fallos biomecánicos se deben principalmente a la carga aplicada al implante, es decir que pueda deberse a una carga masticatoria prematura o excesiva (pudiendo deberse a problemas como el bruxismo) o también, a una fractura o daño estructural del implante¹.

Los fallos denominados como biológicos, están asociados principalmente a la acumulación de la placa dento-bacteriana ocasionando infecciones, aunque también se han mencionado la fibrointegración (formación de una cápsula fibrosa alrededor del implante) debido quizás a sobremanipulación durante el acto quirúrgico.

De esta manera los fallos biológicos pueden subdividirse en fallos tempranos y fallos tardíos. Los fallos tempranos están directamente correlacionados con infecciones como resultado de una contaminación durante la cirugía o una deficiente cicatrización. Mientras que los fallos tardíos generalmente ocurren después de un año de la implantación y se deben a la formación y acumulación de placa dento-bacteriana lo que ocasionara una peri-implantitis.

Tanto los fallos asociados a la sobrecarga oclusal, como los que son debidos a una contaminación durante la intervención quirúrgica son responsabilidad del médico. En el caso de los fallos tardíos, debido a la acumulación de placa dento-bacteriana sobre la superficie de estos implantes (la cual está influenciada en gran parte por las propiedades de superficie del material), se han implementado múltiples estrategias para el mejoramiento de las propiedades de superficie de los implantes dentales, con la finalidad de favorecer tanto la osteointegración como la cicatrización del tejido gingival circundante y con esto disminuir la posibilidad de colonización por bacterias.

¹ Norwsky P. Bumgardner D., J. Biomedical Mat. Research, 2009

Hasta el día de hoy se sabe la influencia que tiene la presencia de bacterias en el fracaso de los implantes, ya sea por estudios que se han realizado, evaluando la formación de placa dento-bacteriana *in vivo* (pacientes) o de manera inducida, en animales de laboratorio. Pero la complejidad intrínseca de la placa dento-bacteriana (gran variedad de bacterias, múltiples y complejas interacciones, entre otras cosas), dificulta el estudio de las interacciones específicas dadas entre las bacterias y las superficies de los implantes.

Por lo que las motivaciones de este trabajo de tesis fueron: en primer lugar diseñar una metodología *in vitro* para la evaluación de la adhesión bacteriana y en segundo lugar, estudiar la interacción de bacterias sobre diferentes superficies de titanio con diferentes rugosidades obtenidas por granallado.

Dado esto, los objetivos de este trabajo de Tesis son:

- Estudiar el comportamiento y la interacción de bacterias (colonizadores primarios) con diferentes superficies de titanio.
- Diseñar un modelo *in vitro*, para la evaluación de la interacción de bacterias con condiciones similares a la saliva humana.
- Evaluar y cuantificar el daño ocasionado por las bacterias sobre las superficies de titanio.

RESUMEN

La peri-implantitis puede poner en riesgo la integridad funcional de un implante dental, ya que dependiendo de la severidad del daño, éste puede ocasionar la pérdida irremediable del implante. Dicho padecimiento está asociado directamente con la formación de la placa dento-bacteriana sobre la superficie del implante.

En este trabajo de tesis se estudiarán, por un lado las propiedades de superficie de 6 tipos diferentes de tratamientos utilizados en implantes dentales (tales como: la rugosidad, la mojabilidad y la energía superficial (Capítulo 2) y su influencia en el comportamiento de adhesión de dos cepas bacterianas *Streptococcus sanguinis* y *Lactobacillus salivarius*. La primera de ellas muy importante en la formación de la placa dento-bacteriana por ser una de las bacterias que colonizan la superficie del implante inmediatamente después de ser colocado, facilitando la incorporación de otras bacterias periodontopatogénicas, la segunda, tiene la función de mantener el equilibrio de la placa dento-bacteriana. Y por otro lado, la repercusión que tiene la adhesión y colonización de estas bacterias sobre las superficies de titanio.

Para esto, se realizaron dos tipos de ensayos de manera general, los primeros en sus medios rutinarios de cultivo para cada cepa bacteriana (Capítulo 3) y los segundos en una saliva artificial modificada (Capítulo 4). Los resultados observados en ambos casos evidenciaron, el daño ocasionado por la presencia de bacterias en contacto directo con las superficies de titanio, los cuales fueron evaluados detalladamente en el capítulo 5.

ABSTRACT

Peri-implantitis is a soft tissue dental implant inflammation, which may increase implant failure risk, depending direct on severity illness. This device affection is correlated with implant surface bacterial plaque formation.

In this thesis work we studied in one hand, titanium surface properties of 6 different kind of treatments commonly used on dental dental implants (such as: roughness, wettability and surface energy) and its adhesion influence on 2 bacteria strains *Streptococcus sanguinis* and *Lactobacillus salivarius* (the first one is implied on dental plaque formation, because these bacteria colonize implant surface immediately after implantation, leading and facilitating the periodontopatogenic bacteria coaggregation, whereas the second strain, has to maintain dental plaque equilibrium). And in the other hand, the last part of this work was focused on the bacterial adhesion effect on titanium surfaces.

In general we made two sort of experiments: in rutinary culture media (specific for each strain) and in modified artificial saliva (Chapters 3 and 4 respectively). Our results showed a titanium surface damage because of bacterial attachment on that, which were detailly studied in chapter 5.

INDICE

CAPITULO 1.....	11
1.1. ESTADO DEL ARTE	12
1.1.1. IMPLANTES DENTALES.....	12
1.1.1.1. <i>Características superficiales de los implantes dentales.</i>	13
1.1.2. SELLADO BIOLÓGICO	15
1.1.2.1. <i>Problemas con el sellado biológico.</i>	17
1.1.3. PERI-IMPLANTITIS Y PERIODONTITIS.....	18
1.1.4. BACTERIAS Y EL SELLADO BIOLÓGICO	19
1.1.5. PARTÍCULAS METÁLICAS EN TEJIDOS SUAVES	22
1.1.6. ESTRATEGIAS PARA MEJORAR EL MANTENIMIENTO DE LOS IMPLANTES DENTALES.....	24
1.2. REFERENCIAS.....	26
CAPITULO 2.....	31
2.1. INTRODUCCIÓN	32
2.1.1. PROPIEDADES DE SUPERFICIE DE LOS BIOMATERIALES	32
2.1.1.1. <i>Rugosidad</i>	32
2.1.1.1.1. La rugosidad en los implantes dentales	32
2.1.1.1.1.1. Caracterización de la rugosidad.....	34
2.1.1.1.1.1.1. Interferometría.....	35
2.1.1.2. <i>Mojabilidad</i>	37
2.1.1.2.1. Análisis de las gotas axisimétricas	38
2.1.1.2.2. Medición del ángulo de contacto en superficies heterogéneas.	39
2.1.1.2.2.1. Histéresis.....	40
2.1.1.2.2.1.1. Angulo de contacto de equilibrio	41
2.1.1.3. <i>Energía Superficial.</i>	42
2.1.1.3.1. Método de análisis de Ownes, Wendt, Rabel Kaelble (OWRK), para el cálculo de la energía superficial.....	42
2.1.1.4. <i>Caracterización biológica (fibroblastos)</i>	44
2.2. OBJETIVOS.....	47
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS	48
2.3.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	48
2.3.2. MEDICIÓN DE LA RUGOSIDAD.....	48
2.3.2.1.1. Cálculo del área real.....	49
2.3.3. ENSAYOS DE MOJABILIDAD (PERFIL).....	50
2.3.3.1. <i>Ensayos de mojabilidad desde cenital e histéresis.</i>	50
2.3.3.1.1. Histéresis	51
2.3.3.1.2. Avance y retroceso de la gota	51
2.3.3.1.3. Retroceso de la burbuja cautiva	52
2.3.4. ENERGÍA SUPERFICIAL	52
2.3.5. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA	53
2.3.5.1. <i>Adhesión inicial de fibroblastos</i>	53
2.4. RESULTADOS.....	55
2.4.1. RUGOSIDAD	55
2.4.1.1. <i>Medición de la rugosidad</i>	56
2.4.1.1.1. Área Real.....	58
2.4.2. ANGULO DE CONTACTO.....	59
2.4.2.1. <i>Mojabilidad (perfil)</i>	59
2.4.2.2. <i>Mojabilidad calculada desde una vista cenital (ADSA-D)</i>	59
2.4.2.3. <i>Histéresis</i>	61
2.4.2.3.1. Angulo de avance (gota)	62
2.4.2.3.2. Angulo de retroceso	65
2.4.3. ENERGÍA SUPERFICIAL.....	68

2.4.4.	CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA	69
2.5.	DISCUSIÓN.....	78
2.6.	CONCLUSIONES	86
2.7.	REFERENCIAS.....	87
CAPITULO 3.....		91
3.1. INTRODUCCIÓN		92
3.1.1.	PERI-IMPLANTITIS.....	92
3.1.2.	BACTERIAS IMPLICADAS EN EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL Y PERI- IMPLANTAR.....	92
3.1.2.1.	<i>Colonizadores primarios.....</i>	<i>94</i>
3.1.2.2.	<i>Maduración de la placa dento-bacteriana (papel de los colonizadores secundarios)</i>	<i>96</i>
3.1.3.	ENSAYOS DE ADHESIÓN	97
3.1.4.	DETECCIÓN Y MEDIDA DEL CRECIMIENTO BACTERIANO.....	98
3.1.4.1.	<i>Ciclo de crecimiento de poblaciones.....</i>	<i>98</i>
3.2. OBJETIVOS.....		101
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS		102
3.3.1.	SUPERFICIES DE TITANIO	102
3.3.2.	BACTERIAS	102
3.3.2.1.	<i>Caracterización del ciclo de crecimiento de poblaciones</i>	<i>102</i>
3.3.2.2.	<i>Propiedades de superficies de S. Sanguinis y L. Salivarius.....</i>	<i>102</i>
3.3.3.	ADHESIÓN DE BACTERIAS SOBRE SUPERFICIES DE TITANIO	104
3.3.3.1.1.	Microscopía óptica de epifluorescencia.....	104
3.3.4.	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	104
3.3.4.1.1.	Cuantificación de bacterias sobre las superficies de titanio.....	105
3.3.4.2.	<i>Comparación entre el comportamiento de adhesión sobre titanio y la alúmina 106</i>	
3.4. RESULTADOS.....		107
3.4.1.	BACTERIAS	107
3.4.1.1.	<i>Ciclo de crecimiento de poblaciones.....</i>	<i>107</i>
3.4.1.2.	<i>Propiedades de superficie de las bacterias</i>	<i>107</i>
3.4.2.	ADHESIÓN BACTERIANA	108
3.4.2.1.	<i>Imágenes de microscopía óptica de epifluorescencia (MOE).....</i>	<i>108</i>
3.4.2.2.	<i>Imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB)</i>	<i>109</i>
3.4.2.3.	<i>Cuantificación de bacterias por unidad de área.....</i>	<i>109</i>
3.4.2.4.	<i>Comparación entre el titanio y la alúmina.</i>	<i>113</i>
3.5. DISCUSIÓN.....		119
3.6. CONCLUSIONES		124
3.7. REFERENCIAS.....		125
CAPITULO 4.....		129
4.1. INTRODUCCIÓN		130
4.1.1.	APROXIMACIONES A LAS CONDICIONES DE LA CAVIDAD ORAL HUMANA.	130
4.1.2.	PLACA DENTO-BACTERIANA.....	130
4.1.2.1.	<i>Formación de la película adquirida</i>	<i>133</i>
4.1.2.2.	<i>Ensayos in vitro de la placa dento-bacteriana.</i>	<i>134</i>
4.1.2.3.	<i>Saliva artificial.</i>	<i>135</i>
4.2. OBJETIVOS.....		138
4.3. MATERIALES Y METODOS		139

4.3.1.	SUPERFICIES DE TITANIO Y BACTERIAS PARA ENSAYOS DE ADHESIÓN	139
4.3.2.	SALIVA ARTIFICIAL	139
4.3.3.	CICLO DE CRECIMIENTO DE POBLACIONES.....	139
4.3.4.	ADHESIÓN DE BACTERIAS EN MSAM SOBRE SUPERFICIES DE TITANIO.....	140
4.3.5.	OBSERVACIÓN DE LAS BACTERIAS POR MEB	140
4.3.6.	CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS SOBRE LAS SUPERFICIES DE TITANIO.....	140
4.4.	RESULTADOS.....	142
4.4.1.	CRECIMIENTO DE POBLACIONES EN SALIVA ARTIFICIAL.....	142
4.4.2.	CRECIMIENTO DE POBLACIONES EN MEDIO SALIVA ARTIFICIAL MODIFICADA (MSAM). ...	142
4.4.3.	OBSERVACIÓN DE LAS BACTERIAS POR MEB.	143
4.4.4.	CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS VIABLES SOBRE LAS SUPERFICIES DE TITANIO.....	144
4.5.	DISCUSION.....	149
4.6.	CONCLUSIONES	153
4.7.	REFERENCIAS.....	154
CAPITULO 5.....		157
5.1.	INTRODUCCIÓN	158
5.1.1.	SUPERFICIES DE BIOMATERIALES METÁLICOS.....	158
5.1.2.	DESPRENDIMIENTO DE IONES DE LA CAPA DE ÓXIDO.....	161
5.1.3.	RESISTENCIA A LA CORROSIÓN DEL TITANIO COMERCIALMENTE PURO.....	162
5.1.4.	AFECCIÓN DE LOS TEJIDOS CIRCUNDANTES POR LA LIBERACIÓN DE IONES.....	163
5.2.	OBJETIVOS.....	166
5.3.	MATERIALES Y METODOS	167
5.3.1.	OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE TITANIO (PARA OBSERVAR EL DAÑO SUPERFICIAL POR MEB)	167
5.3.2.	ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA LIBERACIÓN DE TITANIO	167
5.3.2.1.	<i>Digestión de las muestras.</i>	168
5.3.2.1.1.	Digestión de los medios separando el precipitado y el sobrenadante... ..	168
5.3.3.	PREPARACIÓN DEL PELLET DE BACTERIAS PARA MEB	169
5.3.4.	PREPARACIÓN DEL PELLET DE BACTERIAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET).	169
5.4.	RESULTADOS.....	171
5.4.1.	OBSERVACIÓN DE LOS DISCOS DE TITANIO POR MEB.	171
5.4.2.	VARIACIONES EN EL PH EN LOS MEDIOS DE CULTIVO	171
5.4.3.	ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA LIBERACIÓN DE TITANIO.	172
5.4.4.	ANÁLISIS CUANTITATIVO DE TITANIO EN MUESTRAS DIGERIDAS.	172
5.4.5.	OBSERVACIÓN DEL PELLET POR MEB.....	174
5.4.6.	OBSERVACIÓN DEL PELLET POR MET.....	174
5.4.7.	OBSERVACIÓN DE LAS SUPERFICIES DE TITANIO POSTERIOR A LA INCUBACIÓN CON BACTERIAS.....	177
5.5.	DISCUSION.....	180
5.6.	CONCLUSIONES	186
5.7.	REFERENCIAS.....	187
FIGURAS Y TABLAS		189
GLOSARIO		195

Capítulo

1.

Peri-implantitis (Una visión general)

*“Tened paciencia y tendréis ciencia”
Baltasar Gracián (1601-1658)*

1.1. ESTADO DEL ARTE

1.1.1. Implantes dentales

A partir de que los implantes dentales fueron introducidos por Branemark en 1977 [MIA08], estos se convirtieron en uno de los tratamientos recomendados para el reemplazo de una o varias piezas dentales perdidas (ya fuese por: enfermedad periodontal, caries, traumatismo, etc.), siendo ampliamente utilizados hasta el día de hoy, con un alto porcentaje de éxito [TYN00]. En una revisión sistemática Creugers y col. demostraron que de una selección de implantes dentales unitarios (n=459) el 97% de éstos, presentaron una supervivencia mayor a 4 años. Sin embargo, este estudio también reporta que un 20% de estos implantes presentaron algún tipo de complicación post-quirúrgica. [CKS00]

Los implantes dentales ofrecen muchas ventajas pudiendo relacionar las siguientes:

- Estética
- Correcta fonación
- Buena oclusión
- Mayor estabilidad protésica
- Mejora en la masticación
- Mejor distribución de las cargas oclusales
- Mantener la integridad de la boca ya que no afecta a los dientes contiguos (que en el mayor de los casos son dientes completamente sanos) al emplearlos como pilares para la colocación de prótesis fijas ó removibles.

Estos implantes dentales son fabricados de titanio comercialmente puro (Ti-cp) y/o algunas aleaciones de éste como el Ti-6Al-4V. El uso del titanio se debe principalmente a sus propiedades mecánicas y a su excelente biocompatibilidad. [CHS06]

El titanio es un material altamente reactivo, el cual rápidamente absorbe oxígeno y/o agua del medio en el que se encuentra, provocando la rápida formación de una capa de óxido (TiO₂) con un grosor de entre 5 y 100 Å [RLR91] [EBD95] la cual protege al metal (o a la aleación, según sea el caso) contra la corrosión, y es precisamente esta capa la que le proporciona la propiedad de biocompatibilidad. [JON01] [HAA98]

1.1.1.1. Características superficiales de los implantes dentales.

Un implante dental está formado principalmente de un cuerpo de fijación y un aditamento transmucoso (Figura 1.1). Cada porción de éste se encuentra en contacto con el hueso (mandibular o maxilar) (Figura 1.2) y con los tejidos periféricos de soporte como son: una lamina basal de tejido conectivo y una capa de epitelio queratinizado (Figura 1.3). [HAM97]



Figura 1.1. Implante dental de Titanio (A) y una esquematización de la interacción de las partes que lo componen con los tejidos circundantes (B).

Las características superficiales del Ti-cp empleado en la elaboración de implantes dentales es de suma importancia debido a las diferentes respuestas celulares. Es sabido que las células encargadas de la integración del implante en el medio biológico (osteoblastos, fibroblastos, y queratinocitos) responden a las características de superficie como:

- Rugosidad
- Mojabilidad
- Energía superficial.

Le Guéhennec y col., mencionan que la microtopografía de los implantes dentales está definida por la rugosidad, la cual presenta valores entre 1 y 10 μm ya que este rango de rugosidad maximiza la interdigitación entre el hueso mineralizado y la superficie del implante [GSL07]. En estudios preliminares se ha observado que una

rugosidad entre 3 y 5 micrómetros presenta una mejor respuesta en cultivos con osteoblastos (células formadoras de hueso). [APA04] [JMB04] [PRJ03] [AGP00]

Por otro lado, la mojabilidad es una propiedad directamente relacionada con la adhesión y forma de las células sobre las superficies implantadas. La adhesión de la célula a la superficie del material esta dada por la interacción con proteínas de la matriz extracelular que han sido adsorbidas en la superficie del implante, a través de las integrinas. Una superficie hidrofóbica, favorecerá dicha adsorción, lo que permitirá una mejor respuesta celular [GRA96]. A su vez, la mojabilidad esta estrechamente relacionada con la energía de superficial. Ponsonett y col., mencionan que la energía superficial del sólido es un factor determinante en la adhesión inicial de las células, incluso si las superficies han sido precubiertas por una capa de proteínas (como la fibronectina o el colágeno) [PRJ03].

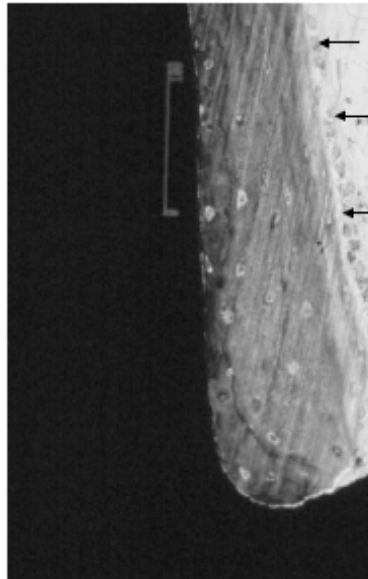


Figura 1.2. Implante dental y su estrecha relación con el hueso circundante, las flechas indican el límite entre el hueso ya formado y tejido osteoide [TAE03].

En el mercado existen muchos de tipos de implantes dentales, los cuales presentan una gran variedad de formas y diseños, pero a nivel del cuello del implante estas variaciones no van mas allá de una continuidad en la rugosidad (Fig. 1.4) ó una superficie sin rugosidad.

Una superficie rugosa (entre 2 y 5 micrometros) ofrece una superficie que favorece la osteointegración [AGP00]. Pero esta rugosidad a nivel del cuello del implante (la cual estará expuesta directamente a la cavidad oral) puede proveer un sustrato para la adhesión de bacterias y de este modo facilitar la formación de placa dentobacteriana sobre la superficie. Por lo que tradicionalmente las superficies dentro de la cavidad oral presentan una superficie lisa.

A nivel del cuello, los fibroblastos desempeñan un papel muy importante, ya que proveen el soporte del tejido epitelial y en conjunto la formación del sellado biológico.

1.1.2. Sellado biológico

A la estrecha interrelación del tejido epitelial queratinizado con el implante se le conoce como “sellado biológico”. El término de sellado se le da debido a la barrera que forma impidiendo la entrada de bacterias, iones, restos de proteínas, detritos alimenticios etc., al medio interno (en este caso el hueso de soporte) (Fig. 1.3).

A nivel ultraestructural el sellado biológico está formado por células gingivales del epitelio oral, las cuales forman hemidesmosomas sobre la superficie del implante [LCF98]. Los hemidesmosomas son uniones intercelulares epiteliales que se han encontrado en la superficie de los dientes aislando al ligamento periodontal de la cavidad bucal y alrededor de los implantes dentales conformando al sellado biológico. (Fig.1.5) [AYY05] Lagneau mostró que los filamentos intermedios de citoqueratina, están directamente unidos a los hemidesmosomas. Esto influye en las propiedades adhesivas de las células a los materiales implantables y el conocimiento previo, acerca de la interacción con la superficie puede mejorar el mantenimiento del sellado perimucoso del implante. [LCF98]

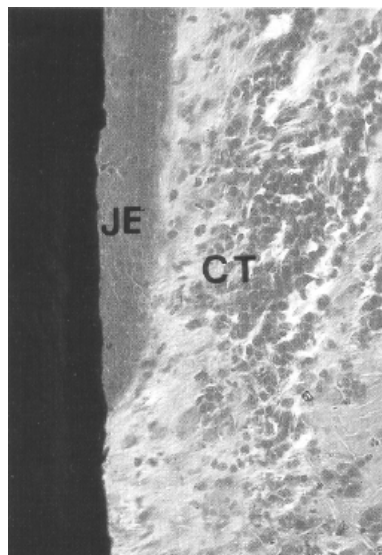


Figura 1.3. Epitelio de unión (JE) lo que corresponde al sellado biológico (formado por queratinocitos) y su tejido conectivo adyacente (CT), donde las células precursoras son los fibroblastos. La zona oscura de la izquierda corresponde al cuerpo del implante. [LLS91]

En los hemidesmosomas, la integrina $\alpha 6\beta 4$ y el BP-180 (proteínas de membrana que están involucradas en la adhesión celular y en la transmisión de señales transmembranales, las cuales pueden, entre otras cosas, estimular la división celular [YUK01]), son mediadores de la interacción de las células con la membrana basal. En la adhesión celular la interacción de la integrina $\alpha 3\beta 1$ y la laminina 5 juegan un papel primordial ya que estos en conjunto formaran los hemidesmosomas en el proceso de cicatrización en las células epiteliales. Los hemidesmosomas están clasificados en tipo I y tipo II, dependiendo de su composición, el tipo II es considerado como una forma primitiva de hemidesmosoma, encontrado principalmente en el canal epitelial y el tipo I representa a una de las mayores estructuras adhesivas, siendo un claro ejemplo el formado en el sellado biológico. [ESJ98]

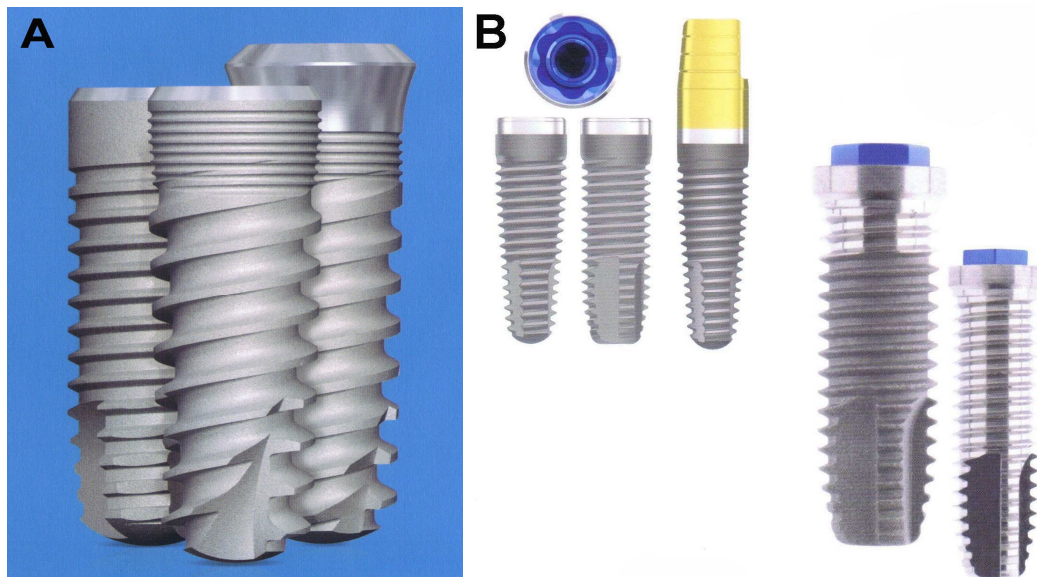


Figura 1.4. Tipos de implantes donde se puede apreciar diversas superficies, especialmente a nivel del cuello. Como ejemplo tenemos dos empresas dedicadas a la fabricación de implantes dentales.

Al mismo tiempo el epitelio queratinizado y la lamina basal (la cual esta compuesta por colágeno tipo I, glicoproteínas y proteoglicanos) se encuentra en contacto directo con la superficie del implante a nivel del cuello. Esta lámina basal es una fina capa de matriz extracelular que sirve de soporte y nutrición al epitelio de la encía y al mismo tiempo lo separa del hueso alveolar. [HAM97]

La formación del sellado biológico tiene un comportamiento muy semejante al proceso de cicatrización en la piel, en la cual hay un incremento en la expresión de fibronectina y un cambio en el comportamiento de los queratinocitos. [DGF96] En el proceso de la formación del sellado biológico la matriz extracelular desempeña un papel primordial. Como sabemos, la matriz extracelular (material de soporte de las

células formada por proteínas como la fibronectina, colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos, entre otras) no sólo influye sobre la interacción célula-superficie del implante, ya que además de ser el medio de adhesión entre estos, proporciona el soporte y nutrición al epitelio de unión.

Entre las moléculas que forman la matriz extracelular encontramos proteínas adhesivas como vitronectina, fibronectina y colágeno. La interacción de éstas con receptores transmembrana como las integrinas es de suma importancia para la proliferación celular, la migración y la diferenciación. La fibronectina concretamente, determina prioritariamente la adhesión y la dispersión de las células sobre los materiales implantados, además de promover su migración. [INH05] [BJM96] [JMB04]

1.1.2.1. Problemas con el sellado biológico

Aunque los implantes dentales tanto para zonas edentulas amplias, como para restauraciones individuales han tenido mucho éxito en los últimos años, existe un porcentaje de fallos. Jemt y colaboradores, realizaron un seguimiento de 150 pacientes con implantes dentales con una variedad muy amplia de casos, de los cuales un 7,9 % presentaba un soporte óseo suficiente antes de la cirugía, algunos otros (un 28,8 % del total de casos) presentaban un alto grado de reabsorción del hueso mandibular. Al cabo de 5 años de seguimiento, Jemt observó que había un fallo acumulativo de implantes del 3% y 18,9% respectivamente [JEM95]. Aunque el mayor número de fallos se presentó en los pacientes con un soporte óseo deficiente, los de mejor pronóstico previo a la cirugía, también presentaron algún tipo de problema.

Estos problemas, han sido clasificados por varios autores en dos tipos: los fallos tempranos (llamados también primarios) y los fallos tardíos o secundarios. Los primarios (>10% de fracasos) pueden deberse a errores de la cirugía, insuficiente cuidado postoperatorio y/o de mantenimiento, inestabilidad del implante ó colocación prematura de la porción estética [PSP99] aunque también se han asociado a contaminación y/o infección del implante ó del tejido adyacente a la zona quirúrgica [NOR08]. Los secundarios por otro lado pueden deberse a múltiples factores como: una sobre oclusión (contacto prematuro en lado de oclusión o balance), una deficiente adhesión de las células epiteliales gingivales, conocida como pérdida del sellado biológico ocasionando la pérdida del hueso de soporte. Y por otro lado también están los fallos tardíos debidos a infecciones que se presentan después de 1 año de la colocación del aditamento transmucoso [NOR08]. La pérdida de continuidad en la

unión del tejido gingival con la superficie del implante (pérdida del sellado biológico) empieza con una migración apical del epitelio de unión, lo que permite el desarrollo de bolsas peri-implantares adyacentes (Figura 1.6) lo que se conoce generalmente como peri-implantitis.

