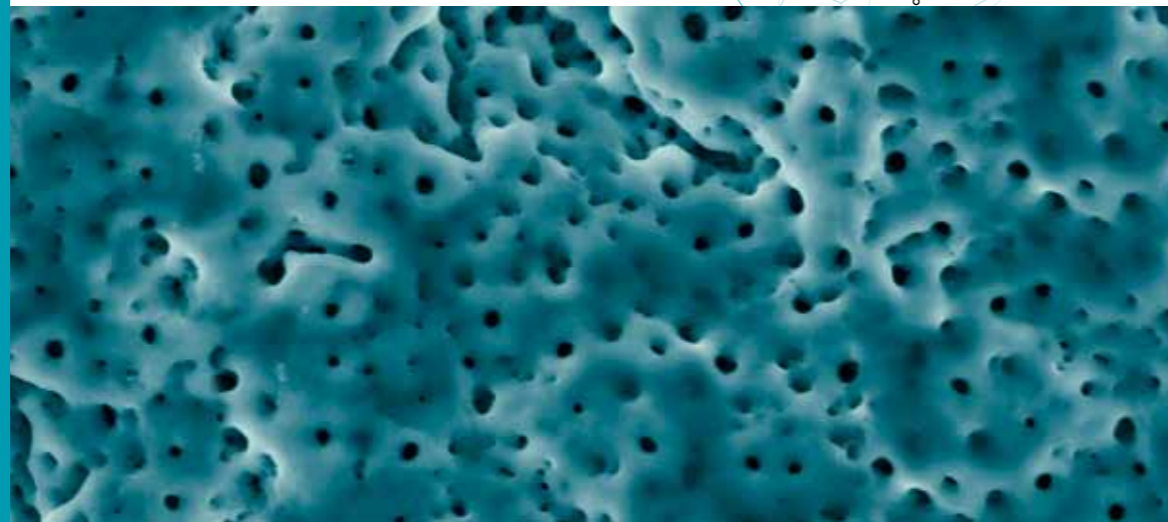


Respuesta química y biológica de la superficie Biomimetic Advanced Surface



La biocompatibilidad y la capacidad de osteointegración del titanio comercialmente puro y de sus aleaciones están íntimamente relacionadas con sus propiedades superficiales como la composición de la capa de óxido protectora y la morfología superficial. La superficie Biomimetic Advanced Surface (BAS) de los implantes dentales AVINENT, obtenida al aplicar un tratamiento compuesto por un proceso de granallado seguido de un anodizado por plasma químico en la aleación Ti6Al4V, ha sido caracterizada a nivel químico, físico y biológico. Mediante técnicas como microscopía electrónica de barrido, espectroscopia de energía dispersiva de rayos X e interferometría óptica se ha demostrado que la su-

perficie BAS presenta una morfología rugosa ($R_a = 3,63 \mu\text{m}$) compuesta por óxido de titanio microporoso con pequeñas cantidades de calcio y fósforo. Debido al carácter aislante de los óxidos formados durante el tratamiento, la resistencia a la corrosión mejora notablemente cuando se reproducen las condiciones ambientales del medio fisiológico. Los cultivos de osteoblastos de la línea MG-63 realizados en muestras tratadas BAS y muestras pulidas indicaron, a partir de la cuantificación de la actividad de fosfatasa alcalina y de observaciones por microscopía electrónica de barrido, que el tratamiento promueve la diferenciación osteoblástica.



INTRODUCCIÓN

El uso del titanio y sus aleaciones como material para implantes dentales responde a su excelente resistencia a la corrosión y a su elevada biocompatibilidad. Sin embargo, se han desarrollado multitud de tratamientos superficiales basados en distintas tecnologías que permiten mejorar la respuesta biológica de las zonas del implante que entran en contacto con los tejidos vivos. Estos tratamientos superficiales modifican la superficie desde el punto de vista químico, físico y/o microtopográfico, afectando el valor de la energía libre superficial y, por consiguiente, su interacción con las entidades biológicas.

