

Ingeniería de superficies en implantes de Ti para potenciar la oseointegración. Estudio in vitro.

Surface engineering in Ti implants to enhance osseointegration. In vitro study.



RESUMEN

LBMB (*Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología*)
 Facultad de Odontología - UNLP
 Calle 50 e/ Av. 1 y 115 La Plata (1900)
 Bs. As. Argentina
 biotecnologiaodontologicafolp@gmail.com
 LIMF (*Laboratorio de Investigaciones de Metalurgia Física*),
 CICPBA (*Comisión de Investigaciones Científicas*),
 Departamento de Materiales, Fac. de Ingeniería - UNLP

Autores: Merino G; Mayocchi K; Blasetti N;
 Mayocchi RM; Kang KW; Barboza Lemos A;
 Kohan J; Lorente CL.

En lo que concierne a los biomateriales, se ha puesto mucho esfuerzo en el diseño y proceso de fabricación de implantes, sobre todo desde la ingeniería de superficies, que permitan una mayor aceleración y robustez del proceso de osteointegración, de manera de contribuir a la disminución de las tasas de fracaso de los implantes por enfermedades periimplantarias. El objetivo de este trabajo fue desarrollar superficies bioactivas en Ti para implantes dentales que favorezcan la adhesión celular y la diferenciación de CMM a células del linaje osteoblástico in vitro. Se realizó un estudio observacional descriptivo de superficies de Ti en cultivo con CMM. Los tratamientos utilizados fueron blastinizado con partículas de fosfato de calcio (B, 2min/6Bar) y anodizado por plasma químico con previo blastinizado con partículas de fosfato de calcio (BAPQ, $\text{CaHPO}_4\text{-Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$). Del análisis de las distintas superficies tratadas con el sembrado de las CMM, no se observaron efectos citotóxicos en ningún caso. Las células exhibieron comportamientos de adhesión y crecimiento con la consecuente producción de proyecciones citoplasmáticas. En las superficies de las muestras BNa y BAPQNa se evidenció un incremento de las proyecciones citoplasmáticas comparadas con las muestras B y BAPQ. Se observó la presencia de un precipitado alrededor de las células adheridas y se determinó mediante SEM-EDS que estos estaban compuestos por calcio y fósforo. Nuestro laboratorio ha demostrado previamente que, en ausencia de factores de crecimiento exógenos o medios estimulantes, la topografía de la superficie y la energía de la superficie son suficientes para inducir la diferenciación de las CMM. Sin embargo, los mecanismos moleculares precisos que controlan este proceso aún no están claros.

PALABRAS CLAVE: SUPERFICIES - TITANIO - CULTIVO - CÉLULAS MADRE

SUMMARY

As far as biomaterials are concerned, much effort has been put into the design and manufacturing process of implants, especially from surface engineering, which allow a greater acceleration and robustness of the osseointegration process, in order to contribute to the decrease of implant failure rates due to peri-implant diseases. The objective of this work was to develop bioactive Ti surfaces for dental implants that favor cell adhesion and differentiation of MSCs to cells of the osteoblastic lineage in vitro. A descriptive observational study of Ti surfaces in culture with CMM was carried out. The treatments used were blastinization with calcium phosphate particles (B, 2min/6Bar) and chemical plasma anodization with prior blastinization with calcium phosphate particles (BAPQ, $\text{CaHPO}_4\text{-Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$). From the analysis of the different surfaces treated with the seeding of the CMM, no cytotoxic effects were observed in any case. The cells exhibited adhesion and growth behaviors with the consequent production of cytoplasmic projections. On the surfaces of the BNa and BAPQNa samples, an increase in cytoplasmic projections was observed compared to the B and BAPQ samples. The presence of a precipitate around the adhered cells was observed and it was determined by SEM-EDS that these were composed of calcium and phosphorus. Our laboratory has previously shown that, in the absence of exogenous growth factors or stimulating media, surface topography and surface energy are sufficient to induce MSC differentiation. However, the precise molecular mechanisms that control this process remain unclear.

KEYWORD: SURFACES - TITANIUM - CULTURE - STEM CELLS

INTRODUCCIÓN

La osteointegración es un requerimiento fundamental para el éxito de los implantes dentales^[1]. Se define como el anclaje directo entre los tejidos periimplantarios y la superficie del implante mediante la formación de tejido óseo sin el crecimiento de tejido fibroso interpuesto^[2,3,4]. Este proceso se desencadena por un mecanismo en cascada, que comienza mediante reacciones entre las interfaces de la superficie del implante, las células sanguíneas y el tejido conectivo.