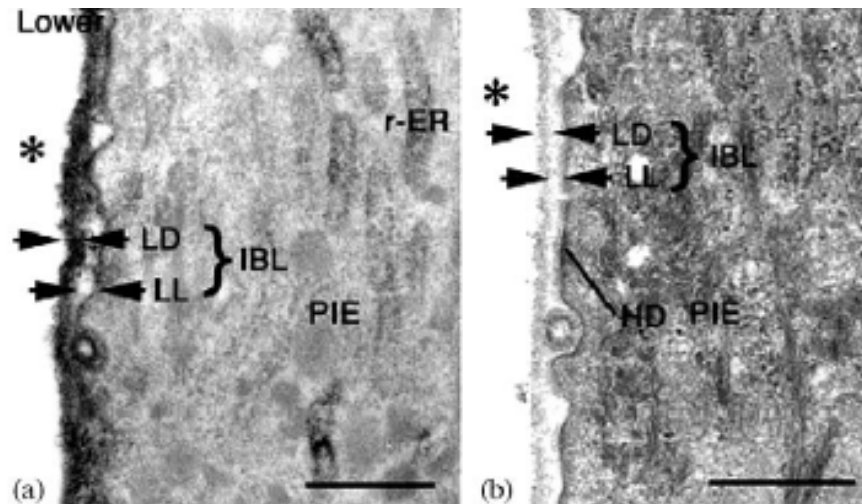


Figura 1.5. Porción apical del epitelio peri-implantar con anticuerpos (a) o sin anticuerpos (b) observado mediante Microscopía Electrónica de Transmisión. En donde claramente pueden identificarse los hemidesmosomas (HD) en la capa íntima de el epitelio peri-implantar (PIE). [Ayy0]

1.1.3. Peri-implantitis y periodontitis

La peri-implantitis es generalmente descrita como una condición inflamatoria de los tejidos alrededor de un implante dental, la cual inicia con una inflamación localizada, seguida de la destrucción de los tejidos blandos y la posterior pérdida del hueso peri-implantar. [BSM05] [FRB05]. Esta enfermedad (Fig.1.7) presenta varias similitudes con la periodontitis. Entre estas similitudes se pueden enunciar: una infección localizada, movilidad de la pieza y en el diagnóstico radiológico una zona radiolúcida que indica pérdida ósea además de la presencia de bacterias [MEF96]. La periodontitis esta definida como la afectación de los tejidos parodontales, provocando, como última consecuencia, la pérdida del órgano dentario.

En el caso de una inflamación e infección crónica de los tejidos periodontales (periodontitis), el problema se debe a la acción de leucotoxinas, colagenasas, fibrinolisinias y otras proteasas bacterianas, las cuales destruyen el sellado perimucoso, provocando la extensión de las bolsas periodontales hacia las estructuras óseas. Al mismo tiempo, las células inflamatorias en presencia de exudados bacterianos, desestabilizan el hueso provocando su rápida reabsorción, causando el fallo del tratamiento. [PMJ05]

Asociada a esta enfermedad (periodontitis) se han aislado 161 especies bacterianas (Tabla 1.1) [WML05], siendo *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (formalmente conocido como *Actinobacillus*), los principales agentes patógenos implicados de manera directa a esta enfermedad. [BBF05] [KLY05] [MST05] [TAT99] [WST96] [WTR96]

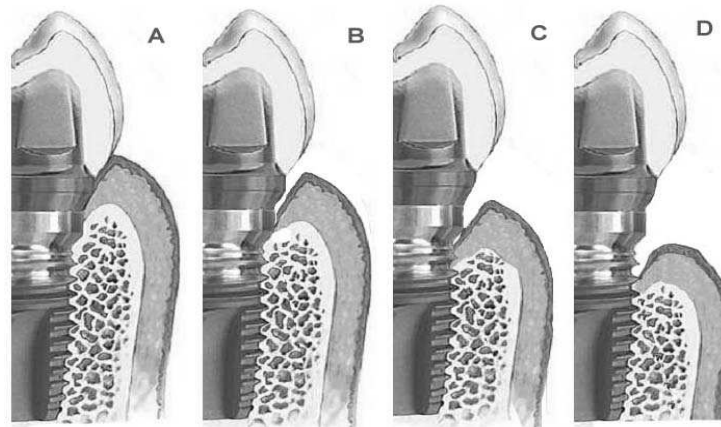


Figura 1.6 Representación esquemática de la evolución de la peri-implantitis. Primero se observa la correcta interrelación del implante con el tejido circundante (A). La formación inicial de una bolsa periodontal (B) con la subsecuente migración del tejido alrededor del implante (C) y la pérdida de tejido óseo de soporte (D), puede culminar en el fallo del tratamiento.

1.1.4. Bacterias y el sellado biológico

De igual forma que el diente provee una superficie para la colonización microbiana, la superficie del aditamento transmucoso de los implantes dentales se ve afectado por la misma causa y este factor puede verse incrementado por la rugosidad [MEF96]. Este problema puede contraponer su uso, ya que por un lado, una superficie rugosa favorece la adhesión de las células implicadas en la osteointegración (Osteoblastos) y las células formadoras del sellado biológico (Fibroblastos y Queratinocitos); y por otro lado, puede favorecer la formación y acumulación de la placa dento-bacteriana. Por esta última causa, siempre se ha aconsejado la colocación de prótesis y/o restauraciones con superficies visiblemente lisas en la práctica odontológica diaria, disminuyendo así dicho problema.

La adhesión inicial bacteriana y la posterior colonización juegan un papel muy importante en la patogénesis de la enfermedad peri-implantar. La colonización microbiana sobre la superficie del implante esta siempre precedida de la adsorción de una película adquirida, donde los componentes principales provienen de la saliva y el exudado gingival. La adhesión inicial es el resultado de interacciones específicas

(adhesión a proteínas de la matriz extracelular como la fibronectina y el colágeno) e inespecíficas (fuerzas fisicoquímicas), además de las características de superficie del implante (la energía libre superficial, hidrofiliicidad, química de superficie, carga de la superficie, rugosidad) (Fig.1.8). Esta adhesión inicial está precedida por la continua incorporación de más bacterias a la primera capa de bacterias, y al mismo tiempo hay una subsecuente y continua proliferación hasta formar una monocapa, con la excreción simultánea de material extracelular formando un biofilm sobre la superficie del material. [KAM04] [MPM04]

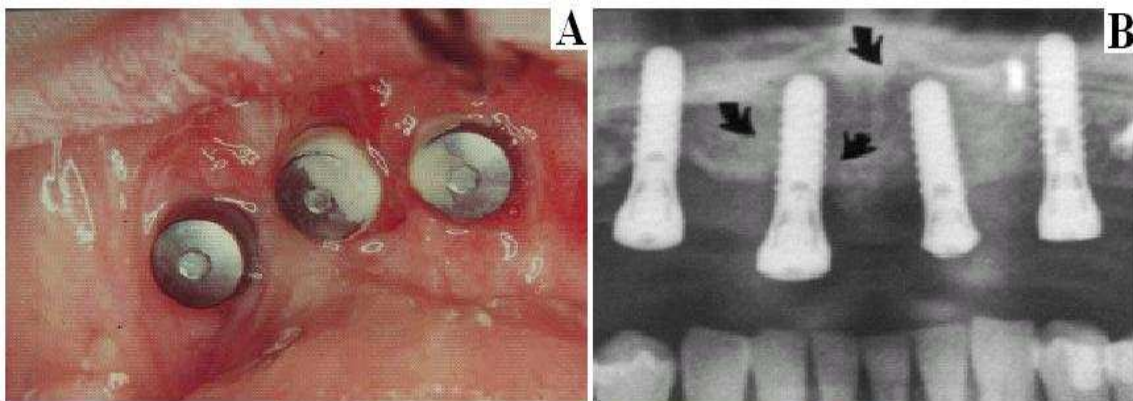


Figura 1.7 En la imagen A se observa la pérdida del soporte dental por enfermedad periodontal y en B se observa la imagen radiográfica, donde se aprecia la pérdida ósea causada por periodontitis [LSK05]

Tabla 1.1. Bacterias asociadas a enfermedades periodontales, endodónticas y caries según Wade W.G.y colaboradores. [WML05]

<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Neisseria subflava</i>
<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>
<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Veillonella dispar</i>
<i>Veillonella parvula</i>	<i>Olsenella uli</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i>
<i>Selenomonas sputigena</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	Bacteroidales E2a
Bacteroidales E2b	Bacteroidales E3	<i>Campylobacter gracilis</i>
<i>Dialister E1</i>	<i>Dialister pneumosintes</i>	Eubacteriaceae E2
<i>Eubacterium brachy</i>	<i>Eubacterium nodatum</i>	<i>Eubacterium saphenum</i>
<i>Eubacterium sulci</i>	<i>Filifactor alocis</i>	Firmicutes E1
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Lachnospiraceae E1	<i>Megasphaera P1</i>
<i>Mogibacterium sp.</i>	<i>Peptococcus E1</i>	<i>Peptostreptococcus CK 035</i>
<i>Prevotella buccae</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>	Abiotrophia P1
<i>Actinobaculum EL030</i>	<i>Actinomyces meyeri</i>	<i>Actinomyces B27SC</i>
<i>Anaeroglobus geminatus</i>	<i>Actinomyces P1</i>	Bacteroidales P2
<i>Bacteroides gracilis</i>	Bacteroidales P1	<i>Butyrivibrio DA074</i>
<i>Campylobacter concisus</i>	<i>Bacteroides AU126</i>	<i>Campylobacter rectus/showae</i>
<i>Capnocytophaga BB167</i>	<i>Campylobacter gingivalis</i>	<i>Capnocytophaga ochracea</i>
<i>Capnocytophaga P1</i>	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	<i>Capnocytophaga AA032</i>
<i>Capnocytophaga BB167</i>	<i>Capnocytophaga DS022</i>	<i>Capnocytophaga X089</i>
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	<i>Capnocytophaga BM058</i>	<i>Chloroflexi P1</i>
Clostridiales P1	<i>Cardiobacterium hominis</i>	Clostridiales P4
<i>Corynebacterium P1</i>	Clostridiales P3	<i>Desulfomicrobium orale</i>
<i>Desulfovibrio P1</i>	<i>Desulfobulbus R004/CH031</i>	Eubacteriaceae P3
<i>Eubacterium BB142</i>	Eubacteriaceae P2	<i>Eubacterium DO016</i>
<i>Eubacterium PUS9.170</i>	<i>Eubacterium DA014</i>	Firmicutes AO068
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	<i>Eubacterium saburreum</i>	<i>Gemella 933-88</i>
<i>Granulicatella adiacens</i>	<i>Gemella P1</i>	<i>Kingella DE012</i>
Lachnospiraceae P1	<i>Haemophilus P1</i>	<i>Leptotrichia P1</i>

Leptotrichia P2	Lachnospiraceae P3	Neisseria P3
Paenibacillus sp.	Neisseria P2	Peptostreptococcus P4
Porphyromonas endodontalis	Peptostreptococcus P3	Porphyromonas P1
Porphyromonas P2	Porphyromonas gingivalis	Prevotella oralis
Prevotella P2	Prevotella dentalis	Prevotella P5
Prevotella AA020	Prevotella P4	Prevotella BU035
Prevotella DA058	Prevotella BE073	Prevotella B31FD
Propionibacterium BN085	Prevotella FM005	Selenomonas periodontii
Selenomonas diana	Schwarzia P2	Selenomonas infelix
Selenomonas DS071	Selenomonas flueggei	Selenomonas DD020
Selenomonas DY027 16S	Selenomonas AJ036	Selenomonas EW051
Selenomonas EW079	Selenomonas EQ054	Selenomonas EY047
Selenomonas P1	Selenomonas EW084	Selenomonas P4
Selenomonas CS015	Selenomonas P2	Streptococcus P3
Streptococcus P4	Selenomonas GAA14	Streptococcus AY020
Streptococcus BE024	Streptococcus sinensis	Streptococcus CH016
Streptococcus DN025	Streptococcus BW009	Streptococcus FN051
Streptococcus 7A	Streptococcus FN042	Streptococcus T1-E5
Streptococcus P2	Synergistes BA121	Synergistes BH017
Synergistes D006	Synergistes W090	Syntrophomonas P1
TM7 I025	TM7 P1	Treponema BZ013
Treponema socranskii	Treponema 3:E:AT013	Treponema 9:A:D01
Treponema I:8:G57	Treponema I:G:T21	Treponema II:I:C53
Treponema P3	Treponema VI:G:G47	

Según Mabboux y colaboradores, la presencia de Gram-positivos alrededor de los implantes es significativamente mayor que las otras bacterias, siendo *S sanguinis* considerado como la bacteria mas importante de la formación del biofilm e igualmente esta cepa ha sido asociada con la peri-implantitis. [MPM04] [RGH03]

S. sanguinis se encuentra como habitante normal de la cavidad oral y se ha aislado de la mucosa oral, faringe, lengua y placa dentobacteriana. Esta bacteria pertenece al grupo de los estreptococos no capsulados, que producen hemólisis, son cocos Gram positivos con unas dimensiones de 1-1,5 μm de diámetro, anaerobios facultativos que no producen catalasa ni oxidasa, además fermentan la glucosa con formación de ácidos, son oportunistas y si entran en el torrente sanguíneo, pueden ocasionar endocarditis bacteriana [PRG00]. Como ya se menciona esta bacteria esta implicada en la formación de la película bacteriana inicial sobre las superficies recientemente implantadas en la cavidad oral por se un colonizador primario, además de facilitar la posterior incorporación de bacterias asociadas en la enfermedad como *P. gingivalis* [RGH03].

Por otro lado *L. salivarius* es un bacilo Gram positivo que convierte a la lactosa y otros monosacáridos en ácido láctico. Esta bacteria se encuentra como flora normal de la cavidad bucal como *L. casei* y *L. fermenti* (entre otros lactobacilos), la cual ha sido aislada tanto del dorso de la lengua, como la mucosa vestibular y el paladar duro en humanos donde la proporción de estas en la saliva es de entre 10 y 100 veces más

en comparación con las adheridas a la superficie de los dientes, e igual a la cantidad encontrada sobre las superficies epiteliales (mucosa vestibular, paladar). [HGP72]

Esta cepa junto con otros lactobacillus (*L. casei*, *L. fermenti*) pueden adherirse a cualquier superficie en boca, y pueden llegar e bajar el pH bucal. Esta acidificación en la saliva puede llegar a afectar tanto al implante como al tejido adyacente causando un daño a la superficie del implante.

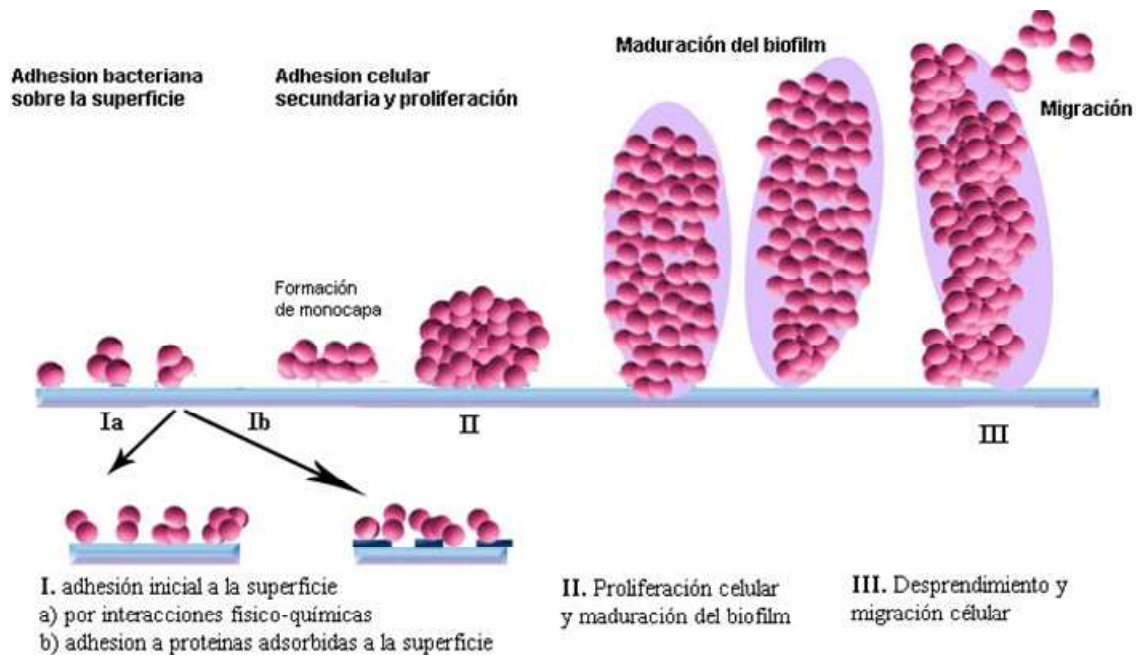


Figura 1.8 Modificación de la imagen de Katsikogianni and Missirlis, representando la adhesión inicial de bacterias sobre la superficie de los implantes dentales. Este proceso puede estar dado por dos vías; una con interacción directa sobre dicha superficie por mecanismos físico-químicos y otra por la presencia de una capa de proteínas adsorbidas sobre la superficie. [KAM04]

El fallo de los implantes no sólo han estado relacionados con la presencia de algún microorganismo bacteriano específico, (ya que la misma bacteria que está asociada con la enfermedad periodontal, se ha encontrado muy frecuentemente alrededor de implantes que han presentado algún tipo de problema). La genética, salud y algunos factores micro-ambientales entre otras cosas, pueden determinan la severidad de la reacción del huésped [WOO04] [SCL02]. Un buen ejemplo de esto son los hábitos no saludables como el fumar, el cual incrementa el número de fallos hasta en un 20%. [SRK07]

1.1.5. Partículas metálicas en tejidos suaves

Aunque el Ti-cp, es un material resistente a la corrosión, las condiciones a las cuales es sometido dentro del cuerpo humano hacen que su tiempo de vida útil como

implante sea más corto de lo que cabría esperar. Esto se aprecia claramente cuando vemos fallos en las prótesis de cadera por la gran cantidad de partículas desprendidas de las prótesis incluidas en el tejido circundante. Este problema es conocido como Metalosis.

En los implantes dentales tenemos un problema similar, ya que autores como Acero y col, y Langford y Frame, han reportado la presencia de partículas de titanio en los tejidos adyacentes a implantes dentales, placas y tornillos de fijación en cirugía máxilofacial y otros aditamentos de titanio [ACS99] [JME97] [KYL97] [LAF02].

Se observó un caso en el que clínicamente se presentó una zona oscurecida en la encía circundante a la unión de la parte estética del implante y el cuerpo metálico, la cual corresponde a la unión del cuello del implante con el tejido gingival (sellado biológico).

Esta zona oscurecida puede estar relacionada con la presencia de partículas metálicas incluidas en la encía alrededor del cuello del implante (Fig.1.9), lo cual puede desencadenar una reacción a cuerpo extraño provocando un aumento continuo e irreversible en la profundidad del surco gingival hasta la pérdida de inserción del epitelio de unión, ocasionando su apicalización (migración hacia el ápice radicular) y concluyendo en el fracaso del tratamiento.



Figura 1.9 Imagen de una infección crónica alrededor de un implante dental. Además puede observarse una fístula en el fondo de saco (indicado por una flecha).

Existe mucha controversia alrededor de este punto, ya que de acuerdo con Meningaud y col. no existe una evidencia clínica o experimental de una disolución

pasiva y progresiva del titanio en medios biológicos, además de que estas pequeñas cantidades son consideradas como fragmentos provenientes del tratamiento de fabricación y/o acabado superficial que pudieron ser desprendidos durante el proceso de implantación quirúrgica [MPB01]. Y al mismo tiempo, otros estudios han demostrado un aumento en el número de macrófagos (células encargadas de fagocitar partículas pequeñas) en las zonas circundantes al implante dental, con restos de partículas de titanio en su interior. [TQR06] [KRH07] [VGG06] [OFG03] [MSK00]

Los macrófagos que muestran partículas de titanio en su interior secretan una gran cantidad de citoquinas, como las interleucina-1 β (IL-1 β) interleucina- (IL-6) ó los factores de necrosis tumoral α (TNF- α) la cuales estimulan la reabsorción de hueso. Todas estas en conjunto mandan señales a las células para desencadenar un proceso inflamatorio como mecanismo de defensa del organismo. [VGG06]

1.1.6. Estrategias para mejorar el mantenimiento de los implantes dentales

Múltiples estudios han sido enfocados para mejorar la respuesta celular, con la finalidad de acelerar la formación del hueso circundante y limitar o impedir la entrada de bacterias. Como ejemplo tenemos el trabajo de Schuler y colaboradores, quienes han intentado mejorar la respuesta celular sobre los implantes de Titanio empleando la secuencia peptídica RGD (secuencia peptídica de Arginina, Glicina, Aspartato) que se encuentra en proteínas de la matriz extracelular y que se une a las integrinas para la señalización intracelular. Pero entre sus conclusiones destaca que esta secuencia mejora la respuesta de fibroblastos y osteoblastos, pero no así de las células epiteliales [SOH06], por lo que la aplicación práctica para el sellado biológico, no es del todo factible.

Clínicamente el mantenimiento del implante (la mayoría de las veces cuando el problema ya se ha presentado) se aborda con una amplia variedad de tratamientos, los cuales van desde una limpieza del implante (cuando la profundidad de bolsas peri-implantares es ≤ 3 mm) y la utilización de colutorios para disminuir la formación de placa dento-bacteriana, hasta la utilización de antimicrobianos y tratamientos quirúrgicos (cuando la profundidad de las bolsas peri-implantares es > 3 mm). Estos últimos (con remoción del tejido dañado) pueden ser de forma convencional [MOM00] o con el uso de láser [SCH05], acompañados con diversos tratamientos enfocados a la regeneración del hueso y tejido gingival perdido con la colocación de substitutos óseos

y membranas (conocido como regeneración ósea guiada y regeneración tisular guiada respectivamente) son algunas de las opciones utilizadas en la actualidad. (Figura 1.10)

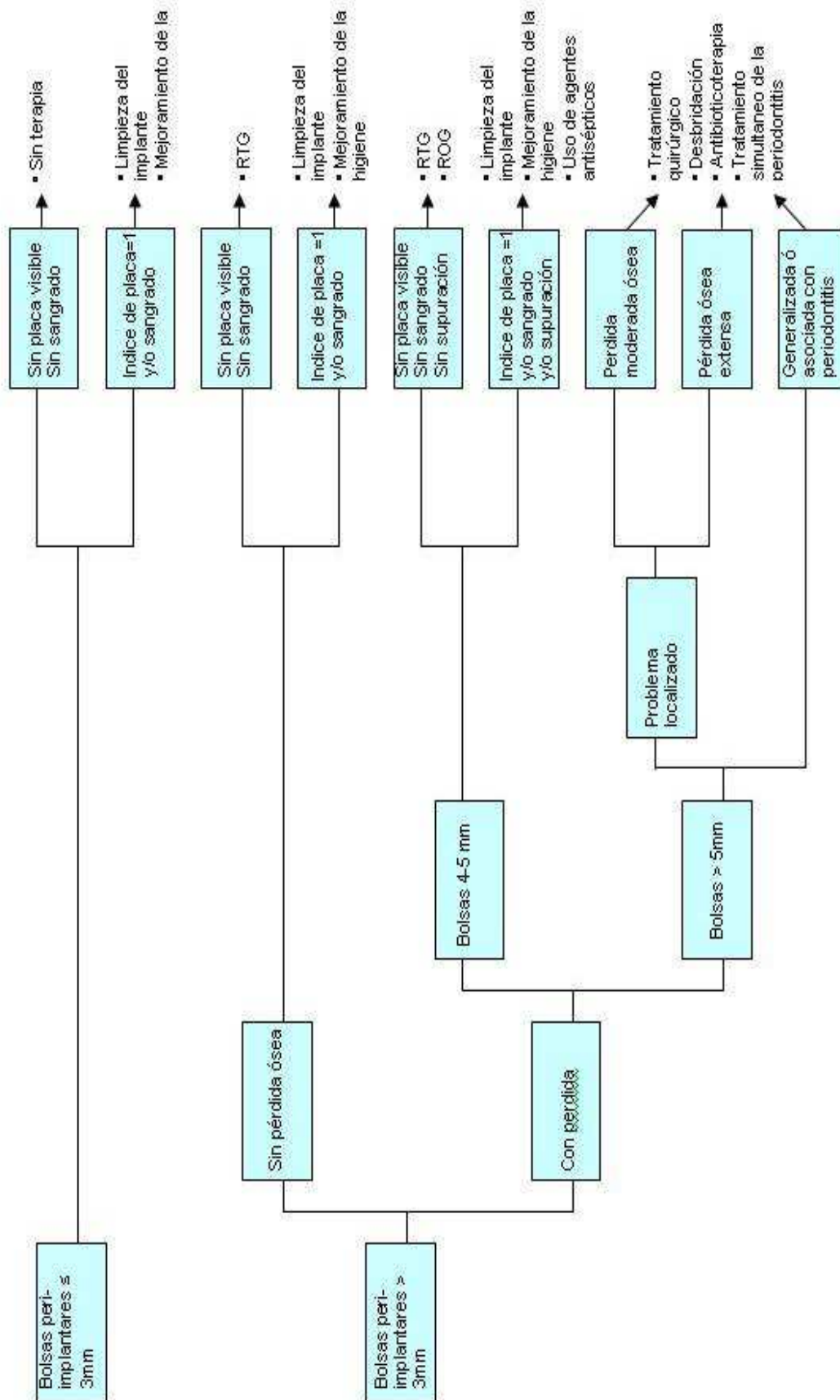


Figura 1.10. Posibles tratamientos utilizados para peri-implantitis, dependiendo la severidad del daño. [MOMO]

1.2. REFERENCIAS

- [ACS99] Acero J., Calderon J., Salmeron J.I., Verdaguer J.J., Concejo C., Somacarrera M.L., *The behaviour of titanium as a biomaterial microscopy study of plates and surrounding tissues in facial osteosynthesis*. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery 27 (1999) 117-123.
- [AGP00] Aparicio C., Gil F., J., Peraire C., Padròs A., Planell J.A. Abstract Booklet titanium 99 Vol. II I.V. Gorynin S.S. Ushkov ed ISBN 5-900791-06-8, Pp. 1207-1210. Saint Petersburg, Russia 2000.
- [APA04] Aparicio Badenas Conrado. *Tratamientos de superficies sobre Titanio Comercialmente puro para la mejora de la osteointegración de los implantes dentales*, Universidad Politécnica de Cataluña 2004, Tesis Doctoral, Barcelona España. Pp. 165.
- [AYY05] Atsuta Ikiru, Yamaza Takayoshi, Yoshinari Masao, Goto Tetsuya, A. Kido Mizuho, Kagiya Tadayoshi, Mino Satoya, Shimono Masaki, Tanaka Teruo. *Ultrastructural localization of laminin-5 ($\gamma 2$ chain) in the rat peri-implantar oral mucosa around a titanium-dental implant by immuno-electron microscopy*. Biomaterials, 26 (2005) 6280-6287.
- [BBF05] Bantel Heike, Beikler Thomas, Flemmig Thomas F., Schulze-Osthoff Klaus. *Caspase activation is involved in chronic periodontitis*. FEBS Letters 579 (2005) 5559-5564.
- [BJM96] Bordji K., Jouzeau J., Mainard D., Payan E., Netter P., Rie K., Stucky T., Hage-Ali M., *Cytocompatibility of Ti-6Al-4V and Ti-5Al-2.5Fe alloys according to three surface treatments, using human fibroblasts and osteoblasts*. Biomaterials 17 (1996) 929-940.
- [BSM05] Bornasi Elisa, Salgarello Stefano, Mensi Magda, Boninsegna Ramon, Stacchiotti Alexandra, Rezan Rita, Sapelli Pierluigi, Bianchi Rossella, Rodella Luigi F. *Histochemical and immunohistochemical evaluation of gingival collagen and metalloproteinases in peri-implantitis*. Acta histochemica, 107 (2005) 231-240.
- [CHS06] Chi-Min Lin and Shioh-Kang Yen. *Biomimetic growth of apatite on electrolytic TiO₂ coatings in simulated body fluid*. Materials Science and Engineering C 26 (2006) 54-64.
- [CKS00] Creugers N., Kreulen C., Snoek P., de Kanter R., *A systematic review of single-tooth restorations supported by implants*. Journal of Dentistry, 28 (2000) 209-217.
- [DGF96] Dawson R.A., Goberdhan N.J. Feedlander E. and MacNeil S. *Influence of extracellular matrix proteins on human keratinocyte attachment, proliferation and transfer to a dermal wound mode.*, Burns, 22 (1996) 93-100.
- [EBD95] E.A.B: Effah, P.D. Bianco, P. Ducheyne, *Crystal structure of the surface oxide layer on titanium and its changes arising from immersion*. J. Biomed. Material Research, 29 (1) (1995) 73-80.
- [FHB03] Fischer U. , Hempel U., Becker D. Bierbaum S., Scharnweber D., Worch H., Wenzel K-W. *Transforming growth factor $\beta 1$ immobilized adsorptively on Ti6Al4V and collagen type I coated Ti6Al4V maintains its biological activity*. Biomaterials 24(2003) 2631-2641.
- [FRB05] Frank Schwarz, Becker Jünger. *Treatment of periodontitis and peri-implantitis with an Er:YAG laser: Experimentatl and clinical studies*. Medical Laser Applications 20 (2005) 47-59.
- [GHW00] Geißler U., Hempel U., Wolf C., Scharnweber D., Worch H., Wenzel1 K.-W., *Collagen type I-coating of Ti6Al4V promotes adhesion of osteoblasts*. Journal of Biomedical Materials Research, 51 (2000):752–60.