El uso del tratamiento de granallado o *blasting* sobre titanio y aleaciones de titanio ha sido ampliamente estudiado y actualmente se aplica en varios dispositivos para la sustitución de tejidos duros. La proyección de partículas

sobre la superficie del implante permite obtener una rugosidad superficial controlada que afecta positivamente a la diferenciación de las células osteoblásticas *in vitro*^{1,2} y a la capacidad de osteointegración *in vivo*.³

Por otro lado, la aplicación del proceso de anodizado por plasma químico propuesto por Kurze *et al.*⁴ y ampliamente descrito por Ishihawa *et al.*,⁵ ofrece la posibilidad de obtener superficies microporosas de óxido de titanio enriquecidas con calcio y fósforo con interesantes propiedades biológicas.⁶

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de la aplicación conjunta de ambas técnicas características de la superficie Biomimetic Advanced Surface (BAS) de los implantes dentales AVINENT, granallado y anodizado por plasma químico, en distintas propiedades relevantes desde el punto de vista de la implantología dental.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras

Se cortaron discos de Ti6Al4V ELI de 2 mm de espesor partiendo de una barra de 5,5 mm de diámetro proporcionados por la empresa AVINENT Implant System S.L. A continuación, se trató una de las caras del disco medianamente granallado utilizando corindón blanco F60 como partícula de proyección con un tamaño de partícula comprendido entre 212 y 300 micrómetros. Seguidamente, las muestras granalladas fueron lavadas con acetona en ultrasonidos durante 10 minutos y aclaradas con agua desionizada.

A continuación, las muestras granalladas se anodizaron conectándolas al ánodo de una fuente de alimentación de corriente continua y utilizando una disolución acuosa rica en calcio y fósforo como electrolito. Se aplicó una den-

sidad de corriente de 0,75 mA/mm² y se dejó evolucionar libremente el potencial hasta alcanzar el valor de 130 V. Posteriormente, las muestras se aclararon con agua desionizada en ultrasonidos durante 10 minutos.

Además, se utilizaron discos de Ti6Al4V ELI pulidos con carburo de silicio y gamma alúmina de 0,05 micrómetros como superficie de control en todos los estudios descritos en el presente artículo.

Microscopia electrónica de barrido

La superficie de las muestras se observó mediante microscopia electrónica de barrido (Jeol JSM-6400, Japón) con un potencial de aceleración de 20 KV. Se utilizó microanálisis de EDS (X-ray energy dispersive spectroscopy) para determinar la composición química superficial de las muestras.

Interferometría óptica

Se utilizó un microscopio óptico interferométrico (Veeco WYCO NT 1100, EEUU) operando en el modo VSI (Vertical Scanning Interferometry). Se realizaron mediciones a 100 aumentos determinándose los siguientes parámetros:

- Ra (media aritmética de las desviaciones del perfil): es la media aritmética del valor absoluto de las distancias desde la línea media del perfil dentro de la longitud de muestra L.
- Rq (media de la raíz cuadrada de las desviaciones del perfil): es el valor medio de la raíz cuadrada de las desviaciones del perfil respecto a la línea media, dentro de la longitud de muestra L. Este parámetro es más sensible que Ra a los valores extremos debido a la operación raíz cuadrada. Rq tiene un significado estadístico, ya que es la desviación estándar de la distribución de alturas del perfil.
- Incremento de superficie: es el cociente entre el valor del área real de una superficie y su área nominal.

Resistencia a la corrosión

Los ensayos realizados para determinar las propiedades electroquímicas fueron:

- Potencial libre (Open Circuit Potencial)
- Potencial cíclico

Ambos ensayos se realizaron empleando una celda electrolítica de vidrio de 200 ml de capacidad conectada a un potenciostato modelo VOLTALAB PGZ 301. En el presente estudio se utilizó como electrodo de referencia un electrodo de Ag/AgCl y como electrodo auxiliar o contraelectrodo un electrodo de platino (figura 1).