En lo que concierne a los biomateriales, se ha puesto mucho esfuerzo en el diseño y proceso de fabricación de implantes, sobre todo desde la ingeniería de superficies, que permitan una mayor aceleración y robustez del proceso de osteointegración, de manera de contribuir a la disminución de las tasas de fracaso de los implantes por enfermedades periimplantarias.

Existe acuerdo en la bibliografía que las propiedades superficiales que influyen en la osteointegración son la rugosidad y la mojabilidad. No obstante, todavía existe disparidad en cuanto a los efectos de las características superficiales generadas por los recubrimientos o tratamientos superficiales en la inducción de la diferenciación de células madre mesenquimales (CMM) hacia células osteoblásticas^[5,6]. En la mayoría de los estudios realizados, se agregan factores de crecimiento exógenos o medios estimulantes, como las proteínas morfogenéticas óseas, para estimular la diferenciación de las CMM^[7,8,9,10].

Dentro de los biomateriales de mayor uso para implantes dentales se encuentran el Ti y sus aleaciones. Las superficies de titanio son óptimas para su aplicación como implantes dentales y se han desarrollado e investigado una diversidad de recubrimientos y tratamientos superficiales con el fin de estimular la osteogénesis mediante la diferenciación de las CMM a células osteoblásticas con la intención de favorecer el proceso de la osteointegración^[5,11,12,13]. Los procedimientos de preparación de superficies son numerosos y los parámetros que definen cada proceso (por ejemplo, temperatura, presión, tiempo, tipo y tamaño de partículas, tipo y concentración de electrolitos de ataque y anodizado) pueden modificarse ampliamente. Por lo tanto, el número de diferentes superficies que se pueden obtener es casi ilimitado y cada una de ellas poseen una combinación de características que las hacen prometedoras, pero carecen de otras, como por ejemplo un tratamiento que pueda formar una superficie con una excelente mojabilidad pero no que posea resistencia al desgaste, lo que lo haría poco factible como pieza implantable.

La investigación a nivel mundial de los últimos años sobre modificaciones en superficies de titanio sigue típicamente dos enfoques diferentes^[6,12]. En el primer enfoque, la interfaz se mejora químicamente incorporando fases inorgánicas, por ejemplo, en titanio se agrega fosfato de calcio sobre o dentro de la capa de óxido de titanio. Esta modificación química inorgánica podría estimular la regeneración ósea y aumentar el entrelazamiento químico entre las proteínas de la matriz ósea y los materiales de superficie. Incluso, se puede incorporar Ag en la superficie para dotar a los implantes de la propiedad antibacteriana^[14]. Otra posibilidad, es la modificación de la superficie de manera bioquímica y se refiere específicamente a la incorporación de moléculas orgánicas, tales como proteínas, enzimas o péptidos, para inducir respuestas celulares específicas^[15]. En el segundo enfoque, la interfaz es mejorada físicamente a partir de la modificación de la topografía superficial. Se encuentra ampliamente documentado que la rugosidad superficial es un factor clave que afecta la osteointegración de los implantes^[16]. Las primeras superficies osteointegradas fueron generadas a partir del mecanizado que producía superficies mínimamente rugosas con algunas microranuras periódicas residuales. A pesar del éxito clínico de dichas superficies, se han desarrollado otros tipos de procesos para mejorar la microtopografía, por ejemplo, el grabado ácido o el blastinizado^[12,17]. El ataque ácido se realiza frecuentemente utilizan-

do ácido fluorhídrico, nítrico o sulfúrico y combinaciones de los mismos. El blastinizado se realiza mediante la proyección de partículas de sílice, fosfatos de calcio, alúmina u óxido de titanio de distintos tamaños, y se termina comúnmente mediante un pasivado químico para homogeneizar la microtopografía superficial y eliminar la mayor cantidad posible de partículas residuales. Este tratamiento también es conocido como granallado o arenado dependiendo del tipo de partícula (óxido o metal) y su forma (esféricas o angulares). Por otro lado, muchos tratamientos superficiales pueden combinar modificaciones químicas y físicas. Por ejemplo, luego del blastinizado se puede realizar un tratamiento alcalino que forma una capa de hidrogel de titanato de sodio o un tratamiento de anodizado que puede promover un aumento del espesor y la incorporación de elementos del electrolito en la capa de óxido de titanio; en ambos casos resultan estructuras porosas con micro y/o nanotopografía^[18,19].