- [GRA96] Thomas Groth and George Altankov, *Studies on cell-biomaterial interaction: role of tyrosine phosphorylation during fibroblast spreading on surfaces varying in wettability*. Biomaterials 17 (1996) 1227-1234.
- [HAM97] Ham Arthur W., *Histology*. 9th ed, Edit Lippincot, Philadelphia 1987
- [HAA98] Hanawa T., Asami K., Asaoka K., *Repassivation of titanium and surface oxide film regenerated in simulated bioliquid*. Journal of Biomedical Materials Research, 40 (1998) 530-538.
- [HGP72] van Houte J., Gibbons R. and Pulkkinen A., *Ecology of Human Oral Lactobacilli*. Infection and immunity, 6 (1972) 723-729.
- [INH05] Iwamatsu-Kobayashi Y., Nishihara D., Hirata M., Kindaichi K., Komatsu M., *Effects of biomaterials on cell adhesion of human periodontal ligament fibroblasts and fibronectin adsorption*. International Congress Series 1284 (2005) 334-335.
- [JEM95] Jemt T., Lekholm U., *Implant treatment in edentulous maxillae: a 5-year follow-up report on patients with different degrees of jaw resorption*. International Journal of Oral Maxillofacial Implants, 10 (1995) 303-311.
- [JMB04] Jayarama Mythili, Meyer Ulrich, Bühner Martín, Ulrich Joos, Hnas-Peter Wiesmann, *Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro*. Biomaterials 25 (2004) 625-631.
- [JME97] Jorgenson D.S., Mayer M.H., Ellenbogen R.G., Centeno J.A., Johnson F.B., Mullick F.G., Manson P.N., *Detection of titanium in human tissues after craniofacial surgery*. Plastic and Reconstructive Surgery 99 (1997) 976-979.
- [JON01] F.H. Jones, *Teeth and Bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials*. Surface Science Reports. 42 (2001) 75-205.
- [KAM04] Katsikogianni and Missirlis. *Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions*. European cells and Materials, 8 (2004) 37-57.
- [KLY05] Leung W. Keung, Jin Lijian, Yau Joyce Y.Y., Sun Qiang, Corbet Esmonde F. *Microflora cultivable from minocycline strips placed in persisting periodontal pockets*. Archives of Oral Biology (2005) 50, 39-48.
- [KRH07] Marie Kalbacova, Sophie Roessler, Ute Hempel, Roman Tsaryk, Kirsten Peters, Dieter Scharnweber, James C. Kirkpatrick, Peter Dieter, *The effect of electrochemically simulated titanium cathodic corrosion products on ROS production and metabolic activity of osteoblasts and monocytes/macrophages*. Biomaterials 28 (2007) 3263-3272.
- [KYL97] Kim Y.K., Yeo H.H., Lim S.C., *Tissue response to titanium plates: a transmitted electron microscopic study*. Journal of Oral Maxillofacial Surgery 55 (1997) 322-326.
- [LAF02] Langford R. and Frame J.W., *Tissue changes adjacent to titanium plates in patients*. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery, 30 (2002) 103-107.
- [LFE98] Lagsneau Christelle, Farges Jean-Christophe, Exbrayat Patrick, Lissac Michèle, *Cytokeratin expression in human oral gingival epithelial cells: in vitro regulation by titanium-based implant materials*. Biomaterials 19 (1998) 1109-1115.
- [LLS91] Listgarten M.A., Lang .N.P., Schroeder H.E. and Schroeder A. *Periodontal tissue and their counterparts around endosseous implants*, Clinical Oral Implants Research (1991) 2, 1-19.

[LSK05] Laine P., Salo A., Kontio R., Ylojoki S., Lindqvist C., Suuronen R., *Failed dental implants- clinical, radiological and bacteriological findings in 17 patients*. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery 33 (2005) 212-217.

[MEF96] Meffert .M., *Periodontitis vs Peri-implantitis: The same disease? The same treatment?* Critical Review in Oral Biology and Medicine, 7 (1996) 278-291.

[MIA08] Mian K. and Syngcuk K., *A review of factors influencing treatment planning decisions of single-tooth implants versus preserving natural teeth with nonsurgical endodontic therapy*. Journal of Endodontics 34 (2008) 519-529.

[MOM00] Mombelli A. and Lang N. *The diagnosis and treatment of peri-implantitis*. Periodontology, 17 (2000) 63-76.

[MPB01] Meningaud J.-P., Poupon J., Bertrand J.-Ch., Chenevier C., Galliot-Guilley M., Guilbert F. *Dynamic study about metal release from titanium miniplates in maxillofacial surgery*. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 30 (2001) 185-188.

[MPM04] Mabboux Florence, Ponsonnet Laurence, Morrier Jean-Jacques, Jaffrezic Nicole, Barsotti Odile. *Surface free energy and bacterial retention to saliva-coated dental implant materials-an in vitro study*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 39(2004) 199-205.

[MSK00] Mu Y., Kobayashi T., Sumita M., Yamamoto A., Hanawa T., *Metal ion release from titanium with active oxygen species generated by rat macrophages in vitro*. Journal of Biomedical Materials Research, 49 (2000) 238-243.

[MST05] Mayanagi G., Sato T, Shimauchi H., Takahashi N. *Microflora prolifing of subgingival and supragingival plaque of healthy and periodontitis subjects by nested PCR*. International Congress Series, 1284 (2005) 195-196.

[NOR08] Norowsky P., Bumgardner D., *Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: A review*, Journal of Biomedical Materials Research. Part B. Applied Biomaterials Published Online: 12 August, 2008.

[OFG03] Olmedo D., Fernández M.M., Guglielmonetti M.B., Cabrini R.L. *Macrófagos en relación con fracasos implantológicos*. Revista española odontoestomatológica de implantes, XI 3 (2003) 184-190.

[PMJ05] Pihlstrom B., Michalowicz B., Johnson W., *Periodontal diseases*. Lancet, 366 (2005) 1809-1820.

[PRG00] Pumarola A., Rodríguez-Torres A., García-Rodríguez J.A., Piedrola-Angulo G. *Microbiología y Parasitología Médica*, 2ª Edición, Edit Masson, Barcelona, 2000, Pp. 343-350.

[PRJ03] Ponsonnet L., Reybier K., Jaffrezic N., Comte V., Lagneau C., Lissac M., Martelet C., *Relationship surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behavior*. Materials Science and Engineering C23 (2003) 551-560.

[PSP99] Piatelli A., Scarano A., Piattelli M., Vaia E., Matarasso S., *A microscopical evaluation of 24 retrieved failed hollow implants*. Biomaterials 20 (1999) 485-489.

[RGH03] Alexander H. Rickard, Peter Gilbert, Nicola J.High, Paul E. Kolenbrander and Pauline S. Handley, *Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms*. Trends in Microbiology 11-2 (2003) 94-100

[RLR91] G° Radegran, J. Lausmaa, U. Rolander, L. Mattson, B. Kasemo, *Preparation on ultra-thin oxido windows on titanio for TEM analysis*. Journal Electron Microscopy Technique 19 (1991) 99-106.

- [SCH05] Schwartz F., Becker J., *Treatment for periodontitis and peri-implantitis with an Er:YAG laser: Experimental and clinical studies*. Medical Laser Applications 20 (2005) 47-59.
- [SCL02] Santos M., Campos M., Line S., *Early dental implant failure: a review of the literature*. Brazilian Journal Oral Science. 1 (2002) 103-111.
- [SOH06] Schuler Martin, Gethin Rh. Owen, Douglas W. Hamilton, Michael de Wild, Marcus Textor, Donald M Brunette, Samuele G.P. Tosatti., *Biomimetic modification of Titanium dental implant model surfaces using the RGDSP-peptide sequence: A cell morphology study*. Biomaterials 27 (2006) 4003-4015.
- [SRK07] Strietzel F., Reichart P., Kale A., Kulkarni M., Wegner B. And Kuchler I. *Smoking interferes with the prognosis of dental implant treatment: a systematic review and meta-analysis*. Journal of Clinical Periodontology, 34 (2007) 523-544.
- [TAE03] Young- Taeg Sul. *The significance of the surface properties of oxidized titanium to the bone response: special emphasis on potential biochemical bonding of oxidized titanium implant*. Biomaterials 24 (2003) 3893-3907.
- [TAT99] Tanner C.R. and Taubman A. *Microbiota of initial Periodontitis in Adults*, Anaerobe, (1999) 5, 229-235.
- [TQR06] Kai Soo Tan, Li Qian, Roy Rosado, Patrick M. Flood, Lyndon F. Cooper, *The role of Titanium surface topography on J774A.1 macrophage inflammatory cytokines and nitric oxide production*. Biomaterials 27 (2006) 5170-5177.
- [TYN00] Tyndall D.A., Brooks S.L., *Selection criteria for dental implant site imaging: A position paper of the American Academy of Oral and Maxillofacial Radiology*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Oral Endodontology, 89 (2000) 630-637.
- [VGG06] Gema Vallés, Pablo González-Melendi, Jose L. González-Carrasco, Laura Saldaña, Elena Sánchez-Sabaté, Luis Munuera, Nuria Vilaboa. *Differential inflammatory macrophages response to rutilite and titanium particles*. Biomaterials 27 (2006) 5199-5211.
- [VOE92] Voet Donald (et al) *Bioquímica*. Editorial Omega, Barcelona España, 1992, Pp.
- [WML05] Wade W.G., Munson M.A. Lillo A de, Weightman A.J. *Specificity of the oral microflora in dental caries, endodontic infections and periodontitis*. International Congress Series 1284 (2005) 159-157.
- [WST96] Winston Leslie J. Stephan I Toth, Roe Bruce A. Dyer David W. *Cloning and characterization of the Actinobacillus actinomycetemcomitans gene encoding a heat-shock protein 90 homologue*. Gene 179 (1996) 199-204.
- [YUK01] Shino Yashiki, Umegaki Ryota Kino-Oka Masahiro and Taya Masahito, *Evaluation of attachment and growth of anchorage-dependent cells on culture surfaces with type I collagen coating*. Journal of Bioscience and Bioengineering 92, 4 (2001) 385-388.
- [WOO04] Wood Melanie R. and Vermilyea Stanley G., *A review of selected dental literature on evidence-based treatment planning for dental implants: Report of the Committee on research in fixed prosthodontics of the academy of fixed prosthodontics*. Journal of Prosthetic Dentistry 92 (2004)447-462.

Capítulo

2.

Caracterización de las superficies de titanio comercialmente puro utilizado para implantes dentales.

*“Llegar juntos fue el principio; mantenerse juntos es el progreso y trabajar juntos será el éxito”
Henry Ford (1863-1947)*

2.1. INTRODUCCIÓN

2.1.1. Propiedades de superficie de los biomateriales

El comportamiento de las células (neuronas, osteoblastos, fibroblastos, keratinocitos, bacterias, etc.) sobre las superficies de los implantes (adhesión, los cambios morfológicos, proliferación, diferenciación e incluso alteraciones funcionales) depende de las interacciones implante-célula, las cuales están directamente relacionadas con las propiedades físico-químicas de dicha superficie (rugosidad, topografía, mojabilidad, energía superficial, composición química, cristalinidad, etc) [LOS01] [FWY03]. Todo esto, influirá en la integración del tejido al implante o viceversa y los procesos de cicatrización [PRJ03] [LBB98] [AGP00] [JMB04] [ANS05].

2.1.1.1. Rugosidad

Todas las superficies tienen irregularidades o asperezas de diferentes dimensiones (amplitud y longitud) que se superponen a la forma de la pieza, las cuales definen su topografía. La rugosidad (o irregularidades superficiales) es el resultado acumulativo de uno ó varios (incluso todos) factores tales como: la estructura cristalina, el proceso de fabricación e ingeniería de superficies; la cual se puede describir y/o cuantificar por diversos métodos topográficos ya sea en 2D o 3D. [APA04]

2.1.1.1.1. La rugosidad en los implantes dentales

La topografía de superficie, en especial la rugosidad, juegan un papel muy importante en el conocimiento acerca de la respuesta hueso-implante. Éste conocimiento esta basado en el uso (con buenos resultados) de más de 20 años, de un gran número de sistemas de implantes dentales con diferentes topografías, en las cuales las superficies con una mayor área superficial, han presentado un mayor éxito clínico.

Un parámetro muy importante para evaluar clínicamente el resultado del tratamiento realizado con la colocación de un implante dental, es la formación de un contacto directo entre el implante y el hueso circundante [SGV06], por lo que muchas estrategias empleadas en la actualidad se basan en el aumento del área de

interdigitación ó contacto entre el hueso y la superficie del implante (modificando la topografía) para proporcionarle una mayor estabilidad al implante dental [GSL07].

Los implantes dentales y los aditamentos transmucosos interactúan directamente con tres tejidos diferentes: hueso, tejido conectivo y epitelio. El control del valor de la rugosidad de las superficies de titanio en implantes dentales ha estado asociado al incremento del contacto hueso-implante [JMB04] donde el perfil microtopográfico de un implante dental esta definido por la rugosidad superficial con un rango de 1-10 μm . Este rango de rugosidad maximiza la interrelación entre el hueso mineralizado y la superficie del implante [GSL07]. En estudios preliminares se ha observado que rugosidades obtenidas por diversas técnicas tanto de granallado [LLB05] como de grabado ácido han presentado una buena respuesta hueso implante [JMB04] y que un rango de rugosidad de entre 3 y 5 μm optimiza la respuesta tanto *in vivo* [APA04] como *in vitro* [JMB04] [ANS05] [BMJ96] [DBB07].

Por otro lado, se debe tener en cuenta que la boca presenta un microambiente muy especial y que las características de superficie de un implante dental pueden influenciar en la interacción y la cantidad de bacterias presentes [BOJ07]. Una superficie rugosa puede potenciar la formación y maduración de una mejor matriz sobre la cual las bacterias pueden crecer y ser capaces de obtener más protección del efecto tampón de la saliva y de los movimientos musculares naturales de autolimpieza de los carrillos y lengua (autoclisis) [WOO04].

De manera natural existe entre la superficie del diente y el tejido epitelial circundante un espacio de aproximadamente 0.69 mm de profundidad denominado surco gingival o periodontal [PEW03] (el cual forma parte del espacio biológico) que puede proporcionar un microambiente ideal para la acumulación de bacterias. Una interacción similar con la presencia de ese espacio biológico puede observarse en los implantes dentales (Figura 2.1). Gargiulo y colaboradores definieron el término espacio biológico, como la porción de la corona dental a la cresta alveolar y lo dividieron en tres partes: la primera y más externa es el surco gingival con una profundidad de 0.69mm aproximadamente (que va de la cresta gingival hasta la zona de contacto inicial del tejido gingival con la superficie del diente); la segunda es el epitelio de unión de 0.97 mm y finalmente la unión con el tejido conectivo con una profundidad de 1.07mm. [GWO61].

Es bien sabido que si una restauración presenta sus márgenes (también denominados límites o bordes) dentro del espacio biológico guiará una inflamación gingival, causando la pérdida de adhesión clínica del epitelio de unión y por consiguiente la pérdida de hueso. Este problema ha sido asociado a una inflamación destructiva como respuesta a la placa dento-bacteriana localizada profundamente en los márgenes de la restauración debido a la retención que provee y el difícil acceso para una correcta higiene [PEW03]. Por tal motivo, todos los materiales que estén dentro de este espacio deben presentar la menor rugosidad posible.

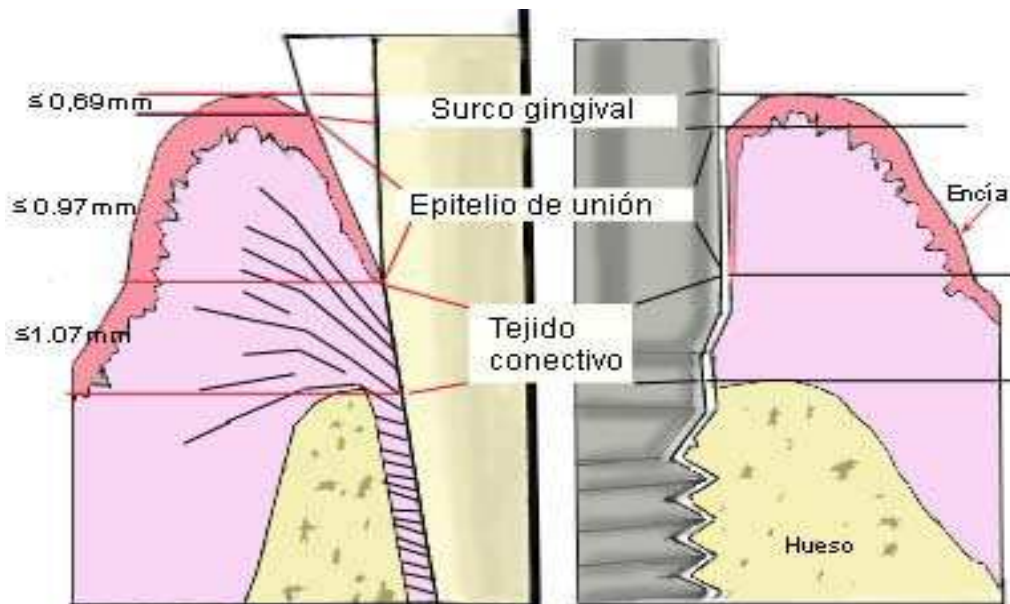


Figura 2.1. Representación esquemática de la interacción de un diente (lado izquierdo) con los tejidos circundantes, la profundidad del surco gingival y las proporciones correspondientes a la unión con el tejido epitelial y el tejido conectivo que en conjunto forman el espacio biológico. Mientras que del lado derecho, se esquematiza la similitud en la interacción del implante dental con los tejidos de soporte (modelo explicado por Berglundh y colaboradores [BLE91]).

Así mismo el cuerpo del implante dental estará inmerso en este espacio (formando una unión muy similar a la formada por el diente y los tejidos de soporte, como se aprecia en la Figura 2.1) [BLE91], por lo que las características de superficie de esta parte son de vital importancia para el mantenimiento de dicho aditamento. Por un lado con la correcta interrelación del tejido circundante y por otro lado con una superficie apta para disminuir y/o evitar la formación y acumulación de placa dento-bacteriana alrededor del implante.

2.1.1.1.1. Caracterización de la rugosidad

Existe una gran cantidad de técnicas empleadas para la caracterización de la rugosidad ya sea dentro en un rango macro, micro y nanométrico, dentro de los cuales

existen otras subdivisiones respectivamente. Estas mediciones pueden ser cuantitativas y cualitativas (Figura 2.2). [APA04]

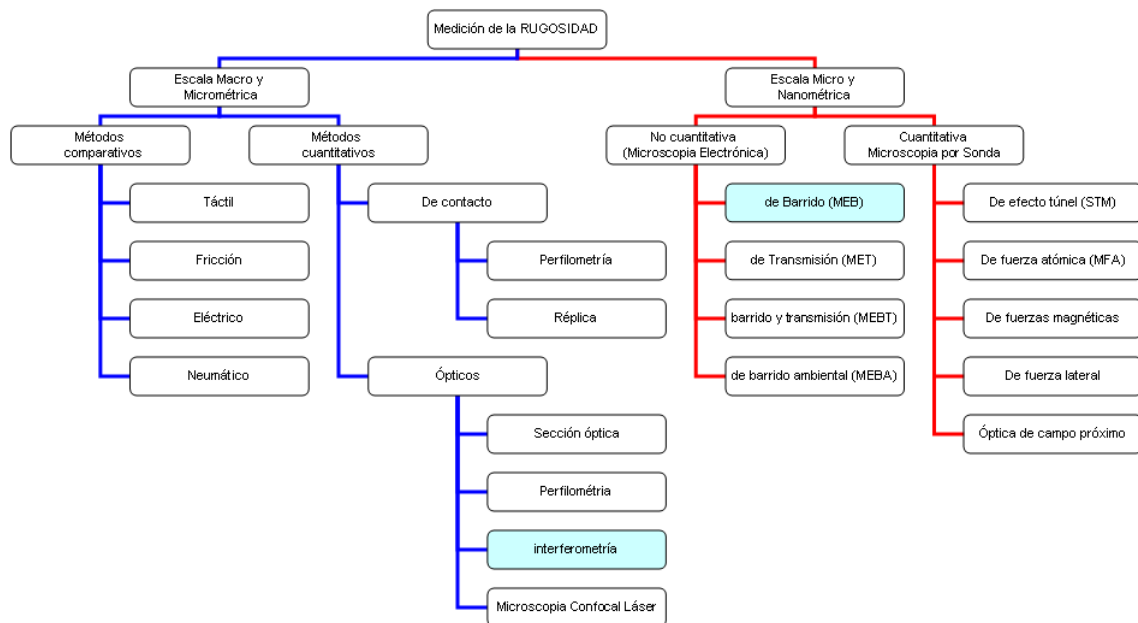


Figura 2.2. Clasificación de las diferentes metodologías que se pueden emplear para la caracterización de la topografía de una superficie (en color verde se encuentra indicadas las técnicas que se utilizaron en este trabajo de Tesis).

En este trabajo utilizamos la interferometría (sistema óptico) para la caracterización de las superficies de nuestros discos. Este sistema permite medir un rango amplio de alturas de superficie, además de no ser una técnica de contacto con la muestra, lo que nos permite realizar diversos ensayos (como cultivos celulares y/o bacterianos) directamente con las muestras caracterizadas.

2.1.1.1.1.1. Interferometría

El principio fundamental de interferometría óptica, se basa en la medición del desfase de dos ondas provenientes de la misma fuente, que son divididas y posteriormente recombinadas después de incidir sobre la superficie a estudiar y una superficie de referencia (por ejemplo un espejo). Cuando ambas ondas se recombinan, una interfiere con la otra, si las crestas de una onda coincide con el valle de otra, la interferencia es destructiva y las ondas se cancelan. Por otro lado, si las dos crestas de dos valles coinciden, las ondas se refuerzan unas con las otras. La técnica de interferometría consiste en la utilización de un haz de luz blanca la cual es filtrada y pasada a través de un objetivo interferométrico para medir la superficie. La apertura del haz del interferómetro refleja la mitad del haz incidente a la superficie de referencia

dentro del interferómetro (Fig.2.3) y la otra mitad a la superficie analizada. El haz reflejado desde la superficie estudiada y la superficie de referencia se recombinan para formar las franjas de interferencia. Estas franjas son las bandas claras y oscuras que se alternan visiblemente cuando la superficie esta enfocada. El sistema guarda la intensidad del patrón de interferencia resultante en diferentes cambios relativos de fase, para después convertir la intensidad en datos de frente de onda (fase) e integrar los datos de intensidad.

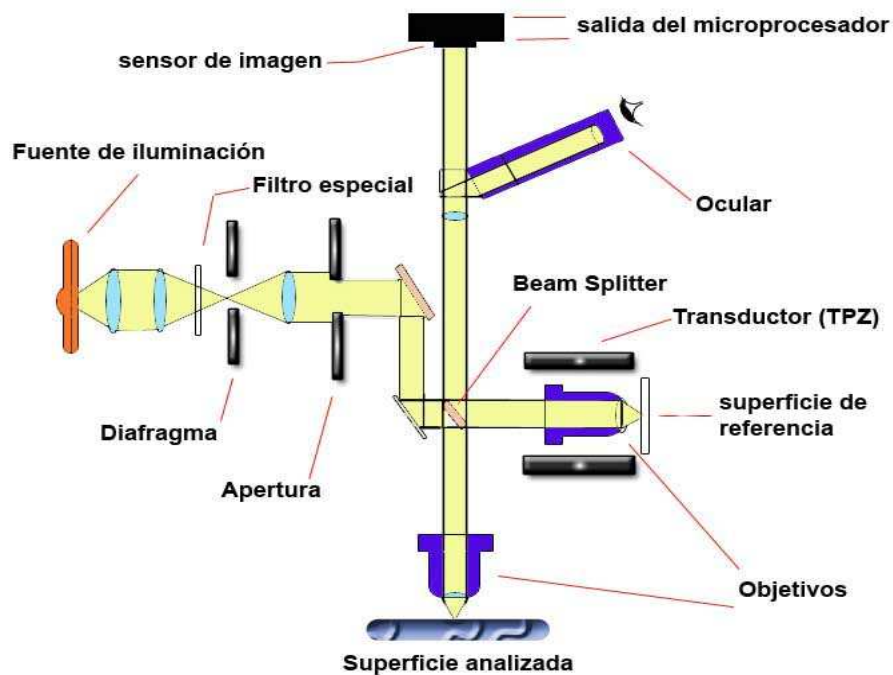


Figura 2.3. Representación del funcionamiento de un microscopio interferométrico, donde básicamente se puede apreciar el complejo sistema de iluminación empleado para la obtención de la rugosidad de una superficie [BWM88].

Un microscopio interferométrico es capaz de obtener una resolución lateral de $0,4 \mu\text{m}$ y una resolución vertical de hasta 0.1nm y el software puede calcular varios parámetros estadísticos de rugosidad para superficies planas, o que presentan otra configuración como: cilíndricas o esféricas, estas últimas medidas con gran precisión. [BWM88]

Esta técnica tiene dos principios, la interferometría de corrimiento de fase (**Phase-shiftin interferometry ó PSI**) e interferometría de barrido vertical (**Vertical Scanning interferometry ó VSI**). PSI se basa en el hecho de que diferentes partes de la superficie causan cambios de fase en la luz reflejada, algunas ondas se cancelan mientras que otras se superponen unas con otras. Esto se convertirá en un patrón con franjas iluminadas y oscuras. La rugosidad superficial provocará irregularidades en el patrón de interferencia. Con PSI es posible medir variaciones de altura en la estructura

superficial entre dos puntos separados, pero muy cercanos. En VSI se usa luz blanca para la detección de cambios de intensidad en las franjas y así determinar las diferencias en la altura [MAK84]. Además este último permite medir superficies rugosas y pasos con una gran variabilidad de altura en milímetros.

2.1.1.2. Mojabilidad.

Otra de las características de superficie importantes en la interacción célula-superficie es la mojabilidad, la cual se determina con la medición del ángulo de contacto. Esta medida proporciona información de cómo un determinado líquido se extiende sobre una superficie, ya sea sólida o líquida y por lo tanto como se adhiere a esta. Este parámetro es muy importante, ya que cualquier material colocado en el cuerpo humano será cubierto instantáneamente por una capa de H₂O (proveniente del plasma sanguíneo), adsorbida sobre su superficie.

La capacidad de un líquido para mojar una superficie es el resultado de por un lado la tensión superficial del líquido y por otro lado la energía superficial del sólido. Para la estimación experimental de esta propiedad, medimos el ángulo formado por la tangente a la interfaz líquido-vapor en el punto de contacto de las tres fases (*líquido 1- líquido 2- vapor o líquido-sólido-vapor*). Para ello se deposita una gota de líquido sobre una superficie y se mide de manera directa el ángulo de contacto por técnicas goniométricas, para finalmente estimar a partir de una gota experimental, la gota teórica que mejor ajusta, usando como uno de los parámetros de ajuste el propio ángulo de contacto. Para ello hacemos la suposición de que nuestra gota adopta una forma laplaciana (cumple ecuaciones de Laplace y de Young- Laplace). Esta ecuación (1) es aplicable para gotas pendientes y gotas sésiles en un amplio rango de tensiones superficiales para cualquier sistema fluido-líquido que pueda ser representado por la ecuación de Laplace de capilaridad (Figura 2.4).

Para que esta ecuación se cumpla, es necesario que la superficie ensayada, sea homogénea, tanto en composición como en rugosidad. En nuestras muestras estos dos parámetros no se cumplen, ya que por un lado la superficie presenta diferentes rugosidades y por el otro, presenta una alta heterogeneidad por haber sido obtenidas con partículas de diferente naturaleza química. Con estos antecedentes se pensó en emplear la técnica ADSA-D (Axisymmetric Drop Shape Analysis-Diameter). Donde la obtención de la imagen de la gota, se hace desde una vista cenital (90° con respecto a la superficie).

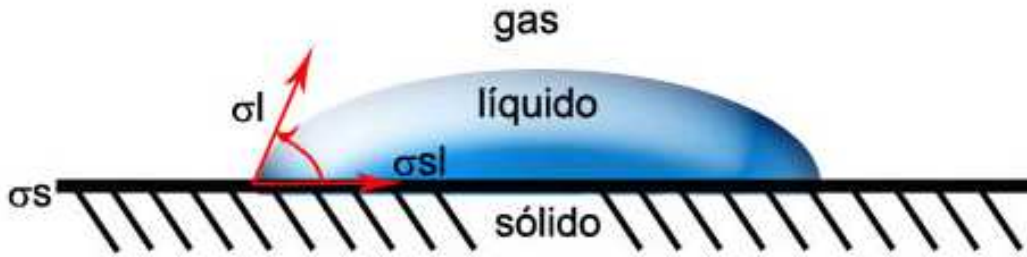


Figura 2.4. Representación de las fases líquido 1-líquido 2- vapor o líquido-sólido-vapor, para la medición del ángulo de contacto por técnicas goniométricas. [DAT]

$$\sigma_s = \sigma_{sl} + \sigma_l \cdot \cos \theta \quad (1)$$

2.1.1.2.1. Análisis de las gotas axisimétricas

Múltiples estudios han sido enfocados al estudio de gotas axisimétricas para determinar la energía de superficie. Bashfoth y Adams [BAS92] y Maze and Burnet [REf] mas actuales, por ejemplo han realizado la integración numérica de la ecuación de Laplace y el uso y optimización de técnicas de mínimos cuadrados. El método con mayor exactitud y más ampliamente utilizado, es el dado por Rotenberg y colaboradores, llamado análisis del perfil de gotas axisimétricas (ADSA-P, por sus siglas en inglés).

Entre las ventajas que presentan los métodos ADSA es que tanto los ángulos, como el volumen y el área superficial, pueden ser computados simultáneamente. Lo que permitió desarrollar el análisis del diámetro de las gotas axisimétricas (ADSA-D). La metodología ADSA-D facilita el proceso al computar ángulos de contacto, ya sea desde la zona de contacto (cuando el ángulo es menor a 90°) o el máximo diámetro "D" (cuando el ángulo es mayor a 90°) usualmente medido a partir de una fotografía vista desde arriba, conociendo el volumen de la gota sésil de un líquido con una tensión superficial conocida. Es importante considerar dos casos: a) $\theta_c \geq 90^\circ$ y b) $\theta_c < 90^\circ$ (Figura 2.5), los cuales representan dos valores de limites por separado, ya que en el primer caso (a), el máximo diámetro corresponde al diámetro ecuatorial de la gota, y en el segundo caso (b), el máximo diámetro corresponde con la línea de contacto de las tres fases ($x=R$). Donde V es el volumen de la gota y θ es el ángulo tangente para una gota sésil que es igual a θ_c .