Los ensayos de potencial libre y voltametría cíclica se realizaron a una temperatura de 37,5 °C y utilizando como electrolito Hank's Balanced Salt Solution (Sigma) con un pH = 7,13. Todas las lecturas de voltaje fueron referidas al electrodo estándar de Ag/AgCl. En los ensayos de potencial libre se dejó estabilizar la muestra sumergida en el electrolito durante 40 minutos, registrando la diferencia de potencial entre la muestra y electrodo de referencia. En el caso de los ensayos de potencial cíclico se aplicó velocidad de diferencia de potencial de 1 mV/s en la dirección más noble entre la muestra y el electrodo de referencia, y se registró el valor de corriente que circulaba entre la muestra y el electrodo auxiliar.

Estudios celulares

Para realizar el presente estudio se utilizaron osteoblastos humanos de la línea celular MG63. Las células fueron colocadas en placas de cultivo con 15 ml de medio de cultivo (DMEM, Dulbecco's Modified Tagle Medium, Gibco) añadiendo un 10% de suero bovino fetal (FCS, Gibco), un 1% penicilina/estreptomina, un 1% de piruvato y un 1% de L-glutamina (todos Gibco). Las células se mantuvieron a 37 °C en un incubador bajo una atmósfera con 5% CO₂. El medio de cultivo se cambió cada 3 días. Al realizar la cuarta renovación, las células fueron lavadas con tampón fosfato (PBS) y tripsinizadas con Trypsin-EDTA (0,25%) en una incubadora durante 5 minutos a 37 °C.

a) Proliferación

La proliferación celular fue cuantificada mediante el ensayo WST (Roche, Alemania). Se cultivaron 10.000 células con 300 µl de DMEM en cada uno de los pozos de cultivo donde se habían colocado las muestras y discos de poliestireno como control positivo. Después de 1, 3 y 7 días, las células fueron lavadas con PBS y 200 µl de solución de WST (Roche). La WST es una sal de tetrazolio (4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-3H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno) que es transformada en formazán mediante un complejo sistema mitocondrial-succinato-tetrazolio-reductasa y es activo sólo en el caso de células viables. Por lo tanto, la cantidad de formazán producida durante el ensayo, que se evalúa mediante medidas de absorbancia en un espectrofotómetro, está relacionada con el número de células viables, es decir, el número de células metabólicamente activas dentro del cultivo. Para conseguir un buen nivel de reac-

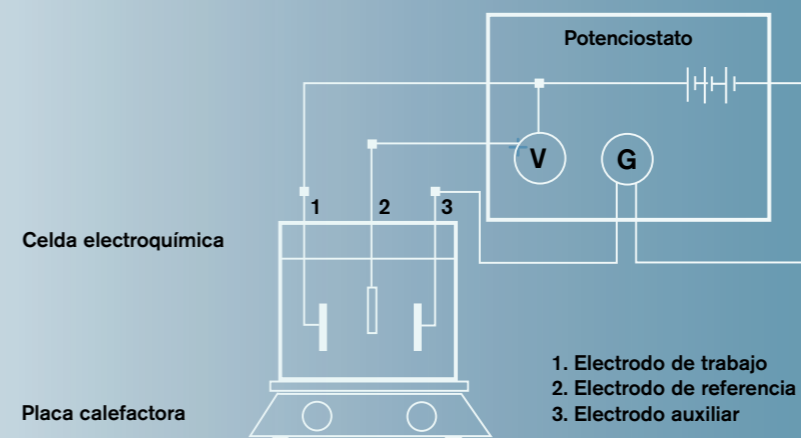


Figura 1. Esquema del montaje para la realización de los ensayos de corrosión.

ción se dejó incubar el conjunto durante una hora. Después de ese tiempo se produjo un cambio de color que se pudo medir utilizando un espectrofotómetro (PowerWaveX, Bio-Tek Instruments) con una longitud de onda de 450 nm.