Aunque existen una variedad de tratamientos y recubrimientos en titanio con características muy prometedoras, se debe tener en cuenta que los procesos superficiales deben ser factibles de reproducirse a escala industrial y deben ser fácilmente maniobrables por los profesionales de la salud. En la Argentina, actualmente se comercializan implantes con una combinación de tratamientos superficiales como el blastinizado seguido posteriormente de un grabado ácido que genera modificaciones en la rugosidad micro y nanométrica^[12,17]. Otro tratamiento muy estudiado que se podría llevar a escala industrial es el tratamiento alcalino debido a su eficacia y simplicidad. Esto no significa que sea la mejor combinación de tratamientos, sino que los costos de fabricación son aceptables a nivel industrial, por lo que se siguen estudiando opciones que disminuyan las tasas de fracaso de los implantes.

OBJETIVO

- *Desarrollar superficies bioactivas en Ti para implantes dentales que favorezcan la adhesión celular y la diferenciación de CMM a células del linaje osteoblástico in vitro.*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Desarrollar combinaciones de tratamientos superficiales en titanio para implantes como blastinizado, grabado ácido, tratamiento alcalino, entre otros.*
- *Evaluar y caracterizar la influencia de los tratamientos superficiales bioactivos en la adhesión y diferenciación de CMM a células osteoblásticas en ausencia de factores de crecimiento exógenos o medios estimulantes.*

HIPÓTESIS DE TRABAJO PLANTEADA

Las características de las superficies de Ti bioactivas en cuanto a topografía y energía superficial (mojabilidad) son suficientes para inducir la diferenciación de CMM en ausencia de factores de crecimiento exógenos o medios estimulantes in vitro.

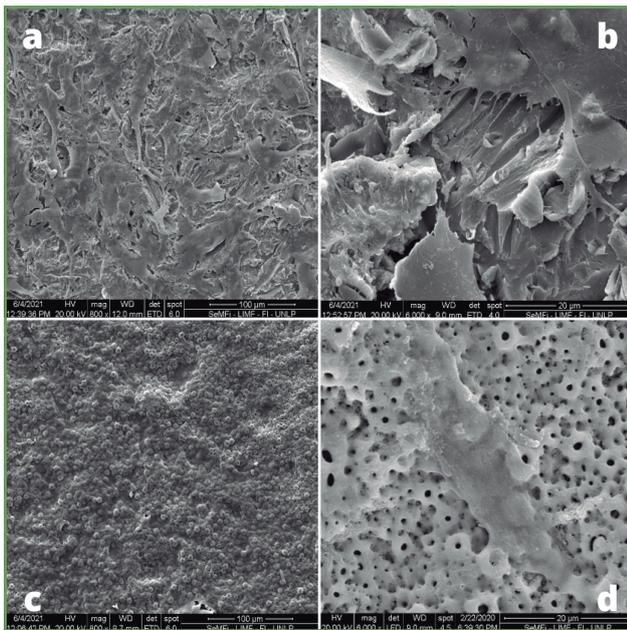


Figura 1: (a,b) Muestra B, (c,d) Muestra BAPQ. Ambas superficies modificadas exhiben comportamiento de adhesión y crecimiento.

MATERIALES Y MÉTODO

Se realizó un estudio observacional descriptivo de superficies de Ti en cultivo con CMM. Los tratamientos utilizados fueron blastinizado con partículas de fosfato de calcio (B, 2min/6Bar) y anodizado por plasma químico con previo blastinizado con partículas de fosfato de calcio (BAPQ, $\text{CaHPO}_4\text{-Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$). Ambas condiciones fueron sometidas a un tratamiento alcalino en NaOH (BNa, BAPQNa; 10M, 60°C, 24hs). Posteriormente, se realizaron cultivos en células madre mesenquimales (CMM) durante 48 horas según protocolo en el LBMB (Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Odontología UNLP.) La viabilidad celular se determinó con el colorante de exclusión Azul Tripiano y la cuantificación con cámara Neubauer. Se analizaron las características morfológicas y el comportamiento in vitro de las CMM de la pulpa mediante el microscopio invertido de contraste de fases (Leica D 1000) y el aspecto morfológico se determinó mediante coloración de rutina H-E para Microscopía Óptica.