Cuando lo que se tiene es un perfil no circular pero redondo, este se ajusta a una elipse y se obtiene el radio cuadrático medio. Este valor, junto con el volumen, la

tensión superficial de líquido y la diferencia de densidad líquido-vapor, serán nuestros parámetros de entrada en el programa. Es necesario especificar si la superficie es hidrófoba o hidrófila debido a que el contorno visto desde arriba será el ecuatorial o el de contacto respectivamente. [DEL97]

2.1.1.2.2. Medición del ángulo de contacto en superficies heterogéneas.

La ecuación de Young (1) es aplicable en superficies con ausencia de rugosidad, la cual indica que la naturaleza de mojabilidad esta determinada por la relativa afinidad de el sólido por las fases liquido y gas. Los sólidos reales son realmente rugosos y por lo tanto su mojabilidad esta influenciada significativamente por la estructura geometrica de la rugosidad superficial. [SJT07] En muestras sometidas a tratamientos de granallado, como es nuestro caso, no es posible obtener una superficie sólo metálica (titanio), ya que muchas de las partículas empleadas en el tratamiento quedan incrustadas en la superficie generando rugosidad e irregularidades. De acuerdo con Robbins y Joanny, la heterogeneidad que pueda estar causada por una contaminación química o por una superficie rugosa (en nuestro caso se encuentran ambas), puede ocasionar variaciones espaciales en la energía interfacial, lo que se traduce en variaciones en el ángulo de contacto. [ROB87]

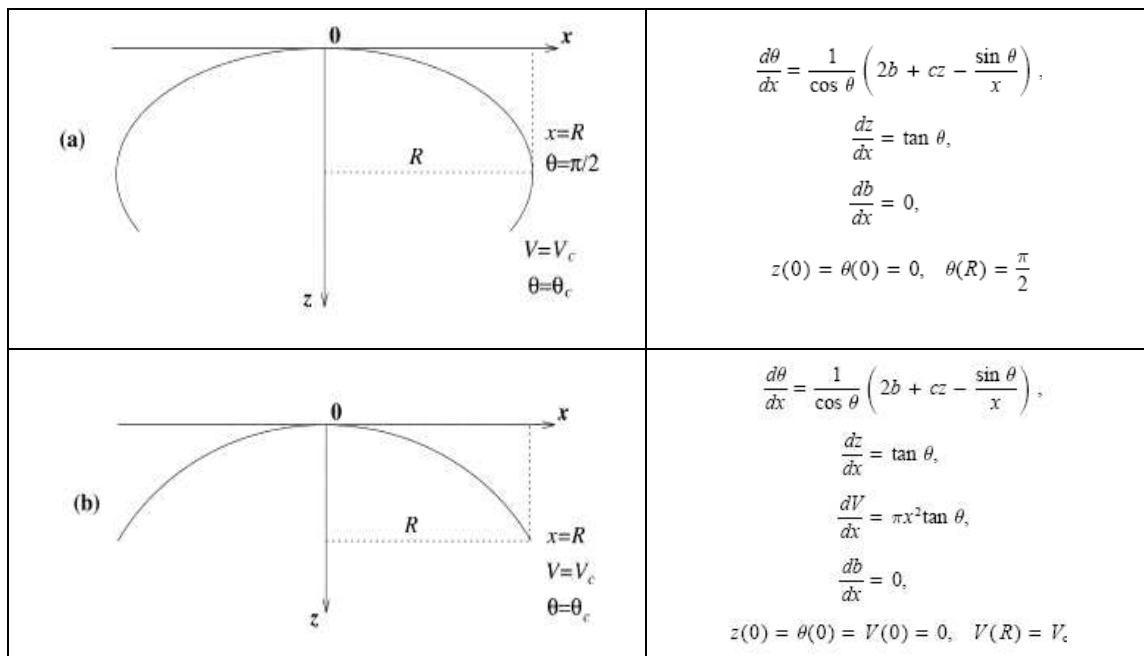


Figura 2. 5 Forma de las dos diferentes posibilidades de gotas y la respectiva ecuación que se emplea para el estudio en ADSA-D del radio ecuatorial (a) o del área de contacto (b) cuando estas no cumplen los parámetros laplacianos. [DEL97]

Existen varios trabajos sobre la mojabilidad de superficies rugosas, como los de Wenzel [WEN36] y el Cassie y Baxter [CAS44], o los de Robbins y Joanny sobre

Histeresis [GEA06], los cuales son independientes de las características geométricas de la rugosidad.

En los estudios de Wenzel, se asume que el líquido ha llenado completamente las muescas sobre la superficie rugosa y éste generaliza la ecuación de Young para obtener el ángulo de contacto aparente θ_a .

$$\cos \theta_a = r \cos \theta \quad (2)$$

Donde r lo define como el “factor de rugosidad” y esta determinado como el radio del área real de una superficie rugosa por el área geométrica proyectada en el plano horizontal (en el caso de las superficies lisas $r=1$). Esto resulta en el incremento de la mojabilidad cuando $\theta < 90^\circ$, pero incrementa la hidrofobicidad para $\theta > 90^\circ$.

Por otro lado Cassie y Baxter consideraron que no todas las muescas son llenadas, y la definen como la mojabilidad de una superficie compuesta, constituida de dos tipos de materiales homogéneos, los cuales tienen diferentes tensiones interfaciales sólido-líquido; por lo que el ángulo aparente esta dado por:

$$\cos \theta_a = f_1 \cos \theta_1 + f_2 \cos \theta_2 \quad (3)$$

Donde f y θ representan la fracción del área y al ángulo de contacto de cada material respectivamente. Por otro lado en el caso de materiales porosos o corrugados, la rugosidad esta principalmente llena de aire, en estos casos, donde los poros pueden ser considerados como no mojados y ángulo en este caso será $\theta_2 = 180^\circ$. Así $f_2 = 1 - f_1$ por lo que la ecuación (3) se convierte en:

$$\cos \theta_a = f_1 (1 + \cos \theta_1) - 1 \quad (4)$$

2.1.1.2.2.1. Histéresis

La histéresis del ángulo de contacto manifiesta la dependencia de este ángulo con el modo de obtención. La naturaleza de la histéresis del ángulo de contacto se manifiesta claramente cuando la línea de contacto ha avanzado (desde zonas que se encuentran mojadas) o retrocediendo (desde zonas que se encuentran secas) hasta llegar a una posición determinada. Los ángulos de contacto que se encuentran

mediante una y otra forma se denominan ángulo de avance σ_A y ángulo de retroceso σ_R respectivamente. La histéresis del ángulo de contacto se manifiesta como una cierta resistencia al movimiento de la línea de contacto, es decir una resistencia a modificar la extensión de la superficie de contacto. Así pues en el avance el ángulo de contacto es mayor de lo esperado, pues la extensión del líquido sobre la superficie es menor de la que correspondería. Por otro lado, en el retroceso, la inmovilidad de la línea de contacto permite alcanzar estados más extendidos de lo correspondiente encontrado con ello ángulos menores de lo esperado.

2.1.1.2.2.1.1. Ángulo de contacto de equilibrio

Los múltiples estados que pueden alcanzar un sistema (líquido-sólido-gas), se consideran estados metaestables, que representan mínimos locales en la energía. Mientras que siguen existiendo un mínimo absoluto en la energía que corresponde con el ángulo de contacto que verificaría la ecuación de Young o sus modificaciones, es decir, el ángulo hipotético que encontraríamos en ausencia de histéresis. Este ángulo de contacto, llamado habitualmente ángulo de equilibrio σ_E toma un valor intermedio entre los ángulos de avance y retroceso.

$$\sigma_R \leq \sigma_E \leq \sigma_A \quad (5)$$

A menudo los ángulos de avance y retroceso presentan una gran reproducibilidad de manera que el intervalo de ángulos de contacto sustituye al valor único del ángulo de contacto en la descripción de la mojabilidad de la superficie. La diferencia entre estos valores máximo y mínimo del ángulo de contacto sobre una superficie se conoce también con el nombre de histéresis del ángulo de contacto $\Delta\sigma$. De este modo es posible cuantificar la envergadura del fenómeno por esta diferencia de ángulos (tamaño del intervalo). Cuando los ángulos de avance y retroceso son iguales, decimos de acuerdo a la definición anterior, que la histéresis es cero o que no hay histéresis del ángulo de contacto.

Para la medida de estos ángulos de avance y retroceso se realizan ciclos de histéresis. Los ciclos de histéresis con gotas sésiles (de manera análoga ocurre con las burbujas cautivas) se realizan inyectando volumen a la gota (avance) y succionando posteriormente ese volumen (retroceso). La histéresis del ángulo de contacto se presenta como un fenómeno difícil de evitar en el estudio de los sistemas reales. Por ello el análisis de la histéresis resulta una herramienta imprescindible en la

comprensión y el estudio del mojado de estas superficies. Como causa principal se apunta a la heterogeneidad química y a la rugosidad característica de estas superficies como causantes de esta indeterminación del ángulo de contacto observable. [GEA06]

2.1.1.3. Energía Superficial.

La energía superficial de un sólido (ES) puede ser estimada usando diferentes aproximaciones independientes, como por ejemplo: la medición directa de las fuerzas, con el ángulo de contacto (mojabilidad), midiendo la penetración capilar dentro de columnas de polvos, por la sedimentación de partículas, por gradientes teóricos, por la teoría de Lifshitz de las fuerzas de van der Waals y por la teoría de las interacciones moleculares [SHA02]. La mojabilidad es una de las técnicas más simples y más ampliamente usada para este fin. La mojabilidad de los sólidos esta directamente influenciada por la energía de superficie. Esto significa por un lado, que la energía libre superficial puede ser estimada de manera indirecta, si la mojabilidad es medible cuantitativamente. Y por otro lado el comportamiento de mojabilidad puede predecirse si se conoce la energía libre superficial. La energía superficial, a partir de mediciones del ángulo de contacto, se realiza con líquidos con parámetros de energía superficial conocidos o pre-caracterizados. Donde al menos son necesarios 2 líquidos (para la mayoría de los métodos) para calcular la energía superficial.

2.1.1.3.1. Método de análisis de Owens, Wendt, Rabel Kaelble (OWRK), para el cálculo de la energía superficial.

Owens, Wendt, Rabel y Kaelble desarrollaron la idea de que la tensión interfacial puede ser separada de acuerdo a las interacciones subyacentes entre las moléculas. Ellos distinguieron entre dipolos permanentes e interacciones polares, donde las interacciones polares contienen interacciones de Coulomb entre dipolos permanentes y las únicas entre dipolos permanentes y dipolos inducidos. La interacción debida a las fluctuaciones en el tiempo de la distribución de cargas entre las moléculas es llamada interacción dispersa. Las contribuciones Polares y dispersivas a la energía superficial y la tensión superficial respectivamente están combinadas formando la suma de ambas partes.

$$\sigma_l = \sigma_l^d + \sigma_l^p \quad (6)$$

$$\sigma_s = \sigma_s^d + \sigma_s^p \quad (7)$$

Donde σ_l^d y σ_l^p representan las partes dispersivas y polares del líquido, mientras σ_s^d y σ_s^p corresponden a las respectivas contribuciones del sólido. La energía interfacial puede ser calculada de acuerdo con Owens, Wendt, Rabel y Kaelble a partir de las contribuciones del líquido y el sólido para formar la media geométrica.

Para σ_{sl} se obtiene

$$\sigma_{sl} = \sigma_s + \sigma_l - 2\left(\sqrt{\sigma_s^d \cdot \sigma_l^d} + \sqrt{\sigma_s^p \cdot \sigma_l^p}\right) \quad (8)$$

Substituyendo en la ecuación (8) el valor de σ_s dado en la ecuación (1) obtenemos:

$$\sigma_{sl} = \sigma_{sl} + \sigma_l \cos \theta + \sigma_l - 2\left(\sqrt{\sigma_s^d \cdot \sigma_l^d} + \sqrt{\sigma_s^p \cdot \sigma_l^p}\right) \quad (9)$$

$$0 = \sigma_l(1 + \cos \theta) - 2\left(\sqrt{\sigma_s^d \cdot \sigma_l^d} + \sqrt{\sigma_s^p \cdot \sigma_l^p}\right) \quad (10)$$

$$\frac{\sigma_l(1 + \cos \theta)}{2} = \left(\sqrt{\sigma_s^d \cdot \sigma_l^d} + \sqrt{\sigma_s^p \cdot \sigma_l^p}\right) \quad (11)$$

Dividiendo en la ecuación (11) la raíz cuadrada de σ_l^p obtenemos:

$$\frac{\sigma_l(1 + \cos \theta)}{2\sqrt{\sigma_l^d}} = \frac{\sqrt{\sigma_s^d \cdot \sigma_l^d}}{\sqrt{\sigma_l^d}} + \frac{\sqrt{\sigma_s^p \cdot \sigma_l^p}}{\sqrt{\sigma_l^d}} \quad (12)$$

$$\frac{\sigma_l(1 + \cos \theta)}{2\sqrt{\sigma_l^d}} = \sqrt{\sigma_s^d} + \sqrt{\sigma_s^p} \frac{\sqrt{\sigma_l^p}}{\sqrt{\sigma_l^d}} \quad (13)$$

La ecuación (13) puede resolverse gráficamente para encontrar las constantes dispersiva y polar del sólido, ajustando los datos experimentales a la ecuación de una línea recta ($y = mx + b$), donde:

$$m = \sqrt{\sigma_s^p} \quad (14)$$

$$b = \sqrt{\sigma_s^d} \quad (15)$$

Representando y contra x se puede calcular σ_s^p a partir de la pendiente de la recta y σ_s^d a partir del punto de intersección con el eje vertical. Para lograr esto, el ángulo de contacto de al menos dos líquidos debe utilizarse sobre el sólido desconocido para poder determinar su energía de superficie.

Este método es recomendado para el análisis de muestras tales como polímeros, aluminio, barnices y cubiertas, aportando además información de las componentes polares y dispersivas de la energía superficial. [DAT]

2.1.1.4. Caracterización biológica (fibroblastos)

El éxito de la mayoría de los implantes tanto dentales como ortopédicos, dependen de una correcta osteointegración [ZAG03]. Una optimización de la topografía y la química así como la previa adición de proteínas (fibronectina o vitronectina) o moléculas que favorezcan la respuesta celular con la superficie del implante ha sido realizado y ampliamente estudiado para facilitar la adhesión y diferenciación de las células formadoras de hueso y promover la formación de una matriz de colágena sobre el implante [GHS00] [LBB98] [DBD99] [FWY03] [ZCS04] [ABN02].

De igual forma promover la adhesión de fibroblastos (provenientes del ligamento periodontal) y keratinocitos para mejorar la cicatrización y la formación del epitelio de unión (con su respectivo tejido conjuntivo de soporte) sobre el implante dental es uno de los objetivos de estudio en la actualidad como una manera de ayudar al buen funcionamiento y mantenimiento de los implantes dentales evitando la colonización y proliferación de bacterias [GEI00] [ZTF05] [BWM05] [ZLB05] [SOH06] [CSL02] [GND02]. A ésta estrecha interrelación se le conoce como “*sellado biológico*”, la cual impide la entrada de bacterias y detritos alimenticios al medio interno desde la cavidad oral. Este sellado es necesario debido a que el implante dental es un aditamento que en uno de sus extremos se encuentra en el medio interno (interactuando con el hueso) y el otro se encuentra dentro de la cavidad bucal en

contacto directo con saliva (la cual tiene entre otras cosas, iones, restos de proteínas, glóbulos blancos y una gran cantidad de bacterias).

Existen una gran cantidad de estudios de fibroblastos y su interacción con diversas superficies (cementos de fosfatos de calcio, titanio, titanio texturizado, titanio recubierto con: RGD, péptidos, hidroxiapatita, etc.) *in vitro* [ZTF05] [BWM05] [ZLB05] [SOH06] [MSH98]. Estos estudios han demostrado que los fibroblastos responden a la microtopografía de la superficie de un sustrato, mostrando gran sensibilidad por la orientación, dimensiones y la rugosidad además de la química de la superficie. Eisenbarth y colaboradores, observaron que una rugosidad de 130 nm es suficiente para inducir la orientación de los fibroblastos y al mismo tiempo sus resultados mostraron una aumento importante en la cantidad células orientadas, el cual iniciaba en un 10% del total de células adheridas en la superficie cuando la rugosidad superficial era de 0,04 μm , y aumentaba hasta un 60 y 72 % cuando la rugosidad era de 0,34 y 1.36 μm respectivamente. [EMN96]

La interacción de las células (fibroblastos, osteoblastos, keratinocitos, epitelocitos, etc.) sobre las diversas superficies de los biomateriales esta mediada por las proteínas de la matriz extracelular, influyendo no sólo sobre la interacción célula-superficie del implante, sino además actuando como el medio de adhesión entre estos. La participación de proteínas como la vinculina, integrinas, vitronectina o fibronectina influye en este proceso. Especialmente la molécula Fibronectina de la matriz extracelular, la cual determina prioritariamente la adhesión y el esparcimiento además de la migración y la diferenciación de fibroblastos sobre superficies de Titanio. [DGF96] [SRW07]

Los mecanismos de adhesión y formación de matriz extracelular son los primeros pasos en la interacción con la superficie de un implante la cual esta controlada por receptores llamados integrinas, las cuales se unen a las proteínas de la matriz extracelular como la fibronectina a través de su dominio extracelular. La fibronectina es un componente importante de la matriz extracelular, donde ésta regula una gran cantidad de actividades celulares a través de interacciones directas con la superficie celular por medio de las integrinas. [LBB05]

La fibronectina es sintetizada por varios tipos de células (osteoblastos y fibroblastos) las cuales posteriormente se ensamblaran dentro de una red fibrilar (también conocida como matriz extracelular). El proceso de ensamblaje es

dependiente de las integrinas y de la interacción fibronectina- integrina, el cual pone en marcha un proceso involucrando por un lado, la activación conformacional de la fibronectina fuera de la célula y por el otro la organización de la actina del citoesqueleto dentro de la célula. [MSH05]

2.2. OBJETIVOS

Las propiedades de superficie influyen en el comportamiento celular tanto de bacterias, como de células encargadas de soportar a los implantes dentales (osteoblastos, fibroblastos, etc.), por lo que la caracterización de las superficies fisico-químicas y biológicas es de gran importancia. Donde los objetivos de este capítulo fueron:

- Analizar los valores de rugosidad y el aumento en el área real de los discos de titanio comercialmente puro, obtenidos por granallado, empleando diferentes tipos de partículas y tamaños.
- Determinar la mojabilidad de las diferentes muestras de titanio comercialmente puro tanto por Perfilometría convencional (goniometría) como por el análisis del diámetro de gotas axisimétricas (ADSA-D).
- Determinar los valores de energía superficial para cada tipo de superficie.
- Analizar el comportamiento de adhesión inicial de fibroblastos humanos sobre las diversas superficies de titanio.

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. Obtención de las muestras

Las muestras de Titanio comercialmente puro (Ti-cp) grado II, empleados en este trabajo fueron discos con unas dimensiones de 5 mm de diámetro y 2 mm de grosor. Partiendo de trabajos previos dentro del grupo de investigación de Biomateriales de la Universidad Politécnica de Cataluña, se seleccionaron dos grupos que mostraron los mejores resultados en cuanto a la interacción con osteoblastos y en ensayos *in vivo* [APA04]; estos grupos fueron: las superficies granalladas con Oxido de Aluminio (Al_2O_3) y con Carburo de Silicio (SiC). Además se tomaron como control dos superficies, una superficie de Ti-cp pulida (Smooth) y una superficie mecanizada (sin ningún tipo de tratamiento posterior que denominamos como Mech).

En el caso de las muestras lisas, los discos se pulieron siguiendo los procedimientos de metalografía básica con discos de papel abrasivo **Carbimet®** de la casa **Buehler**, empezando con un #600 para obtener una superficie plana, después un disco #1200 y finalmente un #4000 para eliminar las ranuras más profundas. Posteriormente, se utilizó un paño impregnado con una solución de alúmina de 1 μm y finalmente para obtener una superficie especular, se utilizó un paño mojado con una solución de sílica coloidal. Para obtener las muestras rugosas los discos fueron granallados con dos partículas de proyección distintas Oxido de Aluminio y Carburo de Silicio, con dos granulometrias diferentes cada una (Tabla 2.1). Para este procedimiento se empleó una granalladora modelo RB4 de RAYTECH INDUSTRIES y las condiciones de granallado para todos los discos fueron las siguientes:

- Presión de proyección: 0,25 MPa.
- Tiempo de proyección mínimo: 5-10 segundos
- Distancia de proyección entre la superficie del disco y la boquilla: ≈ 10 cm
- Angulo de impacto: $\approx 60^\circ$ [APA04]

2.3.2. Medición de la rugosidad

La rugosidad fue analizada por dos técnicas diferentes una cualitativa y otra cuantitativa. La primera se realizó con un Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) JEOL **JSM 6400**, mientras que la segunda fue medida con un microscopio

interferométrico WYKO NT1100 de Veeco Metrology Group, con el procesador de imágenes **Vision 32** acoplado al equipo. Este microscopio consta de 2 objetivos fijos (5X y 50X) y 3 objetivos intermedios intercambiables (0.5, 1 y 2), lo cual permite hacer ampliaciones de hasta 100X.

Tabla 2.1. Nomenclatura de las rugosidades seleccionadas para este trabajo.

Nomenclatura	Partícula empleada	Tamaño (µm)
AL2	Al ₂ O ₃	(212-300)
AL6	Al ₂ O ₃	(425-600)
SI2	SiC	(212-300)
SI6	SiC	(425-600)

Los discos previamente pulidos y granallados, fueron analizados por medio de esta técnica en tres zonas (10 muestras de cada tipo) y se cuantificaron los siguientes parámetros:

- **Ra:** es el valor promedio de la rugosidad de todas las medidas obtenidas.
- **Rq:** La raíz cuadrada promedio de la rugosidad, calculada sobre el total de la medición o dicho de otra forma es el valor medio de la raíz cuadrada de las desviaciones del perfil respecto a la línea media, a lo largo de la muestra.
- **Rt:** Describe la distancia entre la altura del máximo pico y la profundidad del mayor valle a lo largo de la muestra.
- **SA:** Index Area.

2.3.2.1.1. Cálculo del área real.

Considerando que cada tipo de muestra presenta valores diferentes de rugosidad, la superficie de contacto o área real (A_r) cambiará en función de esta. Así, para conocer el área real de cada tipo de muestra, se empleó la siguiente ecuación:

$$SA = A_r / A_n \quad (13)$$

Donde: **SA** = Área Indexada (valor dado por el software del interferómetro).

Como se había mencionado previamente los discos empleados para este estudio, tenían unas dimensiones de 5mm de diámetro y 2 mm de grosor, por lo que primero fue necesario calcular el área nominal (A_n), donde r es el radio, d es el diámetro y h la altura del disco.

$$A_n = (2\pi r^2) + [(\pi \cdot d)h] \quad (14)$$

2.3.3. Ensayos de mojabilidad (Perfil)

Una vez obtenidos los valores de rugosidad de las superficies, se realizaron los ensayos de mojabilidad con un medidor de ángulo de contacto Contact Angle System OCA15plus de DataPhysics Instruments con un CCD y un software acoplado al equipo (SCA20), para la obtención y el análisis de las imágenes. En este sistema las imágenes son capturadas con una cámara-CCD y almacenadas para su análisis. Para la determinación del ángulo de contacto es necesario determinar:

- La línea base
- El perfil de la gota
- Medición del ángulo de contacto

La posición de la línea base y el contorno de la gota (30 μ l) son determinados calculando la diferencia entre el brillo de un pixel y los pixeles vecinos de toda la imagen. La línea del contorno de la gota y la línea base son el resultado de la posición de las máximas diferencias en brillantes y el máximo contraste. El software del equipo permite aplicar la función matemática que se desee emplear, en este estudio de tesis, utilizamos el método Young-Laplace, la cual determina una línea adaptada al contorno de la gota, la cual representa exactamente dicho contorno. [DAT]

Las mediciones se realizaron con agua, formamida y diiodometano, tanto para medir la mojabilidad de las superficies (agua) como para calcular la energía de superficie del titanio (agua, formamida y diiodometano).

2.3.3.1. Ensayos de mojabilidad desde cenital e histéresis.

Para los ensayos de Histéresis (avance y retroceso) las muestras fueron perforadas en el centro con una fresa de diamante (diámetro de 0.52 mm) para que las agujas Hamilton ® y fijarlas. Los ensayos en cenital (ADSA-D) y de histéresis se realizaron en la Universidad de Granada en el Departamento de Física Aplicada empleando un equipo que con las siguientes características:

1. Microscopios (objetivo apozoom Leitz R Macro 200; sistema de lentes Invaritar).
2. Fuentes luminosas (bombilla variable con vidrios esmerilados como difusores; fuente Stocker & Yale R® Inc., Mille Luce M1000 basada en fibra óptica en extremo se encuentra el foco/difusor Dolan-Jenner Industries R® Inc., QVABL).

3. Cámaras de video (de posición ajustable) con CCD monocromo (SonyR ® SSC-M370CE y COHUR ® 4910 CCIR con una resolución de 752 X 582 píxeles). En las cámaras que utilizan tecnología de estado sólido (CCD), la luz que incide sobre cada elemento genera una carga proporcional a la intensidad lumínica, la cual es recogida mediante condensadores y transferida en forma de corriente a un amplificador. La imagen aparece como una serie de voltajes a la salida del amplificador.
4. Tarjetas digitalizadoras (Data Translation R ® DT-2855 Mach Series con una resolución de 768 X 512 píxeles y 256 niveles de gris. Velocidad de captura 25 imágenes/segundo.
5. Programa informático de captura, procesadores y cálculo: Dilaten ® y Contacto ®. Estas aplicaciones han sido diseñadas por el profesor de la Universidad de Granada Juan Antonio Holgado Terriza [HOL02]
6. Microposicionadores horizontales y verticales compuestos por tornillos micrométricos sobre los que se sitúan las celdas y que permiten mover libremente la superficie en cualquier dirección, incluso alinear la superficie horizontalmente.
7. Microjeringas Hamilton ®, de 100 µl adecuadas para la formación de gotas sésiles, burbujas cautivas o burbujas “pendientes invertidas”. [AGU04]

2.3.3.1.1. Histéresis

Los ensayos de Histéresis se dividieron en dos partes: en primer lugar se observó el avance y retroceso de la gota, sobre las superficies de Titanio. Y por los resultados obtenidos de retroceso de la gota, se realizaron ensayos de retroceso de una burbuja (aire) cautiva invirtiendo los medios (una gota de aire en medio acuoso).

2.3.3.1.2. Avance y retroceso de la gota

Para este ensayo, la muestra con la perforación se colocó sobre un portamuestras de teflón y la aguja Hamilton ® con agua Milli Q se alineó a la superficie de la muestra (es decir que no rebasara el borde de la superficie) como se observa en la Figura 2.6. Se ajustó la imagen en la pantalla y se programó el equipo para que se inyectasen 30 µl (durante un minuto), después se mantuvo la gota 5 segundos de reposo y por último se extrajo el agua durante un minuto. Paralelamente se realizó la captura de imágenes de avance (50 imágenes por minuto) y retroceso (50 imágenes

por minuto) con el programa Contacto®, el cual realiza al mismo tiempo la captura y la medición del ángulo de contacto.

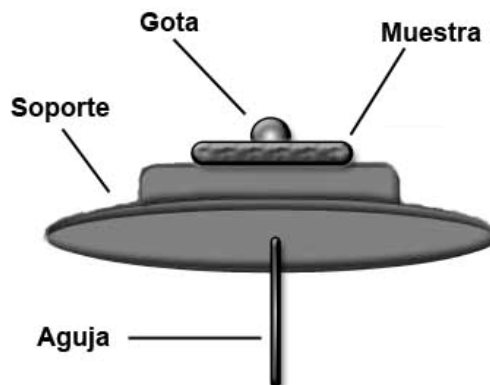


Figura 2.6. Representación gráfica de la colocación de la muestra y la aguja para poder crecer la gota sobre la superficie.

2.3.3.1.3. Retroceso de la burbuja cautiva

En este caso, la muestra se sumergió en una cubeta de vidrio óptico especial (Glass cell 20x20x20 mm Inner LxWxH) con agua, soportada sobre una base de teflón, con una perforación para la aguja, colocada en el borde de la superficie (Figura 2.7) y se siguió el mismo procedimiento de inyectar 30 μ l en este caso de aire durante 1 minuto y 5 segundos de reposo y al mismo tiempo la captura simultánea de 50 imágenes por minuto con la obtención del ángulo en cada una de ellas.

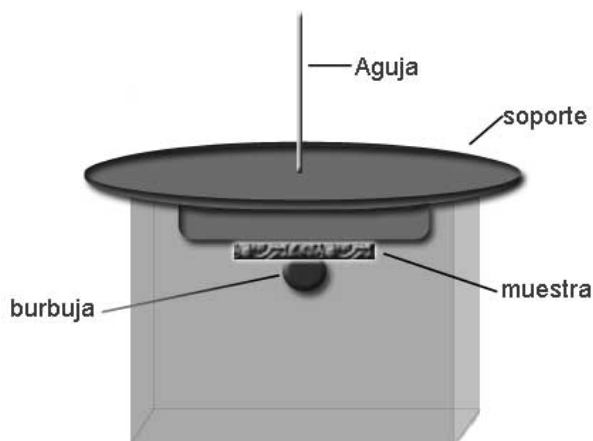


Figura 2.7. Representación esquemática de la colocación de la muestra sobre un soporte de teflón en el contenedor de vidrio, donde el medio de inmersión es agua y se midió el ángulo formado por la superficie de titanio y una línea tangente a la superficie de la burbuja.

2.3.4. Energía Superficial

Con los datos obtenidos de ángulo de contacto con los tres líquidos: agua, formamida y di-iodometano se calculó el ángulo de contacto aparente con la ecuación

de Wenzel. Estos últimos datos se utilizaron para calcular la energía de superficie con el método de análisis de Owens, Wendt, Rabel y Kaelble (OWRK) con los valores de energía superficial de los líquidos mostrados en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Valores de energía superficial, constante dispersiva y polar de los líquidos empleados para el cálculo de la energía de superficie del sólido.