b) Diferenciación

Para realizar los ensayos de diferenciación celular se añadieron 100.000 células en cada uno de los pozos. El medio de cultivo fue suplementado con 50 mM de ácido ascórbico (Sigma) y 10^{-8} mM de dexametasona (Sigma), 3 μ l de cada uno de los suplementos fue añadido en cada pozo durante 48 horas. El líquido sobrenadante de cada uno de los pozos fue recogido y congelado a -80°C . Los discos fueron lavados dos veces con PBS (Phosphate Buffered Solution) y se empleó M-PER® (Pierce, USA) para lisar las células. El lisado celular fue congelado a -80°C .

El lisado celular obtenido de las distintas muestras fue descongelado para cuantificar la proteína total y la actividad de la fosfatasa alcalina presente en las células. Para la cuanti-

ficación de la proteína total, se empleó el ensayo BCA (Pierce, USA) según el protocolo especificado por el fabricante. Para realizar el ensayo, se añadió 25 μ l de muestra a 200 μ l de reactivo de trabajo en una placa de 96 pozos. La placa fue incubada a 37°C durante 30 minutos y enfriada a temperatura ambiente. Finalmente se obtuvieron los valores de absorbancia a una longitud de onda de 562 nm. Para la obtención de la curva de calibrado se prepararon varias diluciones de BSA (Bovine Serum Albumin) de 0 a 2.000 $\mu\text{g/ml}$.

Para la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina se añadió en cada pozo 100 μ l de cada muestra, 50 μ l de solución tampón AMP (0,5M 2-amino-metil-1-propanol, 2 mM MgCl_2) y 50 μ l de solución sustrato (10 mM p-nitrofenilfosfato). Para la determinación de la curva de calibrado se prepararon varias diluciones de p-nitrofenol con un rango de concentración de $2 \cdot 10^{-5}$ - $2,4 \cdot 10^{-4}$. La placa de 96 pozos se incubó a 37°C durante 30 minutos. La reacción se paró con la adición de 100 μ l de NaOH 3M. Finalmente se realizaron las medidas espectrofotométricas a 405 nm.

MUESTRA	Ti	Al	V	O	Ca	P	Na
Pulida	89,7	6,5	3,7	-	-	-	-
Tratada	26,0	7,6	1,1	58,6	2,8	3,0	1,4

Tabla 1. Análisis químico de las superficies.

c) Morfología celular

Para determinar la variación en la morfología celular en función de la topografía, los cultivos se examinaron mediante Microscopía Electrónica de Barrido (Strata DB 235, FEI Company). Después de 24 horas de incubación, el medio de cultivo se retiró y las muestras se lavaron 3 veces con solución tampón fosfato (PBS) y las células se fijaron mediante OsO_4 (1%) en PBS (0.1 M) durante 15-30 minutos. Las muestras fueron deshidratadas mediante la inmersión sucesiva en distintas soluciones de alcohol ter-butílico (50, 75, 90 y 100%). El alcohol se retiró durante la etapa de punto crítico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La observación superficial mediante Microscopía Electrónica de Barrido mostró que las muestras con la superficie BAS presentaban una superficie formada por una rugosidad microscópica debido al impacto de partículas óxido de aluminio durante el proceso de granallado y por presencia de poros de 1-2 micrómetros de diámetro distribuidos uniformemente por la superficie (figura 2). Los análisis químicos indicaron la presencia de oxígeno, calcio, fósforo y sodio en la superficie de las muestras tratadas (tabla 1). Estos elementos se introducen en la superficie durante el proceso de anodizado.