RESULTADOS

Del análisis de las distintas superficies tratadas con el sembrado de las CMM, no se observaron efectos citotóxicos en ningún caso. Las células exhibieron comportamientos de adhesión y crecimiento con la consecuente producción de proyecciones citoplasmáticas. Las proyecciones citoplasmáticas crearon uniones localizadas entre el sustrato y la superficie celular, con cambios en la morfología celular. Además, se evidenció comunicación intracelular, considerado esto como uno de los factores más importantes para la diferenciación celular. En las superficies de las muestras BNa y BAPQNa (Figura 2) se evidencia un incremento de las proyecciones citoplasmáticas comparadas con las muestras B y BAPQ. Se observó la presencia de un precipitado alrededor de las células adheridas (Figura 2) y se determinó mediante SEM-EDS que estos estaban compuestos por calcio y fósforo. La muestra BAPQNa presentó una relación de Ca/P de 1,76 y la muestra BNa una relación de Ca/P de 1,66; en tal sentido la muestra BNa presentó una relación Ca/P similar a la proporción de hidroxiapatita (1,67) del tejido óseo humano.

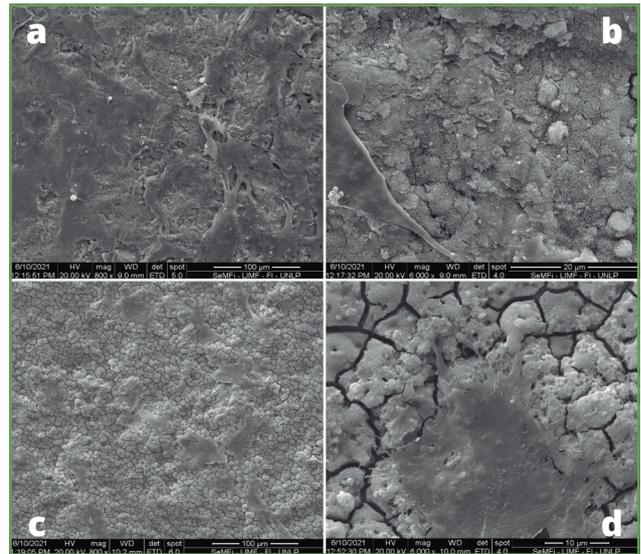


Figura 2: (a,b) Muestra BNa, (c,d) Muestra BAPQNa. Las proyecciones citoplasmáticas se unen a la estructura esquelética de red nanoporosa producto del tratamiento alcalino en NaOH.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Si bien es cierto que las propiedades de volumen tienen una importante influencia en el desempeño de los implantes, entre los parámetros clave que determinan el éxito de un implante en el corto y largo plazo son sus características superficiales. Por otro lado, es inusual que un biomaterial con propiedades de volumen adecuadas posea, a su vez, características superficiales apropiadas y, además, son escasas las superficies realmente biocompatibles. Desde que se introdujeron los implantes de titanio, se ha realizado un esfuerzo sostenido para hacer que sus superficies sean más osteoprogenitoras. Las técnicas de ingeniería para la fabricación de implantes dentales han jugado un papel clave en el diseño del dispositivo, las topografías de la superficie, la inserción sin complicaciones en la materia ósea del huésped, biocompatibilidad y costos. Aunque algunos tratamientos superficiales sean difíciles de reproducir en implantes se pueden aprovechar algunas características que producen en las superficies para estudiar en profundidad los procesos biológicos que se generan en la interacción célula-superficie. El conocimiento y los avances que se generarán en esta temática permitirán desarrollar trabajos de forma inter y transdisciplinaria y difundir en ámbitos de ciencia e ingeniería de materiales, odontología y medicina en el país. Los implantes de titanio con superficies hidrófilas microestructuradas aumentan la diferenciación de CMM y la formación de hueso periimplantario. Nuestro laboratorio ha demostrado previamente que, en ausencia de factores de crecimiento exógenos o medios estimulantes, la topografía de la superficie y la energía de la superficie son suficientes para inducir la diferenciación de las CMM. Sin embargo, los mecanismos moleculares precisos que controlan este proceso aún no están claros.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] D. Losic. Advancing of titanium medical implants by surface engineering: recent progress and challenges. *Expert Opinion on Drug Delivery* 18(10) (2021).
- [2] P.I. Branemark, U. Breine, B. Johansson, P.J. Roylance, H. Röckert, J.M. Yoffey. Regeneration of bone marrow. *Acta. Anat.* 59 (1964).