	Energía Superficial σ_l mJ/m^{-2}	Dispersión (σ_l^d)	Polar (σ_l^p)
Agua	72,1	19,9	52,2
Formamida	56,9	23,5	33,4
Diiodometano	50	47,4	2,6

2.3.5. Caracterización biológica

Estas superficies han sido ampliamente estudiadas en el grupo de investigación de Biomateriales de la Universidad Politécnica de Cataluña, con resultados favorables tanto con las superficies granalladas con Al_2O_3 como con las granalladas con SiC, tanto para la interacción con osteoblastos con dichas muestras como en los ensayos *in vivo* [APA04]. En esta sección, sólo se realizaron ensayos de adhesión a 2 horas con fibroblastos (células encargadas de formar el soporte del tejido epitelial). Para estos ensayos, se utilizaron discos de Titanio con unas dimensiones de 8mm de diámetro y 2mm de grosor con los mismos seis tipos de superficies antes mencionados.

2.3.5.1. Adhesión inicial de fibroblastos

Las células empleadas para estos ensayos fueron fibroblastos humanos N1 P6 (Pase 6) 1×10^6 obtenidos de Eucellbank (Eucaryotic cell line Collection) del departamento de biología celular de la Universidad de Barcelona. Las células fueron entregadas confluentes en un frasco de 75 cm^2 en DMEM con 10% de suero bovino fetal. Se realizaron un par de pases más para, por un lado congelar algunos viales y por otro lado tener la cantidad necesaria de células para dicho ensayo.

Los discos se lavaron con acetona, alcohol y agua destilada 2 veces durante 15 minutos en cada líquido y se esterizaron en autoclave a 121 °C por espacio de 20 minutos, para finalmente colocar 3 discos de cada tipo en una placa multiwell de 24 posillos. Una serie de discos de cada tipo fue precubierta con 50 μl de fibronectina (a una concentración de 20 $\mu g/ml$) y otra serie con 50 μl de suero bovino fetal las cuales se incubaron por espacio de 30 minutos a 37°C a 5% de CO_2 . Pasado este tiempo se

elimino la fibronectina y el suero sobrantes, se lavaron 2 veces las muestras con PBS 1X y se coloco 1 ml de suspensión de células (1×10^4) en DMEM (sin suero) en cada pocillo por espacio de 2 horas a 37°C a 5% de CO₂. Una vez transcurrido el tiempo de incubación y para observar las superficies de los discos, se utilizó una tinción vital, por lo que se colocaron 5 µl de FDA (Diacetato de Fluoresceina) en el medio de cada pocillo.

Con las imágenes y el programa ImageJ®, se realizó un análisis de las imágenes (3 imágenes por cada tipo de superficie) para calcular el porcentaje del área nominal que se encontraba cubierta por células. [MSH98] [SOH06] [FTN06]

2.3.5.2. Análisis Estadístico.

Los resultados obtenidos en cada una de las diferentes técnicas, fueron analizados por medio de ANOVA para determinar las diferencias significativas entre grupos ($p > 0,05$).

2.4. RESULTADOS

2.4.1. Rugosidad

El primer paso fue analizar cualitativamente los diferentes tipos de superficie que se emplearon para estos ensayos y la técnica empleada para esto fue Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

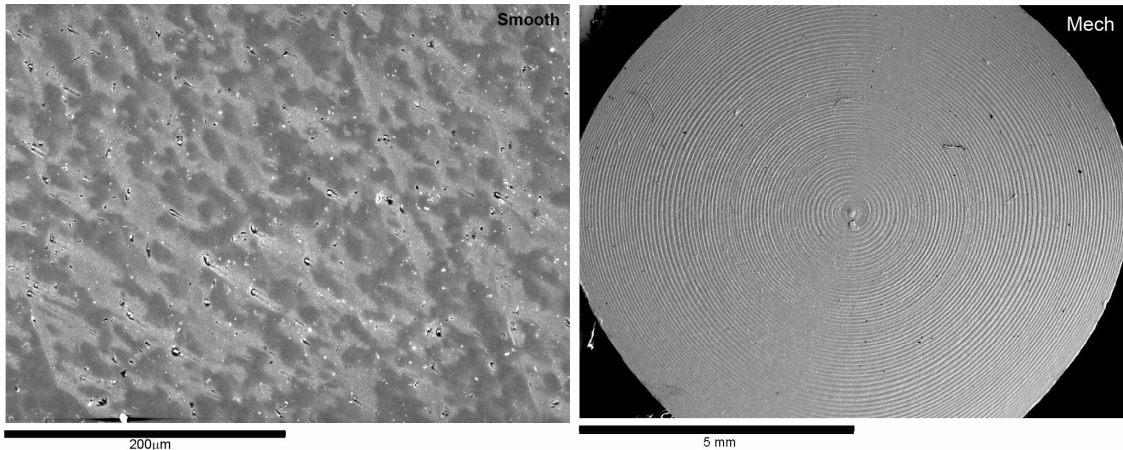


Figura 2.8. Observación de los discos de Titanio por MEB, donde se pueden apreciar, las imperfecciones en la superficie Smooth (en la cual fue necesario llegar a mayores aumentos para poder observar estos detalles sobre la superficie) y los anillos concéntricos obtenidos por el mecanismo de corte en las muestras Mech.

Estas imágenes muestran con detalle los defectos que no son apreciables a simple vista, como se puede observar en los discos Smooth y Mech figura 2.8. En el caso de las muestras granalladas, son evidentes los cambios en la rugosidad por el tratamiento, mostrando una aparente similitud entre las muestras Al2 y SI2 así como entre las muestras Al6 y SI6 (Figura 2.9). Debido a la fuerza de proyección y la dureza de las partículas empleadas en el granallado, la presencia de restos de dichos materiales quedó evidenciado en todos los tipos de superficies siendo más contundente en las muestras granalladas con alúmina como lo muestra la figura 2.9, donde se puede apreciar, por un lado la rugosidad obtenida por el proceso y por otro lado restos de alúmina formando parte de la topografía de la muestra.

Ya que estas imágenes sólo son una caracterización cualitativa, fue necesario el uso de una técnica cuantitativa para evaluar las diferencias entre los tipos de muestras. Los valores de rugosidad, así como la variación del área real de cada muestra, fueron analizados con mucho mayor detalle con el Microscopio Interferométrico.

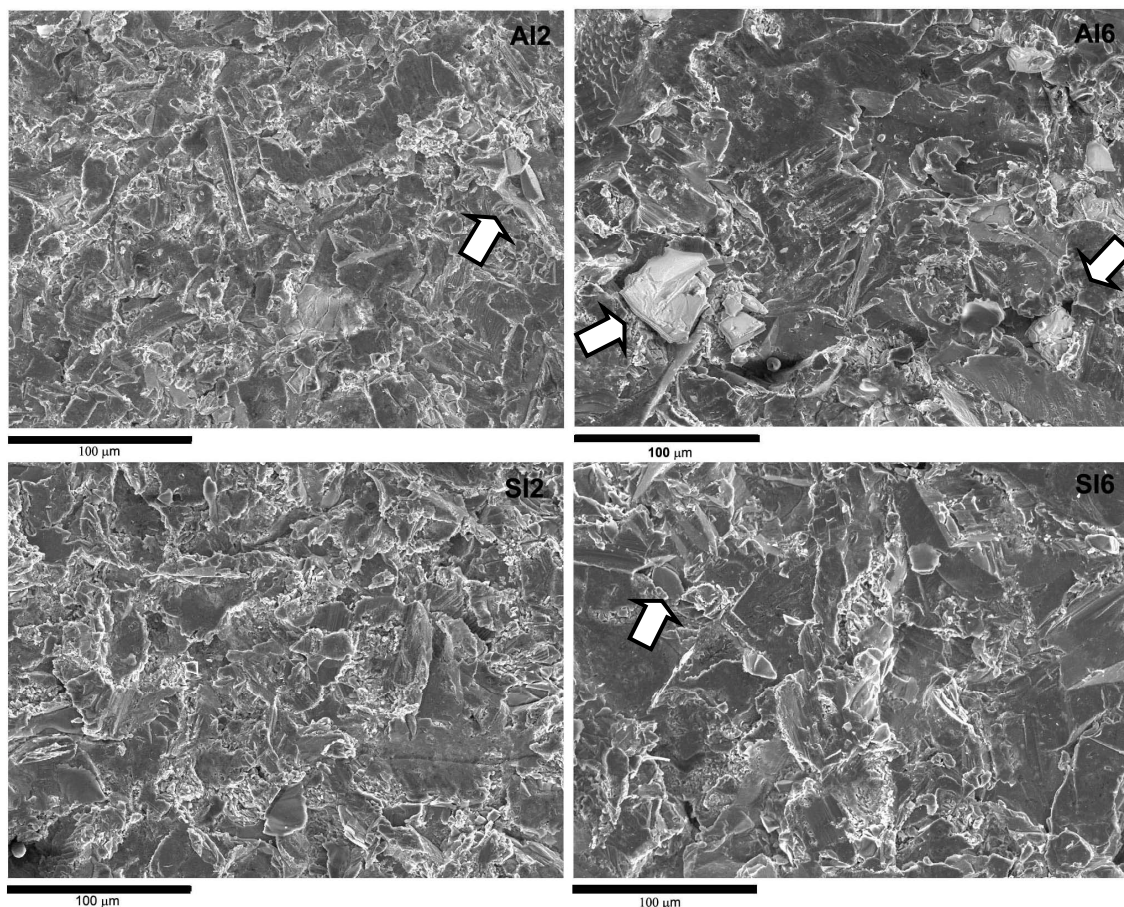


Figura 2.9. Imágenes de MEB de las muestras obtenidas por granallado con Al_2O_3 y SiC. La presencia de restos de partículas en la superficie se puede apreciar en las imágenes Al6 y Al2 (flechas)

2.4.1.1. Medición de la rugosidad

Como se ha dicho anteriormente, la caracterización del Ti-cp empleado en la elaboración de implantes dentales es de suma importancia debido a las diferentes respuestas celulares (osteoblastos, fibroblastos, keratinocitos y bacterias) a las propiedades de superficie del material implantado, como la rugosidad, la mojabilidad y la energía de superficie.

Tabla 2.3. Valor de la media de la rugosidad obtenida de las diferentes superficies (alúmina y carburo de silicio). Esta representadas el valor de la media y la desviación estandar (\pm). Las diferencias significativas en cada grupo están representadas con *, ** y ***.

Nomenclatura	Partícula de granallado (μm)	Ra (μm)
Smooth	-----	$0,17 \pm 0,02^*$
Mech	-----	$0,34 \pm 0,03^*$
Al2	Al_2O_3 (212-300)	$2,97 \pm 0,2^{**}$
Al6	Al_2O_3 (425-600)	$5,2 \pm 0,6$
Si2	SiC (212-300)	$2,7 \pm 0,2^{**}$
Si6	SiC (425-600)	$4,1 \pm 0,4^{***}$

Las imágenes de Interferometría muestran comparativamente las diferentes superficies obtenidas, tanto las no granalladas (Smooth y Mech) como las granalladas con los cuatro tipos de partícula Al2, Al6, Si2 y Si6 (Fig. 2.10). Las observaciones realizadas se hicieron a 10X en todos los casos. El detalle observado previamente en MEB, se aprecia nuevamente en estas imágenes. En el caso de la muestra Mech es posible apreciar las franjas obtenidas por el mecanismo de, mientras que en Smooth, la superficie muestra una textura muy suave. Al mismo tiempo, las muestras granalladas con alúmina de menor tamaño (Al2) presentan una superficie similar a Si2, y menos rugosa que Al6 y Si6.

Con los resultados preliminares obtenidos en cada análisis (Figura 2.10) y los datos aportados por el Software **Vision 32®**, se obtuvo la Ra (valores medios de rugosidad) de todas las muestras los cuales están representados en la Tabla 2.3. En el caso de las muestras Smooth y Mech los valores de Ra fueron menores a 350nm, mientras que las muestras granalladas con partículas de tamaño pequeño presentaron una rugosidad menor a las 3 μm (Al2 Ra \approx 2,97 y Si2 Ra \approx 2,71) y las granalladas con partículas de mayor tamaño presentaron los mayores valores (Al6 Ra \approx 5,18 y Si6 Ra \approx 4,14).

De manera general, las muestras granalladas con carburo de silicio, presentaron valores de Ra menores en ambos casos al ser comparada con las muestras granalladas con alúmina, aun cuando la partícula empleada tanto de alúmina como de carburo de silicio presentaba el mismo tamaño respectivamente (Tabla 2.3). Por otro lado, se analizaron los diversos valores de rugosidad de la superficie como la Rq y la Rt y se evaluaron comparativamente con la Ra, como se aprecia en la tabla 2.4.

Tal y como en el caso de la Ra, los valores aumentaban en cuanto al tamaño de la partícula (sin considerar la diferente naturaleza química), los valores de Rq y Rt también aumentan de la misma manera, como se puede apreciar en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Tabla comparativa entre los diferentes datos de la rugosidad aportados por el programa Vision 32 a partir de las imágenes obtenidas con el interferómetro.

	Smooth	Mech	Al2	Al6	Si2	Si6
Ra (μm)	0,17 \pm 0,02	0,34 \pm 0,03	2,9 \pm 0,2	5,2 \pm 0,6	2,71 \pm 0,2	4,1 \pm 0,4
Rq (μm)	0,22 \pm 0,03	0,45 \pm 0,04	3,8 \pm 0,2	6,7 \pm 0,6	3,1 \pm 0,2	4,9 \pm 0,7
Rt (μm)	2,3 \pm 0,4	7 \pm 1	30 \pm 3	56 \pm 4	28 \pm 3	42 \pm 5

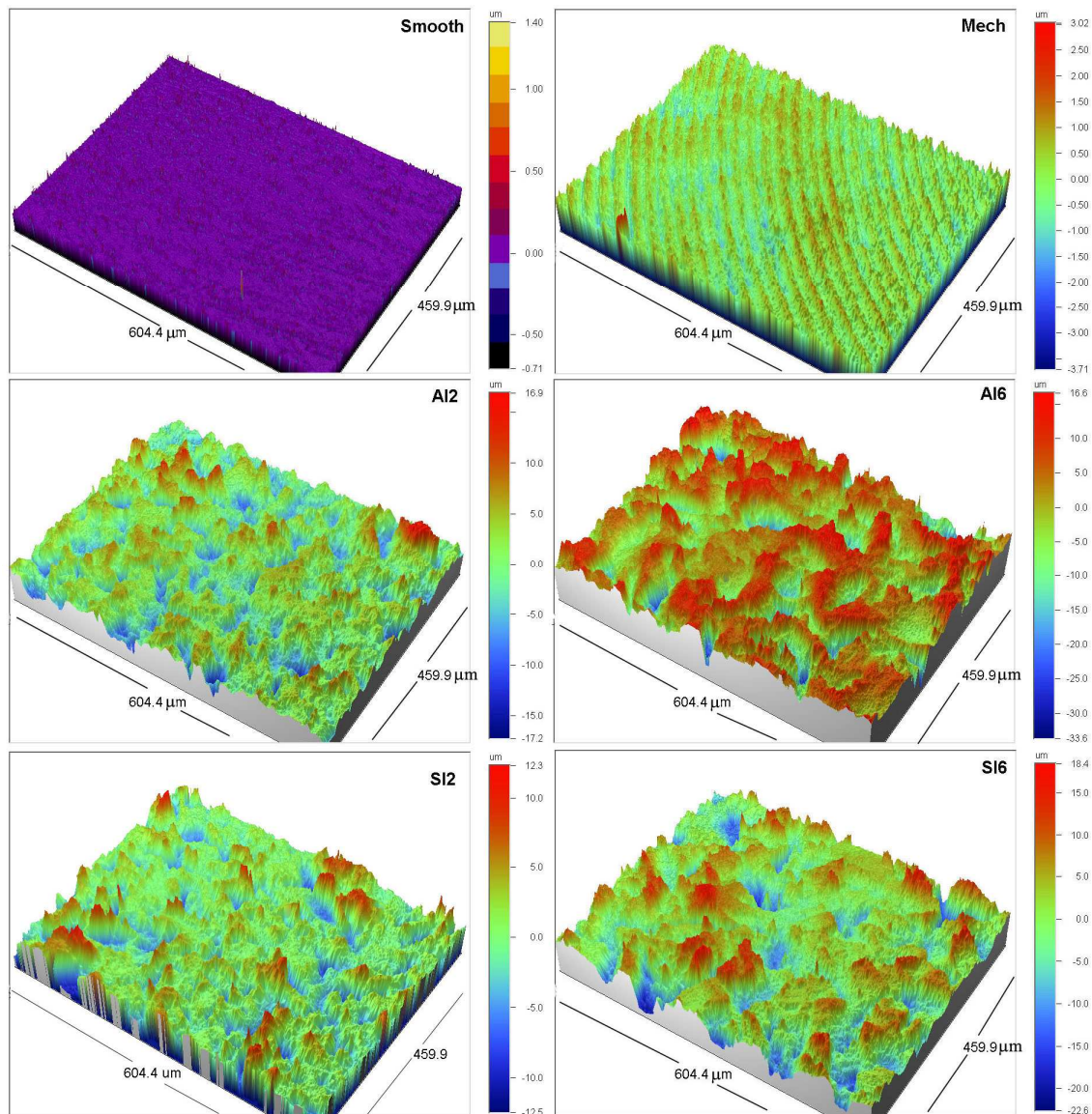


Figura 2.10. Ejemplo de las imágenes obtenidas con el microscopio interferométrico, donde se puede apreciar con mayor detalle la topografía de las superficies para cada tipo, las cuales fueron utilizadas para obtener los valores de Ra.

2.4.1.1.1. Área Real

Los resultados de área real, muestran un incremento considerable en los valores de área total, en las muestras granalladas tanto con alúmina como con carburo de silicio, donde el incremento fue 33%-82%, mientras que en las muestras no tratadas el aumento fue sólo de un 4% para Smooth y un 6 % para Mech (ya que los valores de rugosidad estaban en un rango nanométrico), como se puede apreciar en la Tabla 2.3.

Tabla 2.5. Valores de área real de los discos de titanio. Es claramente visible como aumenta el área total casi al doble en las muestras granalladas con partículas de mayor tamaño (Al6 y Si6).

	Nominal (mm ²)	Index Area	Area Real (mm ²)
Smooth	70,7 ± 0,5	1,04 ± 0,01	74 ± 2*
Mech	70,7 ± 0,5	1,06 ± 0,02	75,3 ± 3*
Al2	70,7 ± 0,5	1,64 ± 0,1	115,6 ± 8**
Al6	70,7 ± 0,5	1,82 ± 0,2	128,8 ± 11**
Si2	70,7 ± 0,5	1,33 ± 0,3	94,4 ± 7
Si6	70,7 ± 0,5	1,71 ± 0,2	121 ± 8**

2.4.2. Angulo de contacto

2.4.2.1. Mojabilidad (perfil)

Los resultados de mojabilidad, muestran que las superficies no tratadas (Smooth y Mech), presentan una superficie con valores de ángulo de contacto menor, con respecto a las granalladas. En el caso de las muestras Mech y Smooth, la desviación estándar fue mayor (especialmente en Mech) que en el caso de las granalladas como se puede apreciar en la Figura 2.11. Por lo que se recurrió a la técnica ADSA-D.

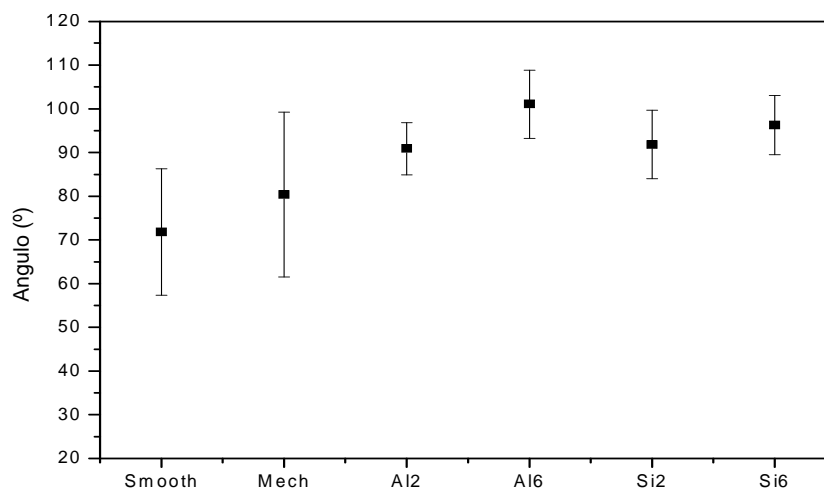


Figura 2.11. Variaciones del ángulo de contacto para las diversas superficies de titanio.

2.4.2.2. Mojabilidad calculada desde una vista cenital (ADSA-D)

Lo primero que se analizó fue la forma de las gotas sobre los discos de titanio, observándose que ninguna de las gotas presentaba una forma redonda, es decir que no seguían las condiciones de Laplace. Ésto fue más evidente en la muestra Mech, donde la topografía de la superficie (debido a las líneas concéntricas), influyeron en la forma y comportamiento de la gota depositada sobre su superficie. Al mismo tiempo en la muestra Smooth y Al2 se colocaron dos gotas del mismo volumen (30 μ l), y se pudo

observar que en ambos casos, ni la forma ni el diámetro (ya fuese el de contacto o el ecuatorial dependiendo el caso) presentaban las mismas características (Figura 2.12).

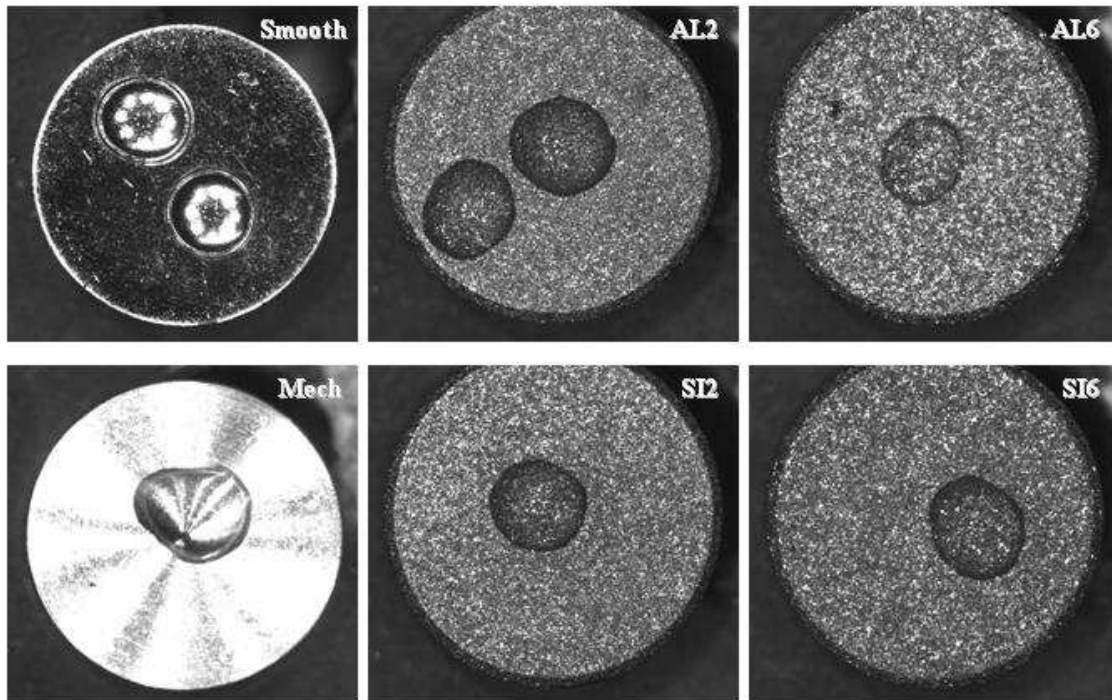


Figura 2.12. Formas de las gotas de agua sobre las diferentes superficies de Ti-cp vistas desde una perspectiva cenital, donde se aprecia claramente la forma no laplaciana de las mismas especialmente sobre la muestra Mech. Por otro lado sobre las muestras Smooth y AL2 se ve claramente las variaciones que puede presentar una gota con el mismo volumen sobre la misma superficie.

Al medir los respectivos diámetros y calcular los ángulos en cada caso, pudimos observar que los resultados tanto de ADSA-D como del perfil eran prácticamente iguales, con la diferencia que la desviación estándar en los resultados de ADSA-D fueron menores, como se puede apreciar en la figura 2.13.

Para poder observar la influencia de la rugosidad con respecto a la mojabilidad, se ordenaron los resultados de manera ascendente conforme a los valores de Ra (Figura 2.14). En estos gráficos se puede observar una relación lineal entre la rugosidad y mojabilidad, ya que las muestras con menor rugosidad (Smooth y Mech) presentaron los valores más bajos de ángulo de contacto tanto en perfil como en ADSA-D. Al mismo tiempo se puede apreciar que los valores de mojabilidad no siguen la misma tendencia que los resultados de rugosidad, lo cual es evidente en las muestras AL2, SI6 y AL6, donde los valores de rugosidad aumentan considerablemente mientras que los de mojabilidad, varían ligeramente, siendo prácticamente iguales los de SI6 y AL6 como se aprecia en la figura 2.14.

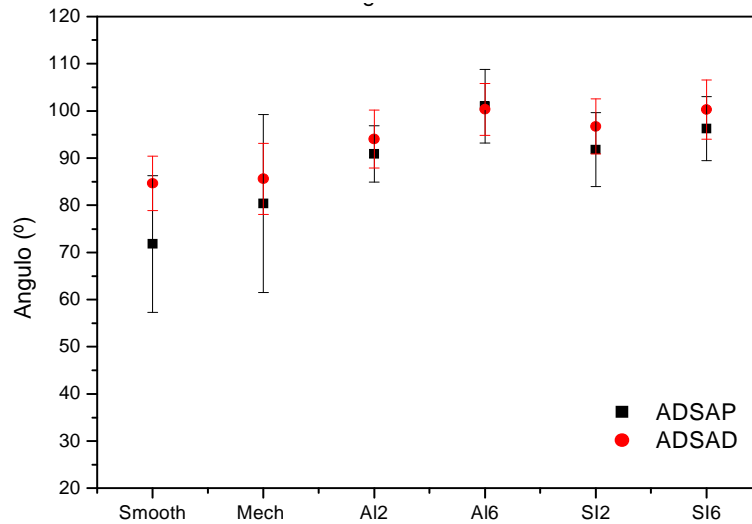


Figura 2.13. Valores de ángulo de contacto obtenidos del modo convencional (ADSA-P ó perfil) y desde cenital (ADSA-D), los cuales muestran valores de media iguales a los obtenidos desde perfil, (Smooth y Mech presentan una mayor barra de error desde perfil).

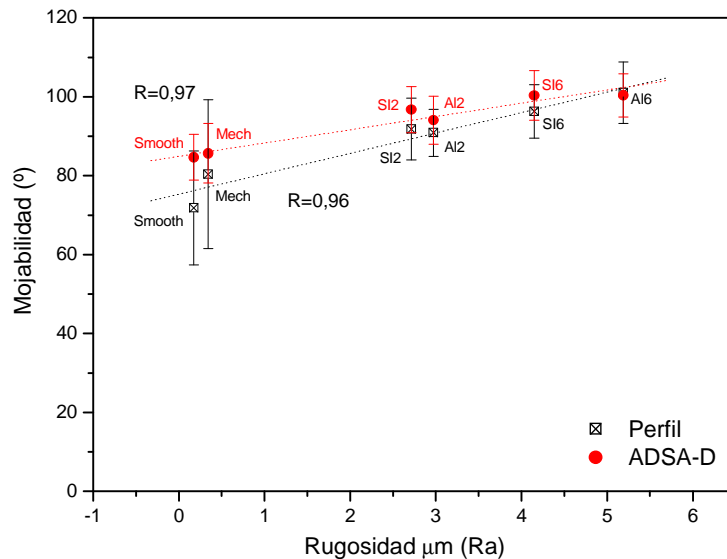


Figura 2.14. Comparación de la rugosidad (Ra) de los discos de titanio y la mojabilidad de las superficies. Aunque el ángulo de contacto aumenta en las superficies de mayor Ra, la naturaleza química de la partícula empleada para el granallado parece tener una influencia en la mojabilidad (en esta grafica sólo están representados los valores de la media de cada medición y se encuentran ordenados de menor a mayor rugosidad).

2.4.2.3. Histéresis

Los ensayos, anteriores se realizaron colocando una gota de agua sobre la superficie, pero existen detractores de esta técnica como Robbins y Joanny [ROB87] debido a la falta de homogeneidad de la superficie como se menciono anteriormente. Por lo que la evaluación de la histéresis del ángulo de contacto se realizó sobre las mismas muestras que se habían utilizado en los otros ensayos de mojabilidad, previa perforación en el centro (ver Materiales y Métodos para más detalles).

2.4.2.3.1. Angulo de avance (gota)

En estos resultados se puede apreciar varias cosas durante la adición y la extracción de líquido a la gota: 1) la variación de la forma de la gota conforme a la variación de su volumen, 2) la evolución del ángulo de contacto, 3) la variación del área de contacto. En el primer caso, la forma de la gota esta en función principalmente del volumen y del estado de equilibrio de la misma, ya que como se puede apreciar en la figura 2.15, cuando se inicia el ensayo, se observa una gota casi plana (Figura 2.15-A), pero conforme el volumen empieza a aumentar, la gota comienza a adquirir una forma más esférica (Figura 2.15-C) y conforme se empieza a extraer agua de su interior (Figura 2.15-E) cambia su forma gradualmente hasta volverse plana (Figura 2.15-F).