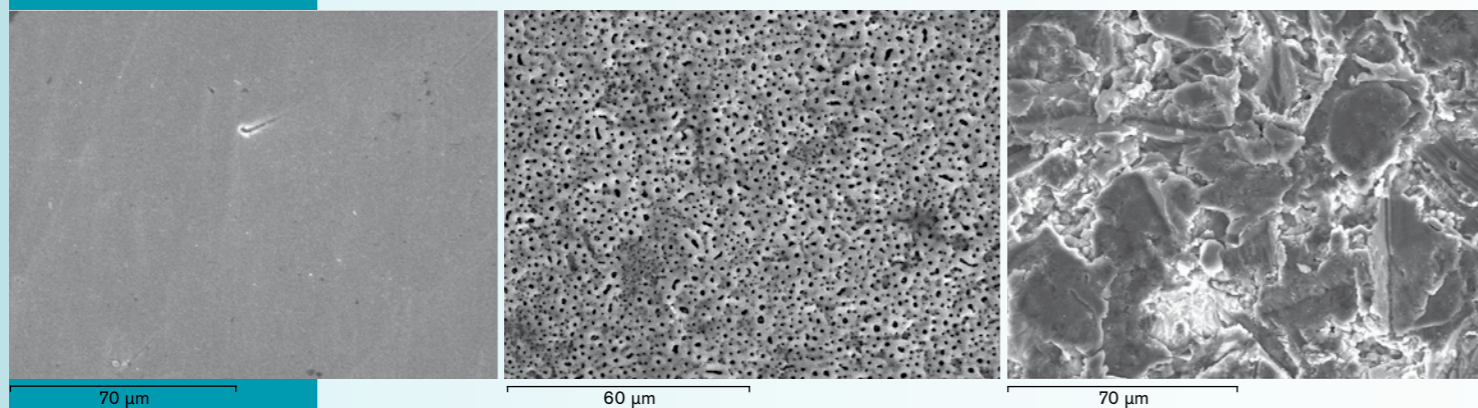


Figura 2. Imágenes de microscopía electrónica de las superficies estudiadas.

MUESTRA	Ra	Rq	Incremento de superficie
Pulida	$0,19 \pm 0,04$	$0,24 \pm 0,05$	$1,00 \pm 0,00$
Tratada	$2,89 \pm 0,07$	$3,68 \pm 0,09$	$1,76 \pm 0,11$

Tabla 2. Parámetros topográficos obtenidos.

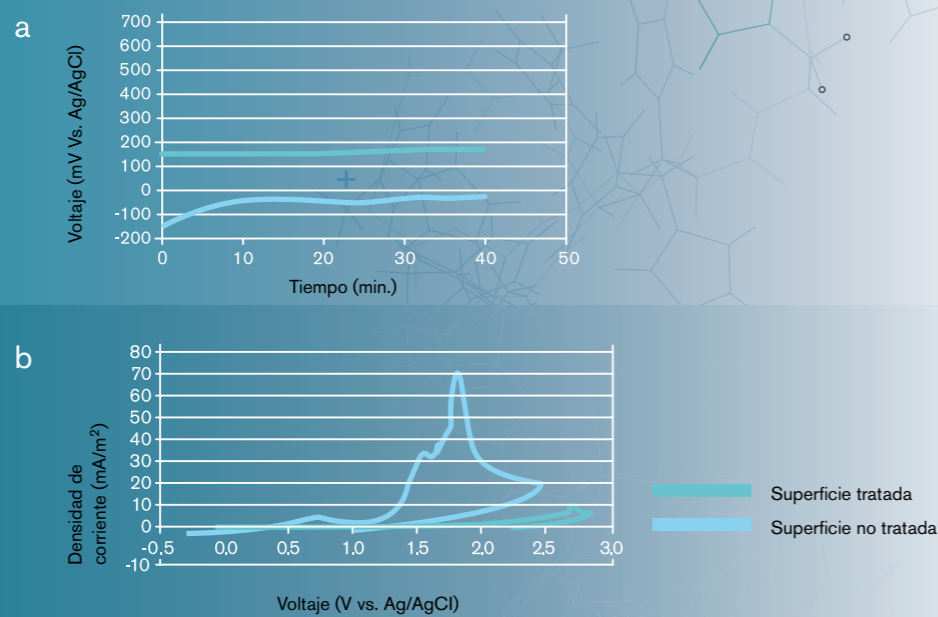


Figura 3. (a) Curvas de potencial libre. (b) Curvas de potencial cíclico.