- [3] R. Rodas-Rivera. Historia de la implantología y la oseointegración, antes y después de Branemark. *Rev. Estomatol Herediana* 23(1) (2013).
- [4] R.S. Jayesh, V. Dhinakarsamy. Osseointegration. *J Pharm Bioallied Sci.* 7(1) (2015).
- [5] T. Hanawa. Titanium–Tissue Interface Reaction and Its Control With Surface Treatment. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7(170) (2019).
- [6] K.G. Neoh, X. Hu, D. Zheng, E.T. Kang. Balancing osteoblast functions and bacterial adhesion on functionalized titanium surfaces. *Biomaterials* 33 (2012).
- [7] F. Thorey, H. Menzel, C. Lorenz, G. Gross, A. Hoffmann, H. Windhagen. Osseointegration by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor β 2 coated titanium implants in femora of New Zealand white rabbits. *Indian Journal of Orthopaedics* 45(1) (2011).
- [8] C. Mangano, A. De Rosa, V. Desiderio, R. d'Aquino, A. Piattelli, F. De Francesco, V. Tirino, F. Mangano, G. Papaccio. The osteoblastic differentiation of dental pulp stem cells and bone formation on different titanium surface textures. *Biomaterials* 31 (2010).
- [9] Y. Li, Y. Song, A. Ma, C. Li. Surface Immobilization of TiO₂ Nanotubes with Bone Morphogenetic Protein-2 Synergistically Enhances Initial Preosteoblast Adhesion and Osseointegration. *BioMed Research International Article ID 5697250* (2019).
- [10] Y.H. Youn, S.J. Lee, G.R. Choi, H.R. Lee, D. Lee, D.N. Heo, B.S. Kim, J.B. Bang, Y.S. Hwang, V.M. Corrello, R.L. Reis, S.G. Im, I.K. Kwon. Simple and facile preparation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 immobilized titanium implant via initiated chemical vapor deposition technique to promote osteogenesis for bone tissue engineering application. *Materials Science & Engineering C* 100 (2019).
- [11] F. Accioni, J. Vázquez, M. Merinero, B. Begines, A. Alcudia. Latest Trends in Surface Modification for Dental Implantology: Innovative Developments and Analytical Applications. *Pharmaceutics* 14(455) (2022).
- [12] Q. Wang, P. Zhou, S. Liu, S. Attarilar, R. Ma, Y. Zhong, L. Wang. Multi-Scale Surface Treatments of Titanium Implants for Rapid Osseointegration: A Review. *Nanomaterials* 10 (2020).
- [13] A. Ralls, P. Kumar, M. Misra, P.L. Menezes. Material Design and Surface Engineering for Bio-implants. *The Journal of The Minerals, Metals & Materials Society* 72 (2020).
- [14] M. Wang, T. Tang. Surface treatment strategies to combat implant-related infection from the beginning. *Journal of Orthopaedic Translation* 17 (2019).
- [15] H.W. Meng, E.Y. Chien, H.H. Chien. Dental implant bioactive surface modifications and their effects on osseointegration: a review. *Biomarker Research* 4(24) (2016).
- [16] A. Wennerberg, T. Albrektsson. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin. Oral Impl. Res.* 20 (4) (2009).
- [17] A. El-Banna, M.W. Bissa, Z. Khurshid, S. Zohaib, F.Y.I. Asiri, M.S. Zafar. Surface modification techniques of dental implants. *En Dental Implants: Materials, Coatings, Surface Modifications and Interfaces with Oral Tissues* (2020).
- [18] R. Olivares-Navarrete, S.L. Hyzy, D.L. Hutton, C.P. Erdman, M. Wieland, B.D. Boyan, Z. Schwartz. Direct and indirect effects of microstructured titanium substrates on the induction of mesenchymal stem cell differentiation towards the osteoblast lineage. *Biomaterials* 31 (2010).
- [19] N.C. Martins Oliveira, C. Christian Gomes Moura, D. Zanetta-Barbosa, D. Baccelli Silveira Mendonça, L. Cooper, G. Mendonça, P. Dechichi. Effects of titanium surface anodization with CaP incorporation on human osteoblastic response. *Materials Science and Engineering C* 33 (2013).

