



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD LEÓN**

TÍTULO:

**“Efectos del tratamiento alcalino sobre la adhesión
fibroblástica en titanio”**

FORMA DE TITULACIÓN:

Tesina

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN ODONTOLOGÍA

P R E S E N T A:

Miryam Elvira Cuellar Flores

TUTOR: Doctor René García Contreras

Asesor: Doctora Laura Susana Acosta Torres

León, Guanajuato 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

Dedicatoria	4
Agradecimientos	5
Resumen	7
Summary	8
Introducción	9
CAPITULO I	11
<hr/>	
1.1 MARCO TEÓRICO.....	12
1.1.1 Implantes dentales.....	12
1.1.2 Titanio.....	12
1.1.3 Osteointegración.....	13
1.1.4 Adhesión fibroblástica.....	16
1.1.5 Diseño y modificación de superficie.....	18
1.1.5.1 Modificaciones físicas topográficas.....	19
1.1.5.2 Modificaciones químicas	20
1.1.5.2.1 Energía superficial	22
1.1.5.2.2 Superficies hidrofílicas.....	23
1.1.6 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	25
1.1.7 Ensayo MTT	26
1.2 ANTECEDENTES	29
CAPITULO II	32
<hr/>	
2.1 Planteamiento del problema	33
2.2 Justificación.....	35
2.3 Objetivo	37
2.4 Objetivos específicos.....	37
2.5 Pregunta de investigación.....	37
2.6 Hipótesis.....	38
CAPÍTULO III	39
<hr/>	

3.1 Metodología	40
3.1.1 Diseño de estudio.....	40
3.1.2 Universo de trabajo.....	40
3.1.6 Operacionalización de variables.....	40
3.1.5 Desarrollo del proyecto.....	44
CAPÍTULO IV	47
<hr/>	
4.1 RESULTADOS	48
4.1.1 Topografía de superficie.....	48
4.1.2 Adhesión y proliferación celular	49
4.1.3 Artículo de investigación	49
4.2 DISCUSIÓN.....	50
4.3 CONCLUSIÓN	52
Referencias bibliográficas	53
Anexos	59
Anexo 1. Carta de aceptación	60
Anexo 2. Artículo publicado	61

Dedicatoria

A Dios por permitirme el don de la vida, por mostrarme y guiar la dirección de mis decisiones a fin de llegar y alcanzar lo que me permite ser feliz, por darme las oportunidades para seguir adelante y superarme como persona.

A mis padres y a mi familia por su esfuerzo diario para permitirme concluir esta licenciatura, por su amor, comprensión y apoyo durante mis años de vida principalmente estos últimos en la licenciatura, por darme las oportunidades de alcanzar una superación académica y personal.

Agradecimientos

A mis padres Juan Cuellar y Cristina Flores por su apoyo durante los años transcurridos en odontología, por su comprensión y aliento en los momentos difíciles, por educarme bajo los principios necesarios para crecer como persona y darme la oportunidad de superarme académicamente, por mostrarme las dificultades de cada etapa y estar conmigo para superarlas; por los días de esfuerzo que durante estos años han empleado en ofrecerme las mejores oportunidades para poder llegar hasta este día, para ellos todo mi amor y agradecimiento.

A mis hermanas Jocelyn y Eunice Cuellar por la ayuda recibida durante este periodo, por ser un ejemplo de superación y un soporte a mi lado no únicamente en el ámbito escolar.

A mis amigos y compañeros por coincidir en esta etapa y compartir estos años de experiencias, por brindarme su compañía y amistad así como su ayuda en diferentes momentos de la carrera.

A mis profesores por su constancia y perseverancia, por guiarme durante la licenciatura, por transmitir sus conocimientos tanto en las clases diarias así como en el área clínica, por ser parte de mi formación brindando clases de calidad y esfuerzo constante por nuestra formación.