La tabla 2 muestra los valores de los distintos parámetros microtopográficos utilizados para cuantificar la rugosidad superficial. Evidentemente, las muestras tratadas presentaban una rugosidad superior que las pulidas, incrementando la superficie específica en un 76%. El aumento del parámetro Ra se atribuye, principalmente, a la deformación plástica producida por el impacto de partículas en la superficie durante el proceso de granallado.⁹ El anodizado permite incrementar la superficie específica del material, pero su incidencia en el valor de Ra es menor que el proceso de granallado.⁹

Los ensayos electroquímicos indicaron que el tratamiento superficial incrementaba notablemente la resistencia a la corrosión de la aleación Ti6Al4V (figura 3). En primer lugar, las muestras tratadas presentaban un potencial en circuito abierto de 273 mV frente a los

-23 mV de la superficie sin tratar. Las voltametrías cíclicas mostraron que la superficie tratada ofrecía valores de densidad de corriente más bajos que el metal sin tratar para el intervalo de voltaje estudiado y manteniéndose la capacidad de repasivación de la aleación Ti6Al4V. Esta mejora en la resistencia a la corrosión se asocia a la formación de una capa formada, principalmente, de óxidos de titanio, eléctricamente aislantes, sobre la superficie de la muestra.¹⁰

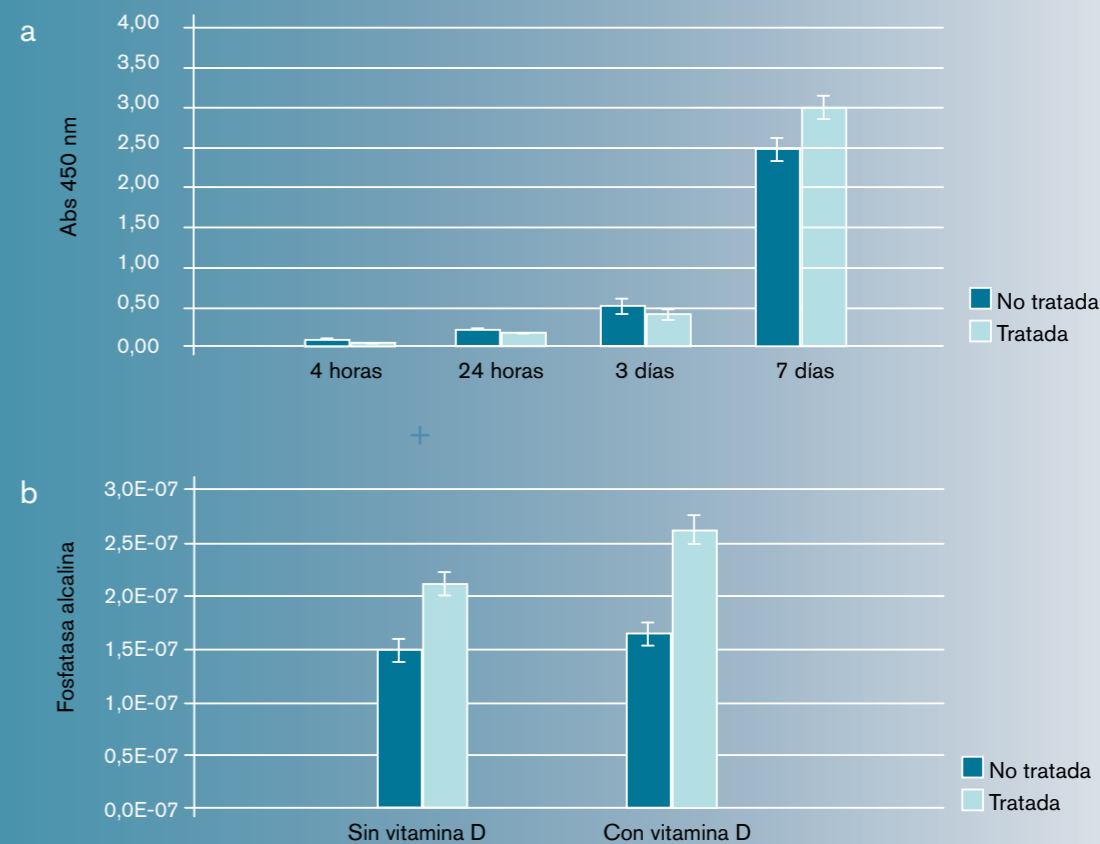
Los resultados de proliferación celular pusieron de manifiesto el buen comportamiento *in vitro* de la superficie tratada, indicando la adecuada citocompatibilidad del material, aunque no se observaron diferencias significativas entre la superficie tratada y la superficie sin tratar (figura 4a).