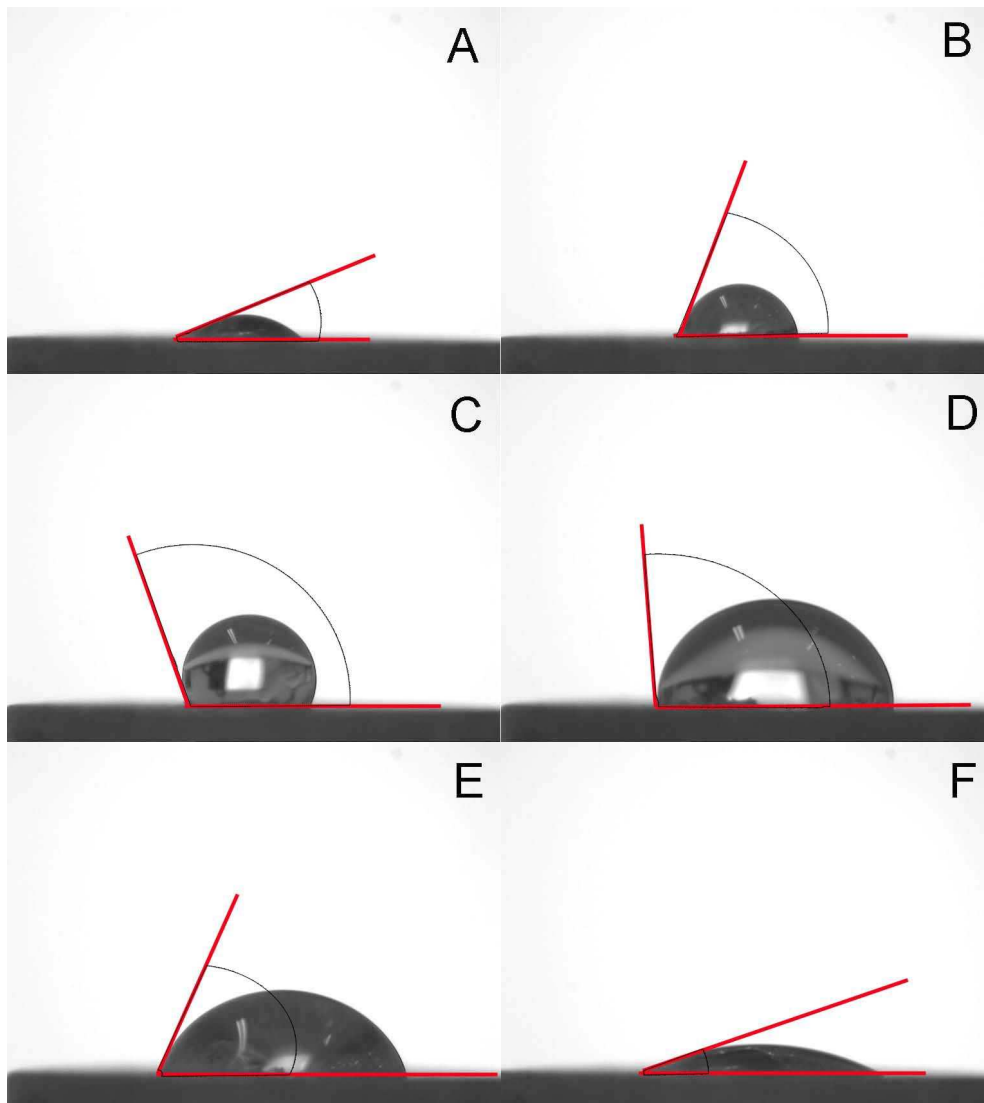


Figura 2.15. Seguimiento del avance y retroceso de la gota de agua sobre la superficie de Titanio Al2. En este caso, el área de contacto cambia conforme la gota aumenta de tamaño (A, B y C) alcanzando su máxima área (D) cuando se ha dejado de inyectar agua y mantiene esta área hasta el final de la extracción del agua. Al mismo tiempo se puede apreciar la evolución del ángulo de contacto durante todo el procedimiento.

Al mismo tiempo se obtuvieron datos de la evolución de la gota (ángulo y radio mayor) los cuales se muestran en la figura 2.16. Para poder compararlas entre si, se tomaron los valores de la media y se representan en la Figura 2.17, en la cual podemos observar que las muestras presentan la misma tendencia (excepto en la muestra Mech) siendo prácticamente igual el comportamiento del ángulo de avance tanto de Smooth como de Al6. Por otro lado, se observó que el comportamiento de la muestra Mech es completamente diferente con respecto a las demás ya que no alcanza a estabilizarse durante los 50 segundos que dura el ensayo. Y de manera general se observó que el área de contacto en todas las muestras aumentó de manera lineal mostrando la misma tendencia (Figura 2.16).

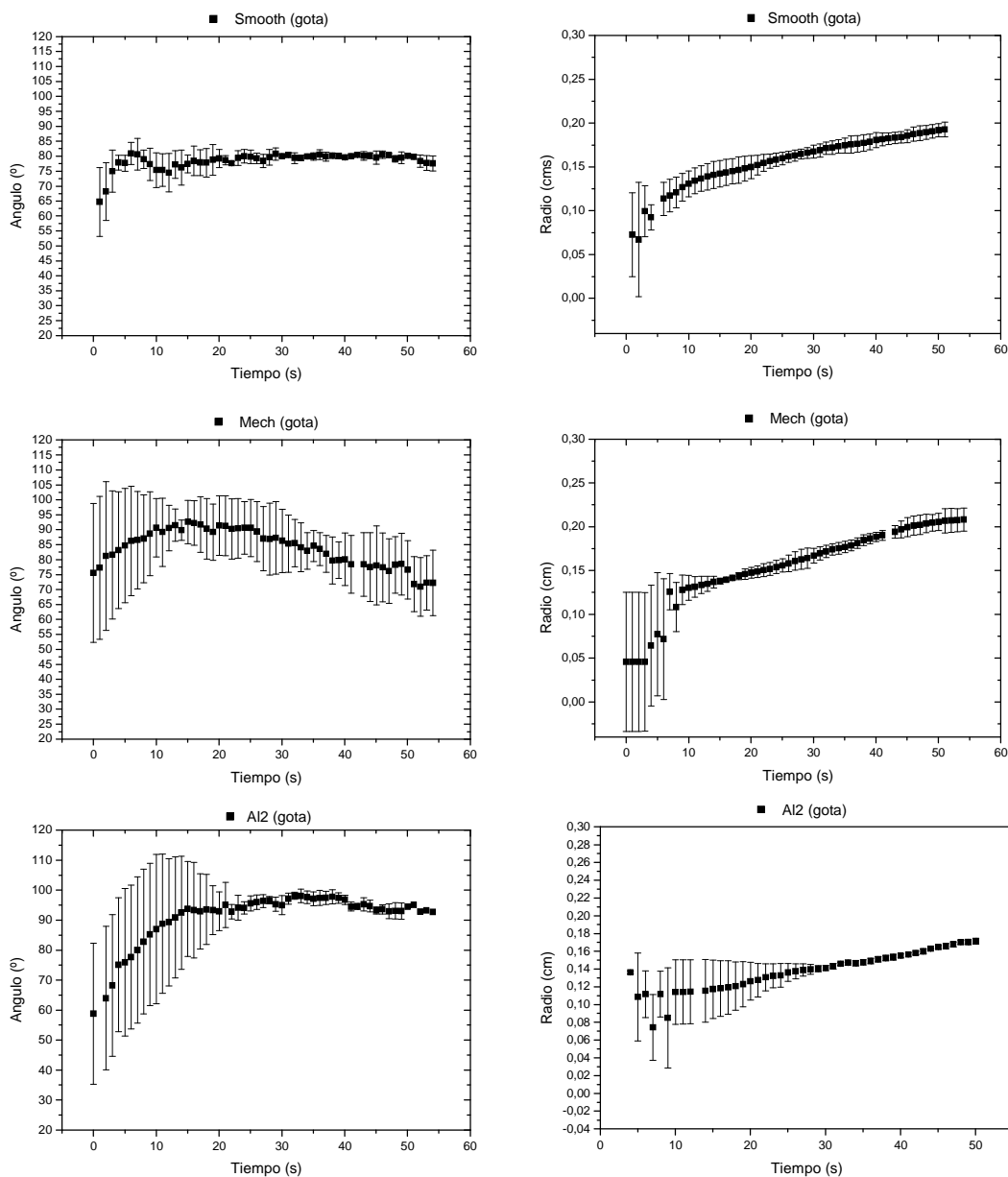


Figura 2.16 Parte 1.

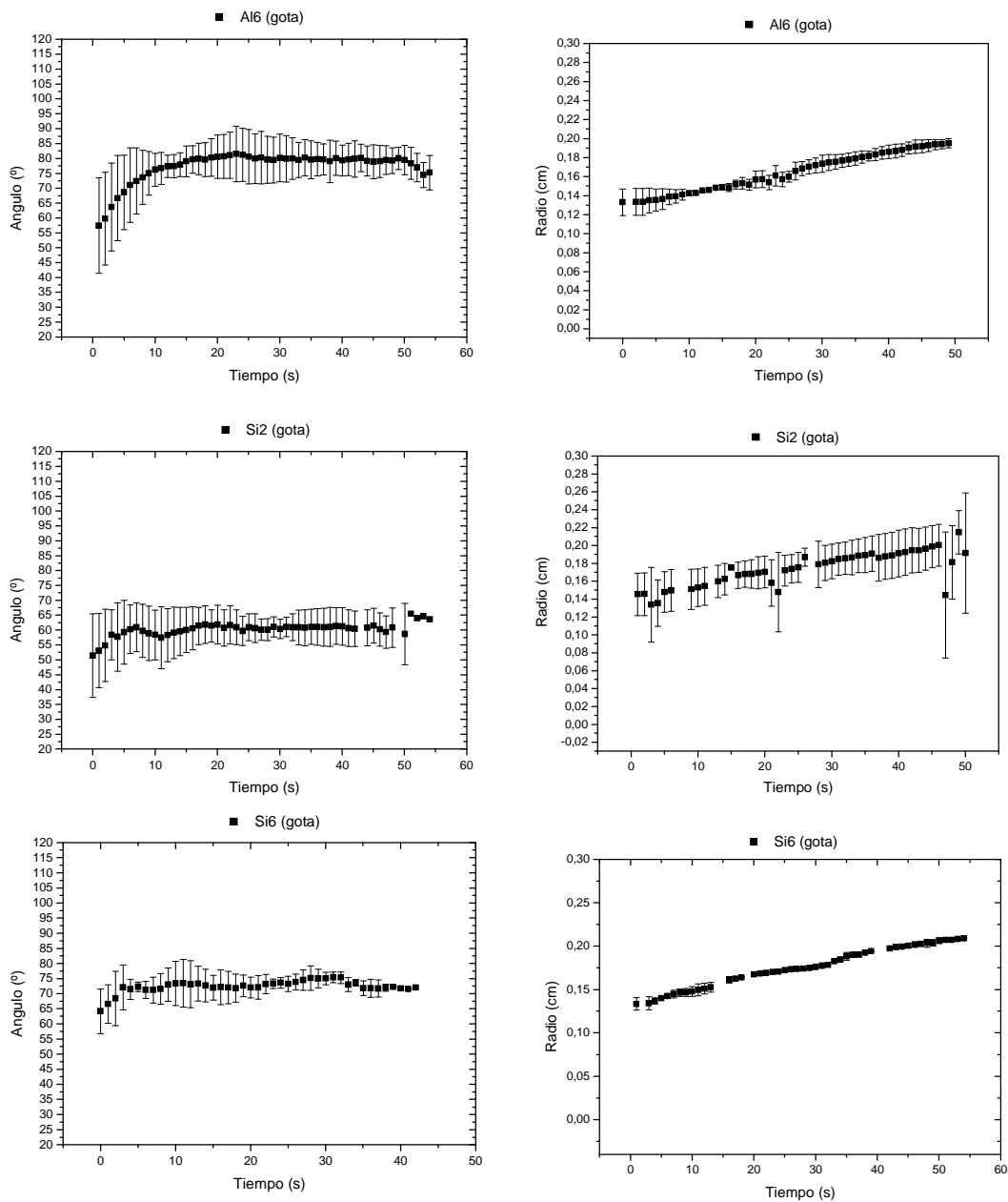


Figura 2.16. Ángulo de contacto y radio de contacto del ensayo de avance de la gota.

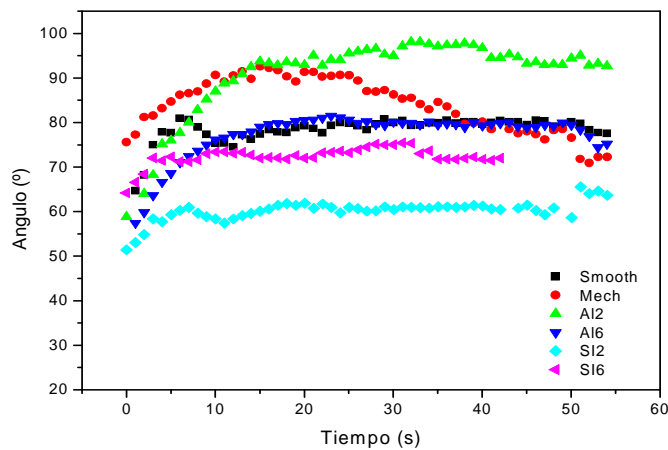


Figura 2.17. Tendencia del ángulo de avance en todas las muestras. De manera general se puede observar el mismo comportamiento en todas las muestras excepto en Mech.

2.4.2.3.2. Angulo de retroceso

Para completar el proceso de histéresis es necesario hacer crecer una gota y después extraer el agua para poder medir toda la evolución, una vez que la superficie ha sido humectada, el ángulo sólo decrecerá y el área de contacto no cambiara, debido a que la superficie ya ha sido previamente humectada.

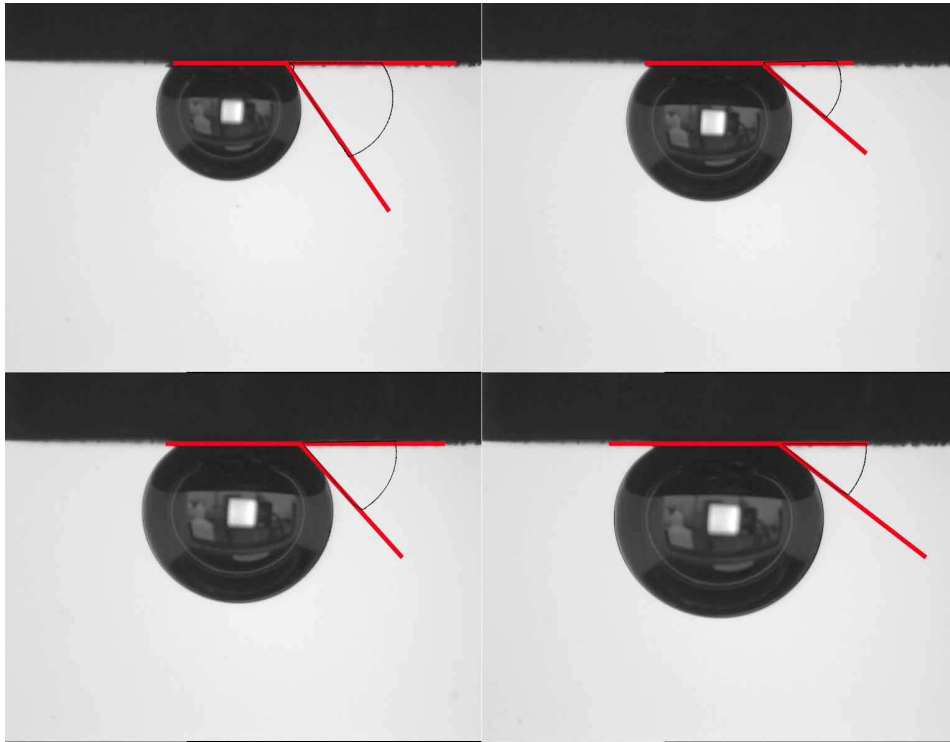


Figura 2. 18. Avance de la burbuja de aire en agua, donde se puede apreciar como el área de contacto se mantiene constante.

Para medir este ángulo se invierten los medios, por lo que en lugar de hacer crecer una gota sobre la superficie del disco al aire, se hace crecer una burbuja de aire en medio acuoso. En la figura 2.18 se muestra el avance de la burbuja (retroceso de la gota) sobre la superficie de titanio donde se indica cual es el ángulo a medir en este caso, en la imagen puede apreciarse como el ángulo decrece conforme el tamaño de la burbuja aumenta sin cambiar el área de contacto.

De la misma forma que con la gota, se realizó el seguimiento de la burbuja en todas las muestras observándose que todas las superficies mostraron el mismo comportamiento, donde el ángulo decrece en todos los casos (visible con claridad en la figura 2.20) y el área de contacto aumenta de manera lineal como se observa en la figura 2.19.

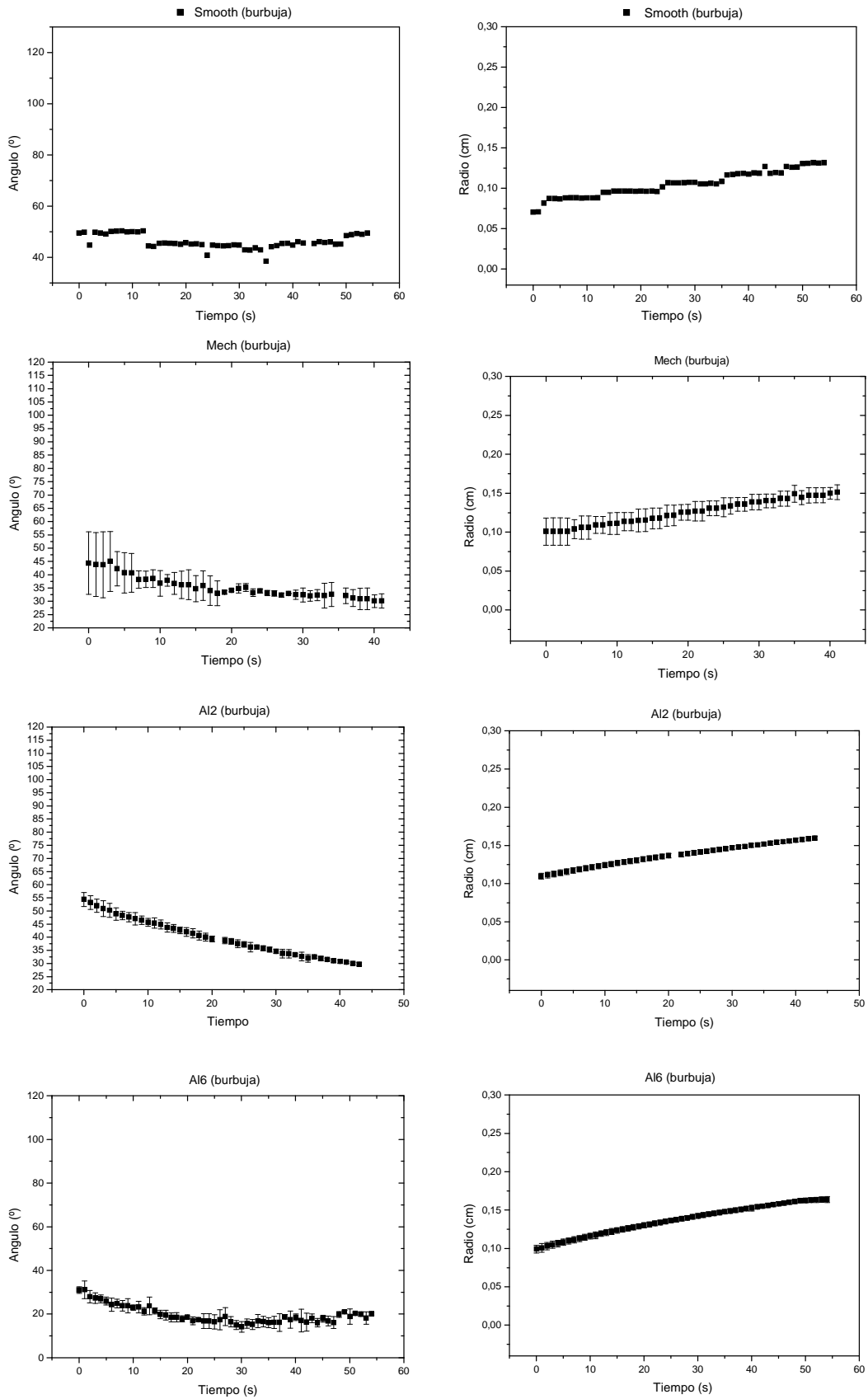


Figura 2.19 Parte 1.

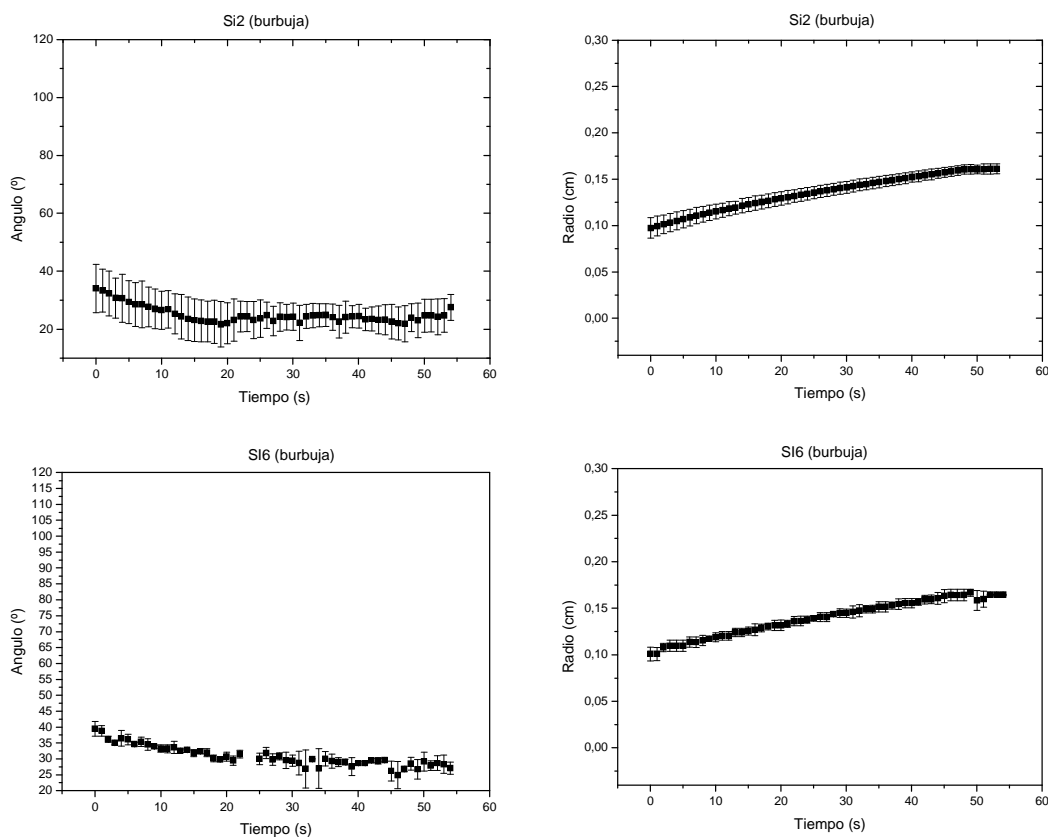


Figura 2.19. Ángulo de contacto y radio de contacto del ensayo de avance de la burbuja (retroceso de la gota).

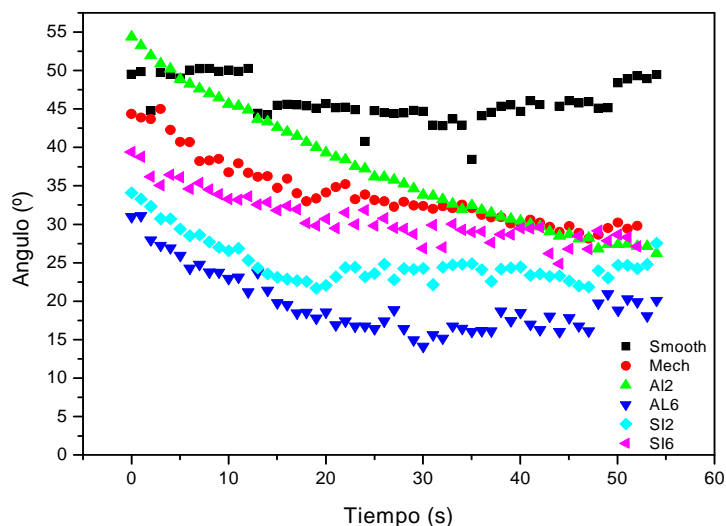


Figura 2.20. Ángulo de retroceso (avance de la burbuja) en función del tiempo.

Con estos datos se calculó el valor medio de todas las mediciones (Tabla 2.6). Los resultados mostraron que las muestras de menor rugosidad (Smooth, Mech) y Al2 presentaron ángulos similares por ADSA-D, perfil así como por avance de la gota; por otro lado las muestras Al6 Si2 y Si6, dieron un ángulo menor en los resultados de avance de la gota (Figura 2.21), mostrando unos valores de mojabilidad diferentes a los obtenidos cuando la gota sólo se colocaba sobre las superficies. Mientras que el

ángulo de contacto de retroceso del agua (o avance de la burbuja) disminuyo conforme la rugosidad aumento como se aprecia claramente en la figura 2.21.

Tabla 2.6. Valores de mojabilidad (determinada por el ángulo de contacto) de las superficies de titanio con agua, obtenidos con por las diferentes técnicas. Las diferencias significativas por cada grupo estan representadas con *.

	Angulo de Contacto (°)				
	Perfil	ADSA-D	Avance	Retroceso	Histeresis
Smooth	72 ± 14	85 ± 6	78 ± 4	46 ± 2,6	62,3
Mech	80 ± 19	86 ± 7	84 ± 12	34 ± 7	59
Al2	91 ± 6	94 ± 6	91 ± 14	37 ± 8	64
Al6	101 ± 8	100 ± 5	77 ± 8	20 ± 4,5	48,5
Sl2	92 ± 8	97 ± 6	60 ± 7*	25 ± 5,8	42,7
Sl6	96 ± 7	100 ± 6	72 ± 3	31 ± 3,7	51,5

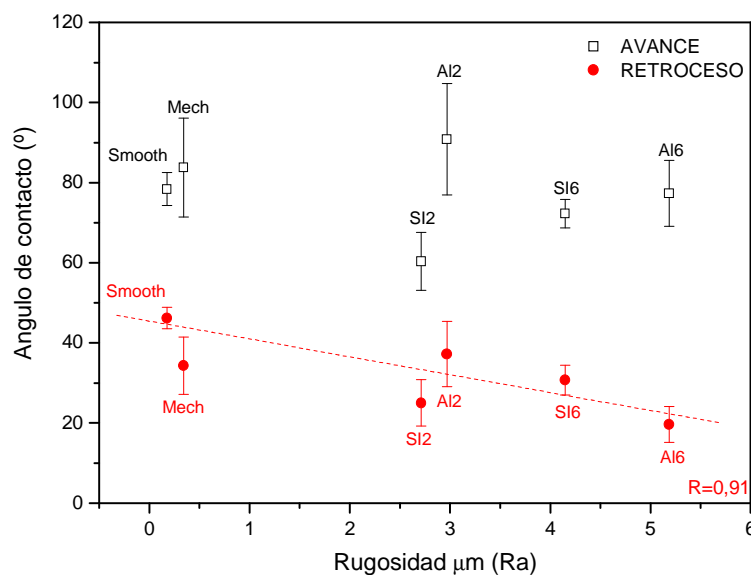


Figura 2.21. Valores de ángulo de contacto obtenidos en los ensayos de avance y retroceso (Media y su desviación estandar) graficados contra la rugosidad.

2.4.3. Energía superficial

Los resultados de los ángulos de contacto aparente con los tres líquidos (Agua, Di-iodometano y Formamida) a partir de los cuales se calculó la energía superficial (así como su componente polar y dispersiva) de los discos de titanio se muestran en las tablas 2.7 y 2.8 respectivamente. De acuerdo con el modelo de Owens y Wendt todas las superficies de titanio muestran un dominio de la componente dispersiva. En el caso de las superficies granalladas con alúmina (Al2 y Al6), la componente dispersiva fue mayor, mostrando una diferencia significativa con respecto a todas las demás superficies (Tabla 2.8). Además de esto se puede apreciar la influencia de la partícula empleada, ya que en el caso de las muestras granalladas con carburo de silicio la componente polar es mayor y al mismo tiempo la componente dispersiva es menor en

comparación con las muestras granalladas con alúmina como se puede apreciar en la figura 2.22.

Tabla 2.7. Ángulos de contacto aparentes (calculados con la ecuación de Wenzel) de los tres líquidos utilizados para el cálculo de la energía superficial.

	Angulo de Contacto Aparente (°)		
	Agua	Di-iodometano	Formamida
Smooth	77,85	44,48	62,66
Mech	83,35	47,12	65,67
Al2	91,34	33,37	67,77
Al6	66,40	16,47	56,64
Sl2	48,69	34,57	75,19
Sl6	58,56	30,12	56,75

Tabla 2.8. Valores de energía superficial (SE) de las diferentes muestras empleadas en este trabajo de tesis con su componente polar (σ_s^p) y dispersiva (σ_s^d). Las diferencias significativas están indicadas con *.

	SE (mJ/m ²)	σ_s^d (mJ/m ²)	σ_s^p (mJ/m ²)
Smooth	38 ± 3	31 ± 2	6,5 ± 0,8
Mech	36 ± 2	32 ± 3	4,6 ± 0,4
Al2	44 ± 3	43 ± 4 *	0,97 ± 0,02
Al6	47 ± 4	40 ± 4 *	8,2 ± 0,4
Sl2	41 ± 3	24 ± 4	17 ± 1
Sl6	45 ± 2	31 ± 3	14 ± 1

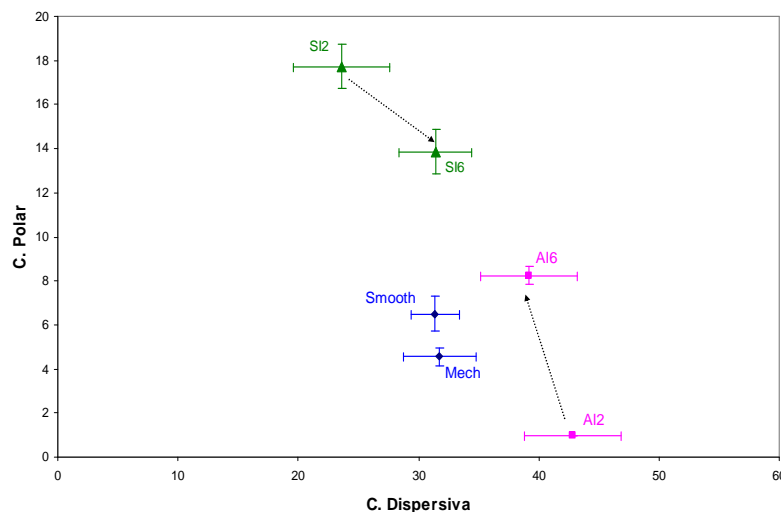


Figura 2.22. Grafica componente polar vs componente dispersiva de las diferentes superficies de titanio.