En cuanto a la diferenciación celular, se observaron mayores concentraciones de fosfatasa alcalina por microgramo de proteína total en los discos tratados, indicando una mayor expresión fenotípica de los osteoblastos en la superficie BAS (figura 4b). Estos resultados concuerdan con estudios descritos en otras publicaciones.^{11, 12}

El estudio morfológico mostró variaciones entre las muestras lisas y cubiertas con la superficie BAS en la morfología de los osteoblastos después de 24 horas de incubación (figura 5). En las superficies lisas, las células

presentaban una morfología fibroblástica plana con una débil actividad dorsal. Esta configuración extendida reduce la probabilidad de que la célula exprese fenotipos osteoblásticos, ya que estas células se caracterizan por tener una morfología columnar en su fase de secreción *in vivo*.¹³ En cambio, en las muestras tratadas los osteoblastos se anclaban a la superficie por medio de contactos focales entre las extensiones citoplasmáticas y los múltiples picos de la topografía. Esto fuerza a la célula a presentar una morfología más osteoblástica con una mayor actividad dorsal.

Figura 4. (a) Resultados de proliferación celular. (b) Resultados de producción de fosfatasa alcalina.



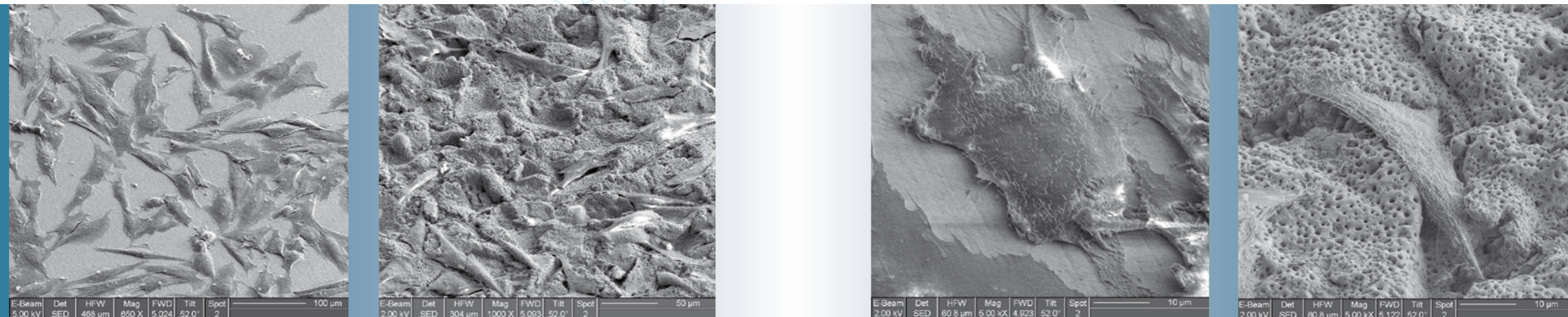


Figura 5. Imágenes de microscopía electrónica de cultivos de osteoblastos sobre las dos superficies estudiadas después de 24 horas de incubación.