2.4.4. Caracterización biológica

El análisis morfológico de las diversas superficies de titanio muestran la forma que adoptaron los fibroblastos sobre dichas los discos de titanio, tanto en superficies precubiertas con Fibronectina, Suero y sin tratamiento previo.

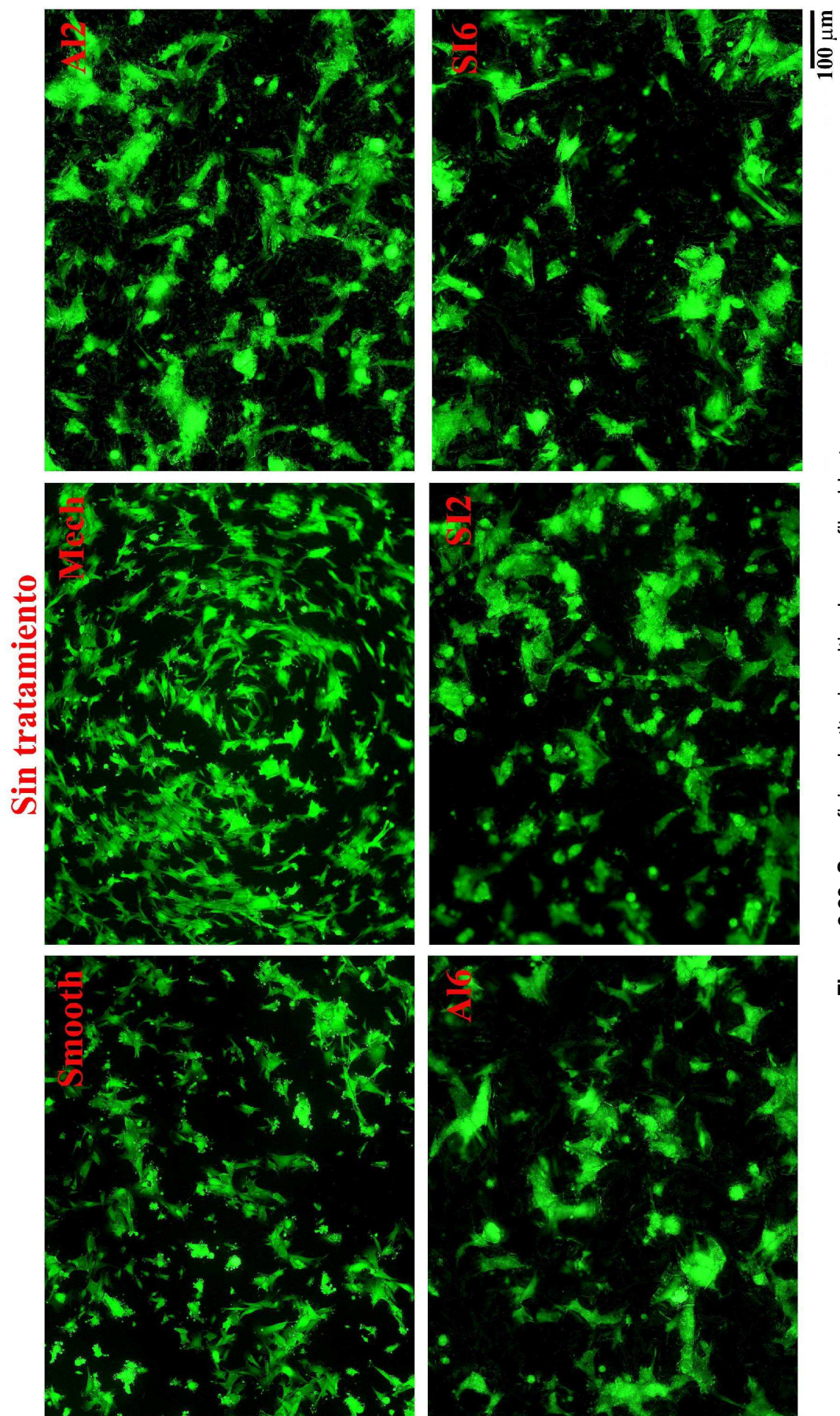


Figura 2.23. Superficies de titanio cultivadas con fibroblastos.

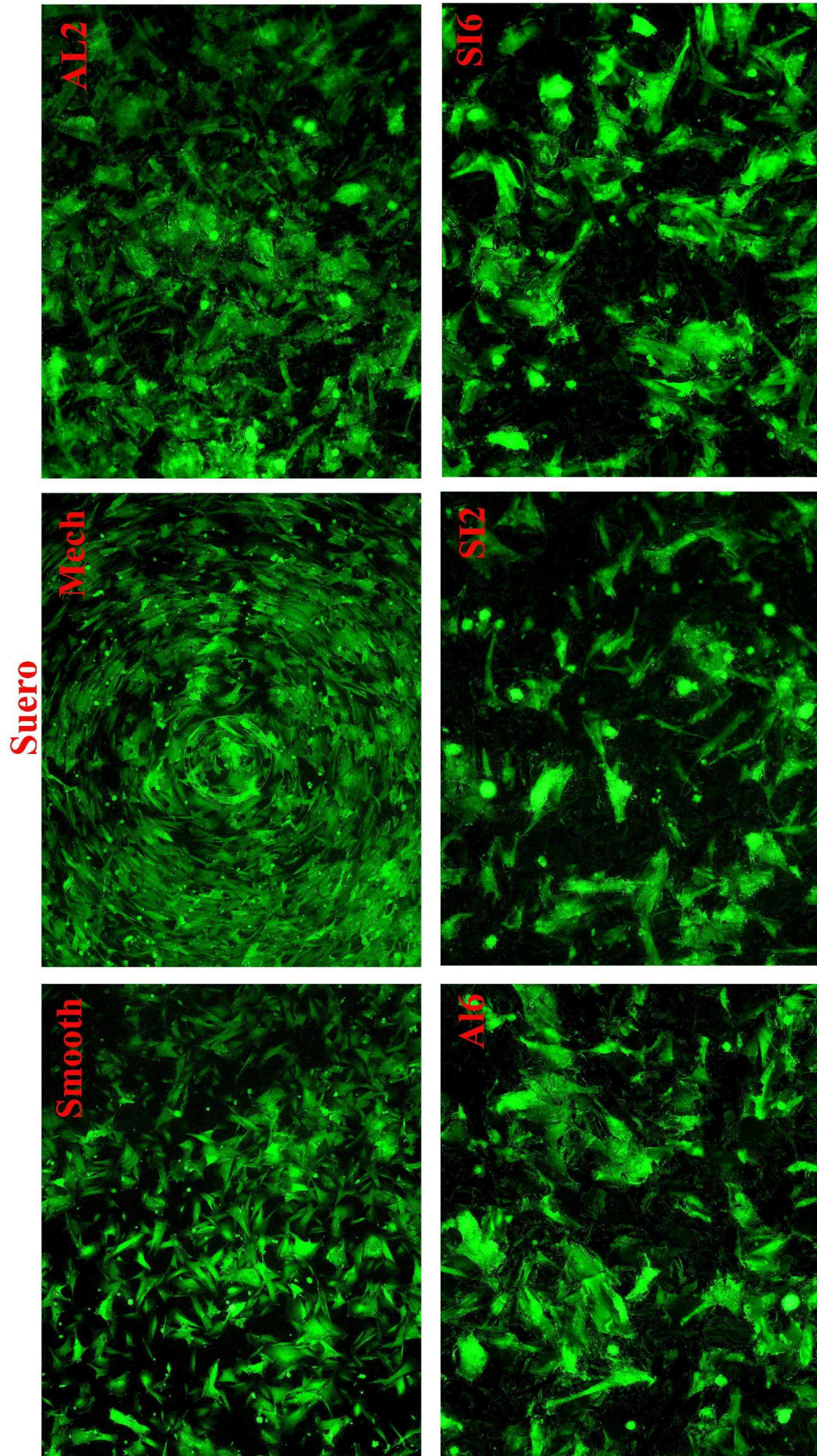


Figura 2.24. Superficies de titanio cultivadas con fibroblastos. Precubiertas con suero, donde se puede apreciar un aumento en la cantidad de células, principalmente en Mech, Smooth y AL 2. Además, en todas las superficies, la forma de las células fue más alargada.

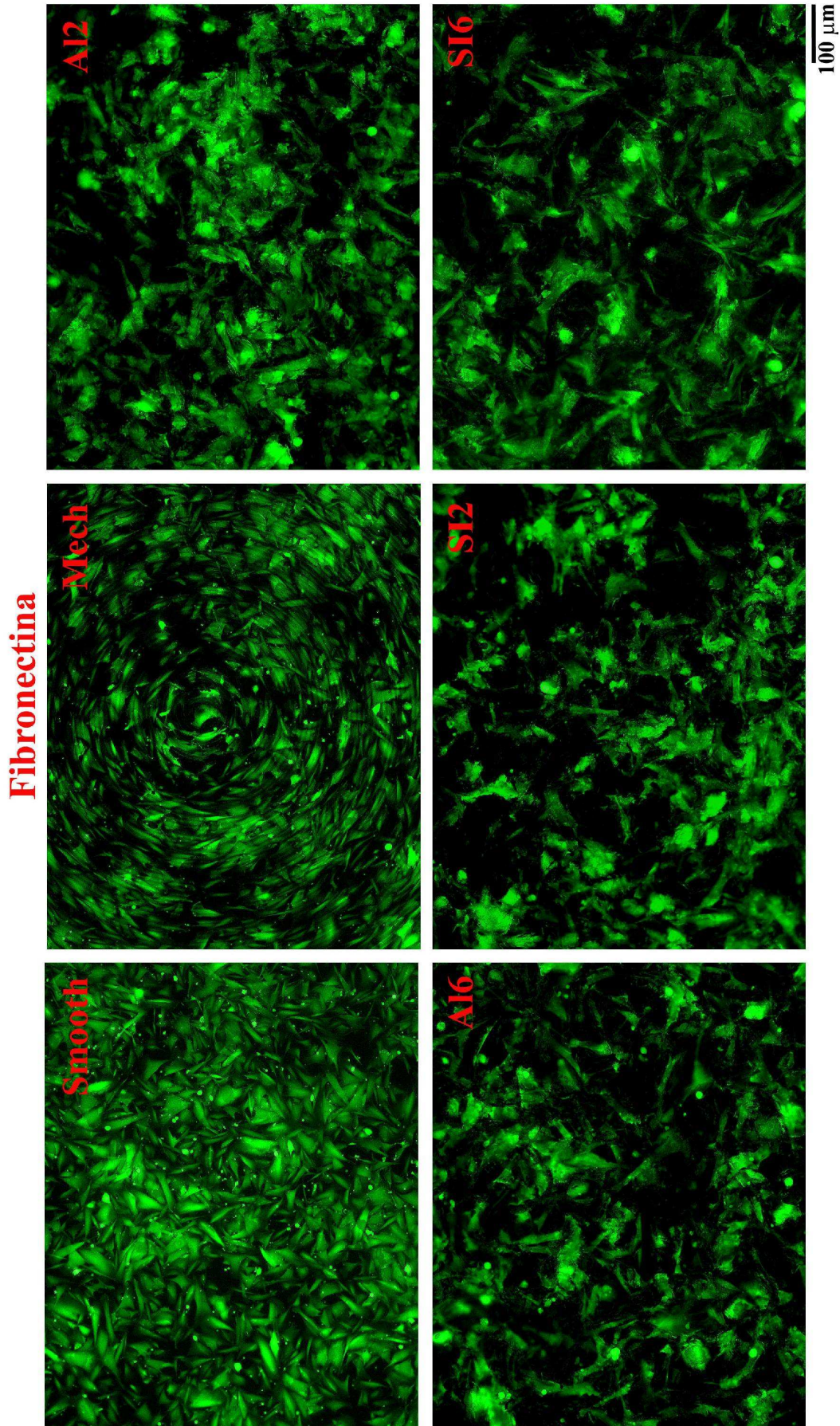


Figura 2.25. Superficies de titanio cultivadas con fibroblastos, en este caso precubiertas con fibronectina. Con este pretratamiento, se puede observar una mejor forma adoptada por las células adheridas, así como un incremento considerable, principalmente en Smooth, MEch Al2 y SI2.

La figura 2.23 muestra las diversas superficies sin pre-tratamiento, se puede observar una baja cantidad de células sobre todas las muestras, con una forma poca extendida (es decir, la mayoría con una forma esférica), excepto sobre la superficie Mech. En esta última fue posible observar que las células presentaban una forma más alargada.

Por otro lado la respuesta de los fibroblastos se vio incrementada cuando se hizo un pre-tratamiento de la superficie con suero bovino fetal (SBF), ya que comparada con las imágenes anteriores, en la figura 2.23 se puede observar que la cantidad de células aumento considerablemente en todas las superficies (excepto en SI2) y al mismo tiempo se observó una mayor extensión de los fibroblastos especialmente en la muestra Smooth, siendo en esta ultima más fácil distinguir el arreglo celular. Al mismo tiempo sobre la muestra Mech, se observó detalladamente el arreglo de los fibroblastos siguiendo la forma circular obtenida por el mecanismo de corte. Por otro lado se puede apreciar un aumento en el número de células sobre la muestra AI2 (que al mismo tiempo presentaron una forma más alargada y extendida). Mientras que en las muestras AI6 y SI6, se observó una mayor extensión de los fibroblastos comparadas con las superficies sin tratamiento previo. De manera general se puede apreciar que en el caso de las muestras granalladas con carburo de silicio (SI2 y SI6), la forma de las células fue más esférica, especialmente en SI2.

Finalmente, los resultados con el pre-tratamiento con la fibronectina se pueden observar en la figura 2.25, los cuales mostraron al igual que los resultados anteriores, un aumento considerable en la cantidad de células sobre todas las superficies de titanio. En el caso de la muestra Smooth se puede apreciar una mayor cantidad de células cubriendo casi la totalidad de la superficie (comparada con los dos casos anteriores de tanto en el pre-tratamiento con suero, como sin este), además de poder apreciarse con mayor detalle la forma extendida de los fibroblastos. De igual forma la muestra Mech presentó un mayor aumento considerable en la cantidad de células adheridas, además de que el arreglo que se había observado en las imágenes anteriores, siguiendo la forma circular de las huellas dejadas por el mecanismo de corte, fue más evidente y claro. Al mismo tiempo, las muestras granalladas con partículas de carburo de silicio, presentaron una menor cantidad de células comparadas con las granalladas con alúmina.

Se realizó un análisis semicuantitativo del porcentaje de área cubierto por células del área observada de los discos de titanio con el programa ImageJ®, con el

cual se midió el área brillante (correspondiente a los fibroblastos) contra el fondo oscuro de las fotografías. Los datos obtenidos (Tabla 2.9) se representaron vs los resultados de Rugosidad (Ra) y de Energía Superficial (total y sus componentes polar y dispersivo). En la figura 2.26 se pueden observar los resultados obtenidos del porcentaje de área cubierta por células en las superficies que no recibieron ningún pretratamiento representados vs Rugosidad (A), Energía Superficial (B), constante polar (C) y constante dispersiva (D). Los resultados muestran un porcentaje de área cubierto menor al 50% en todas las superficies, especialmente en las muestras Smooth y Si6 el porcentaje fue mucho menor (~20%), pero no se observa una tendencia en ninguno de las graficas.

Tabla 2.9. Porcentaje de área cubierta por fibroblastos sobre las diversas superficies de titanio. Los resultados se obtuvieron a partir del contraste entre las zonas fluorescentes y el resto de la superficie con el software ImageJ®. Las diferencias significativas están indicadas con *, ** y 0.

	Porcentaje de área cubierta por células		
	Sin tratamiento	Suero	Fibronectina
Smooth	18,3 ± 3,2 *	49,1 ± 7	62,5 ± 0,3
Mech	38,9 ± 4,2	60,4 ± 7**	50 ± 3,2*
Al2	39,2 ± 3,6	77 ± 8,6 *	68,2 ± 6,5
Al6	37,4 ± 3,4	42,7 ± 4,5	58,1 ± 10,3
Si2	35 ± 5,8	28 ± 1,5 0	34,7 ± 3,3**
Si6	24,1 ± 2 *	28,5 ± 2 0	30,6 ± 4,1**

Al mismo tiempo, los resultados de porcentaje de área cubierto por células en las superficies que fueron precubiertas con Suero, muestran una diferencia muy marcada en cuanto a tendencias y cantidad de área cubierta, ya que las superficies granalladas con alúmina (Al2 y Al6) presentaron una mejor respuesta, de manera general, en comparación con las superficies granalladas con carburo de silicio (Si2 y Si6). Esta tendencia se puede apreciar tanto en la figura 2.27-A como en la figura 2.27-B, donde además se puede observar como en el caso de la alúmina el aumento en la rugosidad, así como en la energía de superficie influye en el porcentaje de área cubierto por fibroblastos disminuyendo este valor. Por otro lado, cuando se representaron estos valores de área cubierta vs las constantes dispersiva (Figura 2.27-C) y polar (Figura 2.27-D) podemos observar primero, una separación entre las superficies granalladas y las no granalladas (especialmente en la Figura 2.27-C) y por otro lado, presentando un incremento exponencial en el área cubierta por células conforme aumenta la constante dispersiva en el caso de las muestras granalladas e inversamente proporcional cuando la constante polar aumentaba.

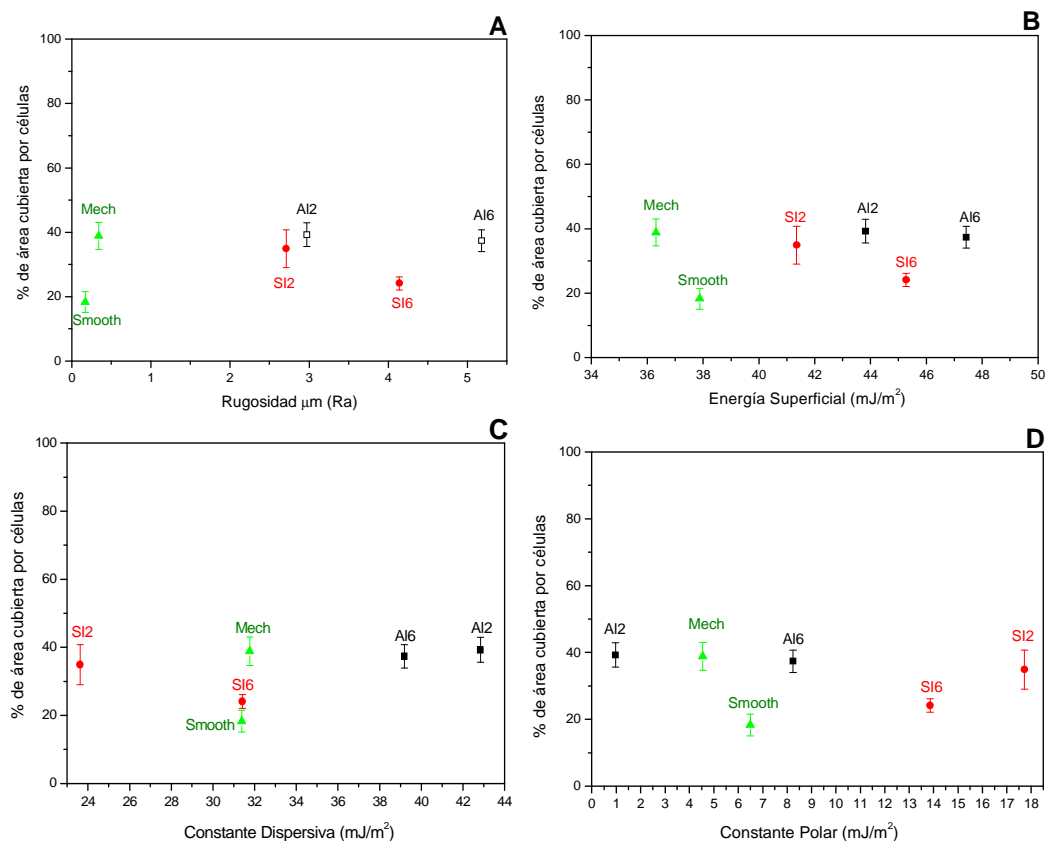


Figura 2.26. Análisis semicuantitativo del porcentaje de células adheridas sobre las seis diferentes superficies de titanio sin pre-tratamiento vs Rugosidad (A), energía superficial (B), constante dispersiva (C) y constante polar (D).

Si tomamos en cuenta sólo la partícula empleada en el granallado, podemos observar un comportamiento diferente por partícula (indicado por las flechas), ya que en el caso de las muestras granalladas con carburo de silicio ni el aumento en la rugosidad, el incremento en la energía de superficie (total, ni sus componentes dispersivas y polares), mostraron tener influencia en el porcentaje de área cubierta por células. Mientras que en las superficies granalladas con alúmina, se pudo observar (además de la influencia de la Rugosidad y Energía superficial total), un comportamiento relacionado con la constante dispersiva, ya que conforme aumenta este valor, el porcentaje de área cubierta aumento también y al mismo tiempo conforme la constante polar aumento el porcentaje de área cubierto por células disminuyó considerablemente, en este caso en particular, las muestras Mech y Smooth se ajustaron a la tendencia marcada por las superficies granalladas.

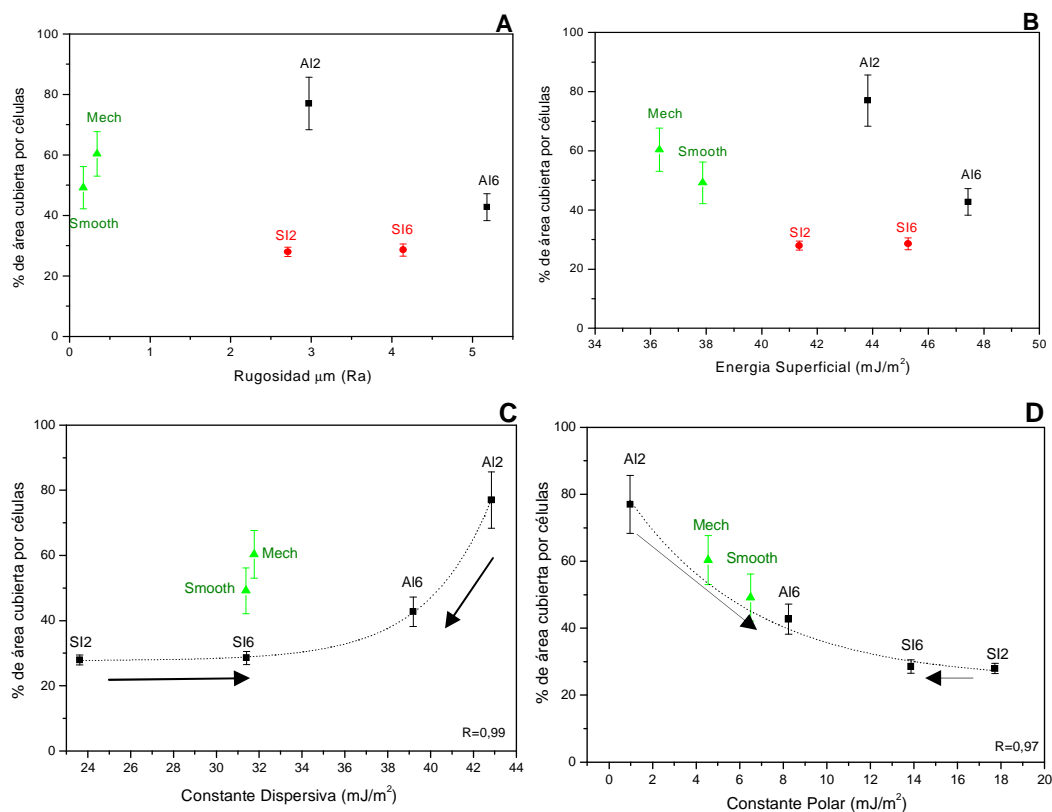


Figura 2.27. Análisis semicuantitativo del porcentaje de células adheridas sobre las seis diferentes superficies de titanio (previo tratamiento con Suero) vs Rugosidad (A), energía superficial (B), constante dispersiva (C) y constante polar (D).

Por otro lado, si observamos los resultados obtenidos en las superficies pretratadas con fibronectina (Figura 2.28), podemos observar una misma separación por partícula, como en el caso anterior, ya que las superficies granalladas con alúmina presentaron de manera general una mejor respuesta en comparación con las superficies granalladas con carburo de silicio cuando se representaron vs Rugosidad y Energía Superficial (Figura 2.28 A y B). Pero cuando estas mismas superficies fueron representadas vs constante dispersiva y polar, se observó en el primer caso (Figura 2.28-C) una tendencia similar a la observada en las superficies pretratadas con suero, denotando una separación entre las superficies granalladas y las no granalladas además de observarse una tendencia muy similar a la que presentaron estas superficies, con un incremento exponencial al aumentar la constante dispersiva y con una disminución directamente proporcional conforme la constante polar aumento, en esta última gráfica pudo observarse que la superficie Mech tuvo un comportamiento que se ajustaba a la tendencia previamente observada.

De igual forma que en la Figura 2.27, en la Figura 2.28, pudo observarse la misma tendencia por partícula, ya que en el caso de la alúmina conforme el valor de la constante dispersiva disminuye, el porcentaje de área cubierta por células también lo

hace (Figura 2.28-C) y al mismo tiempo, mientras la constante polar aumenta el porcentaje cubierto por células disminuye también (Figura 2.28-D).

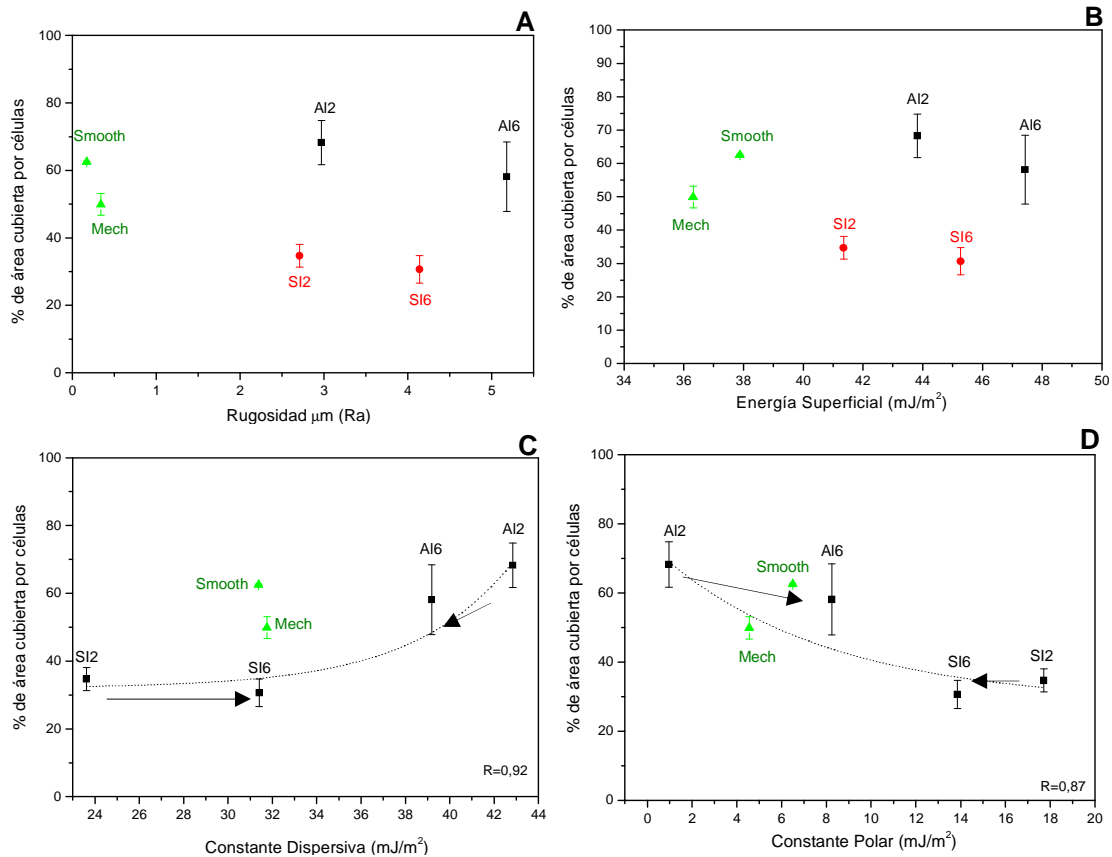


Figura 2.28. Análisis semicuantitativo del porcentaje de células adheridas sobre las seis diferentes superficies de titanio (previo tratamiento con Fibronectina) vs Rugosidad (A), energía superficial (B), constante dispersiva (C) y constante polar (D).

Por otro lado en el caso de las muestras granalladas con carburo de silicio, el aumento tanto en la constante dispersiva y polar no parece tener influencia en el comportamiento de adhesión de las células.

De forma general se pudo observar en todas las gráficas una tendencia por tratamiento, es decir partículas granalladas con carburo de silicio, granalladas con alúmina y sin granallar, de las cuales las primeras presentaron una deficiente respuesta celular.

2.5. DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis se seleccionaron las superficies que en resultados previos habían presentado una excelente respuesta en ensayos tanto con células osteoblásticas de origen humano (procedentes de cabeza de femur de pacientes sometidos a cirugía) como en ensayos de osteointegración *in vivo* con animales [APA04]. Sin embargo la respuesta de estas mismas superficies, tanto a las células que formaran el sellado biológico al entrar en contacto con la superficie del implante dental a nivel del cuello del implante, como con las bacterias que formaran la placa-dento-bacteriana no ha sido estudiado.

En este capítulo se describen de manera general, las superficies de titanio ampliamente utilizadas por los sistemas de implantes dentales, es decir, superficies rugosas con una Ra de entre 2 y 5 micrometros (parámetros que han demostrado una buena interacción con el hueso circundante) [APA04] [GSL07] [LBB98] [ANS05] [JMB04] [RCB03]. Y al mismo tiempo superficies visiblemente “lisas” obtenidas tanto por un mecanizado como por técnicas de pulido metalográfico (ambas superficies se utilizaron como un control contra adhesión de bacterias), ya que estas superficies son recomendadas para evitar la formación y maduración de placa dento-bacteriana [QVB93].

En el caso de las superficies aparentemente lisas, una observación inicial por MEB magnifico los detalles superficiales de ambas muestras ya que tanto la superficie Smooth como la muestra Mech, mostraron una ligera irregularidad. En el caso de Smooth, se pueden observar una textura y la presencia de pequeños surcos, las cuales por un lado se deben a la estructura cristalina propia del titanio (tamaño de grano) y por otro lado a las muescas dejadas por el tratamiento de mecanizado (ó corte, en este caso de los discos) lo cual es evidente en la muestra Mech, la cual presenta una serie de líneas concéntricas que a simple vista son poco evidentes.

Por otro lado, en el caso de las muestras rugosas, se observó como era de esperar, una relación directa entre el tamaño de partícula empleada para el granallado y la rugosidad obtenida como se muestra en la tabla 2.3. Al ser observadas por MEB, se apreció con claridad, las características de dichas superficies y en algunas muestras se encontró la presencia de partículas incrustadas en los discos, tanto en los granallados con alúmina como los granallados con carburo de silicio, las cuales se

encontraban formando parte de la topografía de la muestra. Los resultados de Aparicio C., mostraron que el porcentaje atómico de Al en el caso de las muestras granalladas con alúmina fue alrededor del 20% (para Al2 $18,8 \pm 2,2$ y para Al6 $22,0 \pm 1,7$), mientras que en las superficies granalladas con carburo de silicio la cantidad de silicio fue de 25% aproximadamente (para Si2 $25,5 \pm 2,0$ y para Si6 $29,9 \pm 1,8$) [APA04].

Estas muestras al ser observadas por el interferómetro (para obtener un análisis cuantitativo de la rugosidad), mostraron diferentes topografías para cada tamaño y tipo de partícula empleada para el granallado denotando diferencias marcadas en los valores de Rugosidad, lo cual es atribuido a las diferentes propiedades físicas y mecánicas de las partículas empleadas [APA04]. Esta diferencia se puede apreciar claramente, ya que las partículas de igual tamaño pero diferente naturaleza química, dieron resultados diferentes en los valores de rugosidad (y por ende en el área total) siendo la alúmina la que para ambos tamaños de partícula dejó una superficie más rugosa, comparada con el carburo de silicio. Éste hecho se debe a la abrasividad (ó dureza) de los materiales de proyección empleados.

La diferencia en la topografía y homogeneidad de la superficie, mostró tener influencia en la mojabilidad, la cual quedó reflejada en los resultados de ángulo de contacto, donde la forma que una gota adoptó sobre cada una de las superficies fue muy diferente, especialmente sobre la superficie Mech. En esta superficie fue posible observar la gran variabilidad de la forma de la gota (la mayor barra de error) con las diversas técnicas empleadas (vista cenital, ángulo de contacto del perfil y avance de la gota). Todo esto se deba quizás, a la presencia de una rugosidad periódica (los círculos concéntricos obtenidos por el mecanizado).

Al mismo tiempo los resultados de ángulo de contacto (perfil y ADSA-D) sobre las superficies granalladas muestran valores similares. Al comparar estos valores de mojabilidad vs la rugosidad, observamos que al aumentar la rugosidad la mojabilidad también aumentaba. Estas dos técnicas están recomendadas principalmente para superficies homogéneas. En nuestras superficies (las cuales han sido sometidas a un tratamiento de granallado) no es posible obtener una superficie sólo metálica (titanio), ya que muchas de las partículas empleadas en el tratamiento quedan incrustadas en la superficie generando rugosidad e irregularidades. De acuerdo con Robbins y Joanny, la heterogeneidad, que pueda estar causada por una contaminación química o por una superficie rugosa [SJT07] (en nuestro caso se encuentran ambas), ocasionando variaciones espaciales en la energía interfacial, lo que se traduce en

variaciones en el ángulo de contacto [ROB87], lo que nos llevó a realizar los ensayos de histéresis.

Los resultados de histéresis (en especial los de avance de la gota) ponen de manifiesto dicho comportamiento (variaciones en el ángulo de contacto), en especial sobre la muestra Mech, la rugosidad (periódica) formada por surcos concéntricos debido al mecanismo de corte, tiene una gran influencia en el comportamiento de la misma, ya que durante el tiempo de ensayo la gota no alcanza una estabilidad como se aprecia en la figura 2.17.

Un resultado muy importante es el comportamiento de avance de la gota, ya que tanto la muestra Smooth como Al6 presentaron el mismo comportamiento en el avance de la gota e incluso con valores muy similares. Este resultado es difícil de interpretar ya que ambas muestras son muy diferentes, por un lado la muestra Smooth que presenta una superficie más homogénea (debido a su baja rugosidad y la ausencia de partículas de diferente naturaleza química) y por el otro Al6 presenta la superficie más heterogénea (es decir la mayor rugosidad y la presencia de partículas de alúmina en la superficie). Es claro que existe una influencia de la presencia de la partícula empleada para el granallado en el comportamiento de avance de la gota sobre la superficie, pero por el momento no es fácil distinguir si quizás se debe a las tensiones residuales presentes en el titanio debido a la deformación causada por la proyección de las partículas o a la presencia de estas partículas.

Al comparar todos los resultados de mojabilidad analizados en este trabajo, podemos decir que debido a las diferencias entre cada técnica (siendo más evidente en las muestras Al6, SI2 y SI6) la rugosidad juega un papel muy importante en la mojabilidad de las superficies, pero además la falta de homogeneidad (en este caso la presencia de alúmina y carburo de silicio) son trascendentales en dicho comportamiento y que el sólo colocar la gota sobre la superficie para medir el ángulo de contacto, se asemeja más al ángulo de avance que al ángulo de equilibrio (que sería la media entre el ángulo de avance y el de retroceso).

Una vez obtenidos los resultados de mojabilidad, se procedió a calcular la energía superficial de nuestras muestras, para lo cual se siguió el procedimiento descrito por Wenzel [WEN36] para calcular el ángulo de contacto aparente a partir de los ángulos tomados al inicio. Para esto se utilizaron los datos de avance de la gota, mientras que los datos del di-iodometano y la formamida empleados fueron los

obtenidos desde perfil, ya que en ambos casos, estos datos cumplían la condición de ser menores a 90° (indicando una superficie totalmente humectada por el líquido.)

Los resultados de energía superficial mostraron varios comportamientos. El primero asociado al tipo de superficie ya que en las muestras más lisas, los valores de Energía Superficial fueron prácticamente iguales sin diferencias significativas. Por otro lado, se vio que la componente dispersiva fue el valor predominante en todas las superficies, comparada con los valores de la componente polar, quizás debido a que en las superficies granalladas la cantidad de partícula se encuentra alrededor del 20% y que en el titanio (tanto en Smooth como en Mech) la componente dispersiva es la que predomina.

Cabe mencionar que el tipo de partícula empleado en el proceso de granallado para el aumento de la rugosidad, muestra una influencia en la energía superficial por tipo de partícula, ya que pueden observarse diferentes tendencias en la figura 2.22, donde si observamos en primer lugar las muestras no granalladas (Smooth y Mech), los valores de la constante dispersiva de ambas superficies son iguales, por otro lado la componente polar aumenta conforme disminuye la rugosidad (de 4,6 a 6,5 mJ/m^2). Al mismo tiempo, en las muestras granalladas con carburo de silicio, se observó como la componente dispersiva aumentaba ($24 \pm 4 \text{ mJ/m}^2$ para SI2 y $31 \pm 3 \text{ mJ/m}^2$ para SI6) conforme la constante polar disminuía ($17 \pm 1 \text{ mJ/m}^2$ para SI2 y $14 \pm 1 \text{ mJ/m}^2$ para SI6), denotando al mismo tiempo una tendencia marcada por la rugosidad (o el tamaño de partícula), ya que conforme aumentó este valor, se observó un incremento en la constante dispersiva y una disminución en la constante polar, siendo estos los valores más altos en comparación con todas las demás superficies. Por otro lado, al analizar el comportamiento de las superficies granalladas con alúmina, se observó que estas superficies presentaron los valores en la constante dispersiva superior a todas las demás superficies e iguales entre sí ($43 \pm 4 \text{ mJ/m}^2$ para AI2 y $40 \pm 4 \text{ mJ/m}^2$ para AI6); y al mismo tiempo los valores de la constante polar denotaron una influencia asociada a la rugosidad, ya que conforme este valor aumento la constante polar lo hizo también. Esto puede deberse a la cantidad de material incrustado sobre la superficie y/o el tamaño de las partículas que se encuentren formando parte de la topografía.

Quizás el comportamiento de un líquido, no sea muy significativo cuando se habla de biomateriales, ya que aunque el medio interno (o biológico) es 95% agua, disueltos y mezclados con esta, se encuentran un gran número de iones, moléculas,

nutrientes, enzimas, proteínas, péptidos, células, etc., que son los responsables de la aceptación o rechazo del aditamento implantado. Por lo que una caracterización previa con células será un mejor indicativo de la influencia que puedan tener en su respuesta las características de superficie.

El análisis semicuantitativo del porcentaje de células adheridas sobre la superficie, mostró la influencia de estas propiedades en cuanto a la respuesta celular sólo en las superficies que previamente fueron pre-tratadas tanto por fibronectina como por suero, mientras que en las que no recibieron pretratamiento la respuesta celular de adhesión a dos horas no denota ninguna tendencia. Cuando las superficies fueron pre-tratadas con suero y fibronectina, pudo observarse primero un incremento en el porcentaje de área cubierta por células en todas las superficies de titanio en comparación con las que no tuvieron ningún precubrimiento, en segundo lugar pudo observarse una separación por tipo de tratamiento de la superficie, es decir granalladas con alúmina, granalladas con carburo de silicio y no granalladas (Smooth y Mech) tanto en las pre-tratadas con suero, como en las pre-tratadas con fibronectina.

En las primeras (las pre-tratadas con suero), se puede observar como en el caso de las superficies granalladas con alúmina la rugosidad juega un papel importante, ya que conforme este valor aumenta, el porcentaje de células adheridas disminuye. Quizás esta "disminución se deba a que en la figura 2.24, pudo observarse una gran cantidad de células con forma esférica (es decir adheridas, pero que no se había extendido sobre la superficie). Mientras que en las muestras granalladas con carburo de silicio, no se observó influencia alguna en cuanto a la rugosidad. Finalmente en las superficies no granalladas, el incremento en la rugosidad, denotó un aumento en el porcentaje de área cubierto por células, las cuales al mismo tiempo mostraron una respuesta a la forma de la superficie, el cual se aprecia claramente en la superficie Mech, lo cual corresponde con lo dicho por Eisenbarth [EMN96] en la que la respuesta celular estará influenciada no sólo por un incremento en la rugosidad, sino también por la morfología que esta presente.

Cuando estos datos se representaron vs energía superficial (total), se aprecia claramente la misma separación en cuanto al tipo de tratamiento. Tanto en las superficies granalladas con alúmina como en las superficies no granalladas, pudo observarse como el porcentaje de células adheridas disminuyó conforme el valor de la energía superficial aumenta, mientras que las superficies granalladas con carburo de silicio, no mostraron ninguna tendencia. Cuando estos mismos datos se representan

vs la componente dispersiva pudo observarse una división entre superficies no granalladas como granalladas, donde estas últimas mostraron un incremento exponencial en el porcentaje de área cubierta por células conforme la constante dispersiva aumentaba. En este caso, también pudo observarse una tendencia por partículas, ya que en el caso de las granalladas con alúmina, conforme esta constatare aumento el porcentaje de área también lo hizo.

Es importante puntualizar la tendencia opuesta que se observa asociada al tipo de partícula, ya que por un lado la presencia de carburo de silicio, parece tener una influencia negativa en cuanto a la respuesta celular, ya que aunque la rugosidad es mayor (es decir hay una mayor área) el porcentaje de células es menor que las superficies que presentaron valores de rugosidad similar e incluso que Smooth y Mech, que además presentaron valores de la constante dispersiva muy similar que estas últimas. Y por el otro lado, la tendencia negativa que se observa con las superficies granalladas con alúmina (indicada por las flechas).

Por otro lado cuando los porcentajes de adhesión se representaron vs la constante polar, se observó también una tendencia exponencial (pero en este caso negativa) conforme esta constante aumentaba; y aunque las superficies fueron separadas por granalladas y no granalladas, todas las superficies se ajustaban a esta tendencia. De igual forma que en el caso anterior, pudo observarse una tendencia asociada al tipo de tratamiento, en el cual las superficies granalladas con carburo de silicio estuvieron separadas del resto de muestras, presentado valores de constante polar mayores y al mismo tiempo con un bajo porcentaje de células adheridas a la superficie.

Finalmente, las superficies que fueron pre-tratadas con fibronectina, mostraron la misma tendencia por partícula que en las muestras anteriores (tanto vs rugosidad como vs energía superficial), donde las superficies granalladas con alúmina presentaron una mayor área cubierta por células que las granalladas con carburo de silicio. Al mismo tiempo pudo observarse que el tamaño de partícula no mostró diferencias entre tipos de partículas, ya que la cantidad de área nominal cubierta por células fue igual en los dos tipos de superficies granallados con alúmina. Y lo mismo pudo observarse con las superficies granalladas con carburo de silicio, ya que los valores fueron prácticamente iguales en ambos casos.

Por otro lado, cuando al representar estos mismos porcentajes vs la constante dispersiva y polar, se observó el mismo comportamiento anteriormente descrito pero con las superficies pre-tratadas con suero, en las cuales en primer lugar se observó la misma diferencia entre superficies no granalladas (Smooth y Mech) y granalladas (tanto con alúmina como con carburo de silicio), siendo estas últimas las que presentaron un incremento exponencial en el porcentaje de área cubierto por células conforme el valor de la constante dispersiva aumento. Similar a los resultados anteriores, el uso del carburo de silicio en el aumento de la rugosidad superficial parece tener un efecto negativo en cuanto a la respuesta celular, ya que el porcentaje de área cubierta fue menor que el resto de las superficies e incluso menor que las superficies no-granalladas. Esto es muy evidente cuando se comparan las muestras Smooth, Mech y SI6, las cuales presentaron un valor de constante dispersiva muy similar, pero porcentajes de adhesión totalmente diferentes. Por último al graficar estos datos vs constante polar, se observó la misma tendencia exponencial negativa obtenida con las superficies pre-tratadas con suero, denotando una disminución en el porcentaje de área cubierto por células conforme la constante polar aumento (siendo las superficies granalladas con carburo de silicio, las que presentaron la menor cantidad de superficie cubierta por células, y al mismo tiempo los mayores valores de la constante polar de todas las superficies).

En el caso de las superficies pre-tratadas con fibronectina, la superficie Smooth parece ser la más favorecida por este tratamiento, ya que los resultados mostraron un incremento considerable en la cantidad de área cubierta por células (Figura 2.29) como en la forma y el esparcimiento de las células sobre esta superficie (Figura 2.26).

Nuestros resultados son contrarios a los observados por Redey y colaboradores [RNB00] es su trabajo realizado con osteoblastos humanos sobre hidroxiapatita. Ellos concluyen que el aumentar la componente polar de la energía superficial de un material promovera la adhesión inicial y la proliferación celular, lo que finalmente guiara a una mejor y mayor formación de matriz osteoide. Mientras que nuestros resultados muestran que al aumentar el valor de la constante polar, el porcentaje de área cubierta por células disminuye, esto quizás a que la respuesta de los fibroblastos sea diferente a la de los osteoblastos por un lado y por el otro, a que se trata de distintos materiales.

Por otro lado, la diferencia observada en cuanto al tipo de tratamiento previo en cada superficie se debe a que los fibroblastos son quimioatraídos con otros

componentes del suero (como las alpha, beta y gamma globulinas), por ejemplo entre las alpha globulinas tenemos al factor plaquetario 4 (PF4) el cual es altamente quimioatrayente de los fibroblastos, al igual que la beta-tromboglobulina [SGH83], de ahí que la respuesta in vitro observada cuando la superficie fue pretratado con suero sea diferente a la pretratada unicamente con fibronectina.

2.6. CONCLUSIONES

Las conclusiones de este capítulo son:

- La presencia de partículas (alúmina y carburo de silicio) empleadas para el granallado que forman parte de la topografía de las muestras, influyen en las propiedades superficiales de los discos de titanio, tales como mojabilidad y energía superficial (específicamente en sus componentes polar y dispersiva). En el caso de las superficies granalladas con carburo de silicio la constante polar fue el valor que se vió modificado en comparación con las muestras Smooth y Mech (homogeneas en su composición), mientras que en las muestras granalladas con alúmina, el efecto de estas partículas se observó al aumentar la constante dispersiva.
- La influencia de estas partículas en las propiedades de superficie de los discos de titanio se reflejaron claramente en la respuesta de adhesión inicial de los fibroblastos, especialmente cuando las superficies fueron pre-tratadas tanto con Suero como con Fibronectina. Ya que, por un lado se pudo observar una diferencia en cuanto al tipo de tratamiento, en las cuales las superficies granalladas con alúmina presentaron la mejor respuesta de adhesión inicial de los fibroblastos comparadas con las superficies granalladas con carburo de silicio.
- El aumento en el porcentaje de área cubierta por los fibroblastos se vió directamente relacionada con el incremento en la constante dispersiva de las diferentes superficies de titanio, en las cuales las superficies granalladas con alúmina presentaron por un lado, la mayor cantidad de células adheridas y por otro lado los mayores valores de esta constante, especialmente en la superficie Al2.

2.7. REFERENCIAS

- [ABN02] Anselme K., Bigerelle M., Noël B., Iost A., Hardouin P., Effect of grooves titanium substratum on human osteoblastic cell growth. *Journal on Biomedical Materials Research* 60 (2002) 529-540.
- [AGU04] Aguilar Mendoza José Arturo. *Caracterización Superficial y evaluación de la eficacia de los adhesivos autograbadores en dentina*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, 2004.
- [AGP00] Aparicio C., Gil F.J., Peraire C., Padròs A., Planell J.A. Abstract Booklet titanium 99 Vol. II I.V. Gorynin S.S. Ushkov ed ISBN 5-900791-06-8, Pp. 1207-1210. Saint Petersburg, Russia 2000.
- [APA04] Aparicio Badenas Conrado. Tratamientos de superficies sobre Titanio comercialmente puro para la mejora de la osteointegración de los implantes dentales. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Cataluña, Barcelona España, 2004
- [ANS05] Anselme K., Bigerelle M., Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion. *Acta Biomaterialia* 1 (2005) 211-222.
- [BAS92] Bashforth F. and Adams J.C., "An attempt to Test the theory of capillary action" Cambridge, 1892.
- [BLE91] Berglundh T., Lindhe J., Ericsson I., Marinello C.P., Liljenberg B. And Thomsen P. The soft tissue barrier at implants and teeth, *Clinical Oral Implants Research*, 1991: 21: 81-90.
- [BMJ96] Bordji K., Jouzeau J.Y., Mainard D., Payan E., Netter P., RieS K. T., Stucky T. and Hage-Alis M., Cytocompatibility of Ti-6Al4V and Ti-5Al-2.5Fe alloys according to three surface treatments, using human fibroblasts and osteoblasts. *Biomaterials* 17 (1996) 929-940.
- [BOJ07] Barbour Michele E., O'Sullivan Dominic J., Jenkinson Howard F., Jagger Daryll C. The effects of polishing methods on surface morphology, roughness and bacterial colonisation of titanium abutments. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2007 18: 1439-1447.
- [BWM88] Bharat Bhushan, Wyatt James C., Meiling John, A new three-dimensional non-contact digital optical profiler. *Wear* 122 (1988) 301-312.
- [BWM05] Bruckmann C., Walboomers F., Matsuzaka K., Jansen J., Periodontal ligament and gingival fibroblasts adhesion to dentin-like textured surfaces. *Biomaterials* 26 (2005) 339-346.
- [CAS44] Cassie A. and Baxter S., Wettability of porous surfaces. *Transactions of Faraday Society* (1944) 546-551.
- [CSL02] Chou A., Sae-Lim V., Lim T., Schantz J., Teoh S., Chew C., Hutmacher D., Culturing and characterization of human periodontal ligament fibroblasts-a preliminary study. *Materials Science and Engineering C* 20 (2002) 77-83.
- [DAT] Dataphysics, Surface Chemistry. "Introduction into Methods of Measuring and Analyzing Contact Angles for the Determination of Surface Free Energies of Solids".
- [DBB07] Kakoli Das, Susmita Bose, Amit Bandyopadhyay, Surface modifications and cell-materials interactions with anodized Ti. *Acta Biomaterialia* 3 (2007) 573-585.
- [DBD99] Degasne I., Basle M., Demais V., Huré G., Lesourd M., Grolleau B., Mercier L., Chappard D., Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading and proliferation of human osteoblast-like cells (SaOS2) on titanium surfaces. *Calcified Tissue International* (64 (1999) 499-507.

- [DCS07] Díaz C., Cortizo M.C., Schilardi P.L., Gómez de Saravia S.G. Influence of the Nano-micro Structured of the surface on bacterial adhesion. *Materials Research* 2007 10: 11-14.
- [DEL97] del Rio O.I. and Neumann A. W., Axisymmetric drop Shape Analysis: Computational Methods for the Measurement of Interfacial Properties from the shape and dimensions of pendant and sessile drops. *Journal of colloid and interface science*, 196 (1997) 136-147.
- [ELB02] Eisenbarth E., Linez P., Biehl V., Velten D., Breme J., Hildebrand H.F., *Cell orientation and cytoskeleton organisation on ground titanium surfaces*. *Biomolecular Engineering* 19 (2002) 233-237.
- [EMN96] Eisenbarth E., Meyle J., Nachtigall W. and Breme J., *Influence of the surface structure of titanium materials on the adhesion of fibroblasts*. *Biomaterials* 17 (1996) 1399-1403.
- [FTN06] Faucheux N., Tzoneva R., Nagel M-D., Groth T., The dependence of fibrillar adhesion in human fibroblasts on substratum chemistry. *Biomaterials* 27 (2006) 234-245.
- [FVU05] Figueiredo C.H., Vidigal G., de Uzeda M., de Almeida G. Influence of titanium surface roughness on attachment of *Streptococcus sanguis*: an in Vitro study. *Implant Dentistry* 2005 14: 88-93.
- [FWY03] Feng B., Weng J., Yang B.C., Qu S.X., Zhang X.D. Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast, *Biomaterials* 24 (2003) 4663-4670.
- [GEA06] Gea Jódar Pedro Manuel, Mojado en condiciones de no-equilibrio sobre superficies reales. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, 2006.
- [GEI00] Geißler U., Hempel U., Wolf C., Scharnweber D., Worch H., Wenzel K.-W., *Collagen type I-coating of Ti6Al4V promotes adhesion of osteoblasts*. *J Biomed Mater Res* (2000) 51:752-60.
- [GND02] Groessner-Schreiber B., Neubert A., Müller W., Hopp M., Griepentrog M., Lange K., Fibroblast growth on surface-modified dental implants: An in vitro study. *Journal of Biomedical Materials Research* 64 A (2003) 591-599.
- [GSL07] Le Guéhennec L., Soueidan A., Layrolle P., Amouriq Y., Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental Materials* 23 (2007) 844-854.
- [GWO61] Gargiulo A.W., Wentz F. and Orban B. (1961) Dimensions and relations of the dentogingival junction in humans. *Journal of Periodontology* 32, 261-267.
- [HOL02] Holgado Terriza, J. A. Medida de las magnitudes dinámicas por análisis de interfases curvas Universidad de Granada. *Tesis Doctoral* 2002.
- [JMB04] Jayaraman Mythili, Meyer Ulrich, Bühner Martin, Joos Ulrich, Wiesmann Hans-Peter. Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* 25 (2004) 625-631.
- [LBB98] Lincks J., Boyan B.D., Blanchard C.R., Lohmann C.H., Cochran D.L., Dean D.D. and Schwartz. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials* 19 (1998) 2219-2232.
- [LLB05] Lüthen Frank, Lange Regina, Becker Petra, Rychly Joachim, Beck Ulrich, Barbara Nebe J.G. *The influence of surface roughness of titanium on β 1 and β 3-intergrin adhesion and the organization of fibronectin in human osteoblastic cells*. *Biomaterials* 26 (2005) 2423-2440.
- [LOS01] Lim Young Jun and Yoshiri Oshida. Initial contact angle measurements on variously treated dental/medical titanium materials. *Bio-Medical Materials and Engineering* 11 (2001) 325-341.

- [MAK84] Makosh G., Drollinger B. Surface profile measurement with a scanning differential ac interferometer. *Applied Optics*. 1984: 23 4544-4553.
- [MSH98] Mustafa K., Silva B., Hultenby K., Wennerberg A., Arvidson A., Attachment and proliferation of human oral fibroblasts to titanium surfaces blasted with TiO₂ particles. *Clinical Oral Implants Research* 9 (1998) 195-207.
- [MSH05] Mao Y., Schwarzbauer J., Fibronectina fibrillogenesis, a cell mediated matrix assembly process. *Matrix Biology* 24 (2005) 389-399.
- [PEW03] Padbury Allan, Eber Robert Jr. and Wang Hom-Lay. Interactions between the gingiva and the margin of restorations. *Journal of Clinical Periodontology*, 2003; 30: 379-385.
- [PRJ03] Ponsonnet L., Reybier K., Jaffrezic N., Comte V., Lagneau C., Lissac M., Martelet C., Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. *Materials Science and Engineering C23* (2003) 551-560.
- [QVB93] Quirynen M., van der Mei H.C., Bollen C.M.L., Schotte A., Marechal M., Doornbusch G.I., Naert I., Busscher H.J. and van Steenberghe D., An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra and subgingival plaque. *Journal of Dental Research* 72: 9 1304-1309
- [RIC96] Richards R.G., The effect of surface roughness on fibroblast adhesion in Vitro. *Injury* 27 (1996) 38-43.
- [RCB03] Romanello M., Crovella S., Biasotto M., Pirullo D., Scmid C., Moro L. Biological evaluation of the effects of the surface roughness and composition of titanium discs on an immortalized human osteoblastic cell line, *Journal of applied biomaterials and biomechanics*, 2003: 1 117-124.
- [RNB00] Redey S., Nardin M., Bernache-Assolant D., Rey C., Delannoy P., Sedel L., Marie P. behaviour of human osteoblastic cells on stoichiometric hydroxyapatite and type A carbonate apatite: Role of surface energy, *Journal of Biomedical Materials Research*, 50 (2000) 353-364.
- [ROB87] Robbins M.O. and Joanny J.F. Contact angle hysteresis on random surfaces. *Europhysics Letters* 3 (1987) 729-735.
- [SGV06] Shalabi M.M., Gortemaker A., Van'tHof M.A., Jansen J.A. and Creugers N.H.J., *Implant surface roughness and bone healing a systematic Review*. *Journal Dental Research, Critical reviews in oral biology and Medicine*. 85 (2006): 496-500.
- [SGH83] Senior R., Griffin G., Huang J., Walz D. and Deuel T., Chemotactic activivity of platelet alpha granule proteins for fibroblast, *Journal of Cell Biology* 96 (1983) 382-385.
- [SHA02] Sharma P.K., Hanumantha Rao K., Analysis of different approaches for evaluation of surface energy of microbial cells by contact angle goniometry. *Advances in Colloid and Interface Science* 98 (2002) 341-463.
- [SJT07] Sheng Y., Jiang S., Tsao H., Effects of geometrical characteristics of surface roughness on droplet wetting. *The Journal of chemical physics* 127 (2007) 234704.
- [SOH06] Schuler M., Owen G., Hamilton D., de Wild M., Textor M., Brunette D., Tosatti S., Biomimetic modification of titanium dental implant model surfaces using RGDSP-peptide sequence: A cell morphology study. *Biomaterials* 27 (2006) 4003-4015.
- [SRW07] Scheideler L., Rupp F., Wendel H., Sathe S., Geis-Gerstorfer J., Photocoupling of firmoenctinn to titanium surfaces influences keratinocyte adhesion, pellicle formation and thrombogenicity. *Dental Materials*, 23 (2007) 469-478.
- [WEN36] Wenzel R., Resistence of solid surfaces to wetting by water. *Industrial and engineering chemistry*. 28 (1936) 988-994.

[WKB86] Wyant J.C., oliopoulos C.L., Bhushan B., Basila D., Development of a Three-Dimensional noncontact digital optical profiler. *Journal of tribology*, 108 (1986) 1-8.

[WOO04] Wood Melanie R. and Vermilyea Stanley G., *A review of selected dental literature on evidence-based treatment planning for dental implants: Report of the Committee on research in fixed prosthodontics of the academy of fixed prosthodontics*. *Journal of Prosthetic Dentistry* 92 (2004)447-462.

[ZAG03] Zhang H., Ahmad M., Gronowicz G., Effects of transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) on in vitro mineralization of human osteoblasts on implant materials. *Biomaterials* 24 (2003) 2013-2020.

[ZCS04] Zhu X., Chen J., Scheideler L., Reichl R., Geis-Gerstorfer. Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses. *Biomaterials* 25 (2004) 4087-4103.

[ZLB05] Zhao B., Lee I., Bai W., Cui F., Feng H., Improvement of fibroblasts adherence to titanium surface by calcium phosphate coating formed with IBAD. *Surface and Coating Technology* 193 (2005) 366-371.

[ZTF05] Zhao B., Tian E., Feng H., Lee I., Cui F., Effects of RGD peptide grafting to titanium dental implants on the adhesion of human gingival fibroblasts and epithelial cells. *Current Applied Physics* 5 (2005) 407-410.