CONCLUSIONES

La superficie BAS, obtenida mediante la aplicación del doble tratamiento superficial, granallado y anodizado por plasma químico en sustratos de Ti6Al4V, presenta una microtopografía característica formada por una morfología rugosa recubierta por óxido de titanio microporoso con pequeñas cantidades de calcio y fósforo. Los ensayos celulares mostraron que la superficie formada permite una adecuada proliferación y una mayor diferenciación de las células osteoblásticas cuando se comparan los resultados con los obtenidos con superficies pulidas.

AGRADECIMIENTOS

El autor quiere expresar sus agradecimientos a AVINENT Implant System (Santpedor, España) por el soporte financiero y también al CDTI (Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial) por los fondos aportados a este proyecto de investigación (IDI-05-0491).

REFERENCIAS

1. LINCKS, J.; BOYAN, B.-D.; BLANCHARD, C.; LOHMANN, C.; LIU, Y.; COCHRAN, D.; DEAN, D.; SCHWARTZ, Z. *Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition*. *Biomaterials* 1998, 19: 2219-2232.
2. ANSELME, K.; LINEZ, P.; BIGERELLE, M.; *et al.* *The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behaviour*. *Biomaterials* 2000; 21 1567-1577.
3. APARICIO, C.; GIL, F.J.; THAMS, U.; MUNOZ, F.; PADROS, A.; PLANELL, J.A.; *Osseointegration of grit-blasted and bioactive titanium implants: Histomorphometry in minipigs*. *Bio-ceramics* 2003; 16: 737-740.
4. KURZE, P.; KYSMANN, W.; SCHNEIDER, H.G. *Applications fields of ANOF layers and composites*. *Cryst Res Technol* 1986;21: 1603-1609.
5. ISHIZAWA, H; ONGINO, M. *Formation and characterization of anodic titanium oxide films containing Ca and P*. *J Biomed Mater Res* 1995; 29:65-72.
6. RODRIGUEZ, R.; KYOHAN KIM, JOO L. ONG. *In vitro osteoblast response to anodized titanium and anodized titanium followed by hydrothermal treatment*. *Journal of Biomedical Research PART A* 2003; 65A (3): 352-358.
7. FRAUCHIGER, V. M.; SCHLOTTIG, F.; GASSER, B.; AND TEXTOR, M. *Anodic plasma-chemical treatment of CP titanium surfaces for biomedical applications*. *Biomaterials* 2004; 25:593-606.
8. APARICIO, C.; GIL, F.J.; FONSECA, C.; BARBOSA, M.; PLANELL, J.A.; *Corrosion behaviour of commercially pure titanium shot blasted with different materials and sizes of shot particles for dental implant applications*. *Biomaterials* 2003;24:263-273.
9. II. SONG PARK, TAE GYU WOO, WOO YONG JEON, HYEONG HO PARK, MIN HO LEE, TAE SUNG BAE AND KYEONG WON SEOL. *Surface characteristics of titanium anodized in the four different types of electrolyte*. *Electrochimica Acta*. 2007;53:863-870.
10. IL. SONG PARK, TAE GYU WOO, WOO YONG JEON, HYEONG HO PARK, MIN HO LEE, TAE SUNG BAE AND KYEONG WON SEOL. *Surface characteristics of titanium anodized in the four different types of electrolyte*. *Electrochimica Acta* 2007;53:863-870.
11. RODRIGUEZ, R.; KYOHAN KIM, JOO L. ONG. *In vitro osteoblast response to anodized titanium and anodized titanium followed by hydrothermal treatment*. *Journal of Biomedical Research PART A* 2003; 65:352-358.
12. DAS, K.; BOSE, S.; BANDYOPADHYAY, A. *Surface modifications and cell-material interactions with anodized Ti*. *Acta Biomaterialia* 2003; 4:573-585.
13. BOYAN, B.D.; SYLVIA, V.L.; LIU, Y., *et al.* *Surface roughness mediates its effects on osteoblasts via protein kinase A and phospholipase A2*. *Biomaterials* 1999;20: 2305-2310.