De manera especial al Doctor René García Contreras por depositar su confianza en mí y compartir sus conocimientos y proyectos durante estos años de convivencia, por su invitación a iniciar en la investigación, por mostrarme la entrega y amor a la misma y la oportunidad para formar parte del equipo de trabajo del laboratorio; por brindarme su ayuda, amistad, experiencia y asesoría para la realización de este proyecto en sus diferentes fases así como la oportunidad de nuevas experiencias académicas, por inculcar en mí el sentido de la responsabilidad y el rigor académico, a él mi más grande admiración y agradecimiento.

A la doctora Tatiana Mondragón por depositar su confianza y amistad en mí, por mostrarnos el placer hacía la odontopediatría y brindar su apoyo y conocimientos para la realización del trabajo presente así como para el desarrollo de nuevas habilidades y conocimientos, mostrando una entrega total e impecable en el desarrollo de su labor.

A los doctores Laura Susana Acosta Torres, Concepción Arenas Arrocena y Benjamín Sánchez Trocino por aceptarme dentro de su equipo de trabajo, por mostrar su confianza hacía mí, por su ayuda y apoyo en los distintos retos presentados y mostrar en todo momento y circunstancia el compromiso por la investigación y servicio hacía la comunidad universitaria.

A la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León por dar apertura a sus instalaciones para el estudio de odontología y sus demás carreras en el estado de Guanajuato, por ofrecer educación de calidad y servicio. Por generar oportunidades para la educación superior con los estándares más altos de competitividad y exigencia necesarios para el fortalecimiento de nuestras aptitudes. Por inculcar en nosotros valores de honestidad, solidaridad y responsabilidad para con nuestra nación, de orgullo por formar parte de la más grande casa de estudios y compromiso de superación personal y profesional para la realización propia. De igual manera mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de México por la oportunidad para realizar la presente investigación, a través de los proyectos de investigación PAPIIT IA204516, PAPIME PE201617 de la DGAPA, UNAM, sin cuya financiación y apoyo hubiera sido imposible realizar dicho proyecto

Por mi raza hablará el espíritu

Resumen

Introducción: El éxito clínico del uso de implantes a base de Ti se relaciona directamente con el proceso de osteointegración temprana y la biocompatibilidad. El empleo de modificaciones en la superficie del implante se ha realizado de forma física y química. En este sentido el proceso químico de hidrofiliación de la superficie mediante el uso de (NaOH) ha demostrado un aumento en la adhesión de células fibroblásticas y óseas que permiten una osteointegración más favorable y por consiguiente el éxito clínico del implante. **Objetivo:** Cuantificación *in vitro* de la adhesión y proliferación de fibroblastos de ligamento periodontal humano (FLPH) a placas de titanio con un tratamiento alcalino de hidróxido de sodio (NaOH). **Metodología:** Se llevó a cabo un estudio experimental *in vitro*. Placas de Ti comercialmente puro (10x10x0.5 mm) fueron obtenidas, pulidas y esterilizadas. Las placas fueron evaluadas mediante microscopía de fuerza atómica para evaluar la rugosidad de superficie y fueron tratadas ultrasónicamente con NaOH al 0.5 M durante 45 segundos. FLPH previamente establecidos del tejido periodontal se inocularon sobre las placas inmediatamente después del tratamiento alcalino. La adhesión y proliferación celular se determinó mediante el método de colorimetría rápida de MTT durante 60 minutos y 24 horas, respectivamente, en incubación a 37°C y atmósfera de 5% CO₂ bajo lectura a 540 nanómetros en espectrofotómetro de microplaca. Los datos fueron analizados con pruebas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney, la significancia estadística fue considerada con valor de $p < 0.05$ con un intervalo de confiabilidad del 95%. **Resultados** La rugosidad de las placas mostró un promedio de rugosidad de 0.04µm con una superficie casi plana y algunos microporos. El tratamiento alcalino de las placas de Ti provocan significativamente ($p < 0.05$) mayor adhesión y proliferación de FLPH comparadas con placas sin tratamiento. **Conclusión:** Clínicamente el tratamiento alcalino de implantes a base de Titanio puede ser una opción de preparación pre-quirúrgica para inducir y acelerar la integración ósea y de tejidos blandos, al aumentar la tasa de células viables adheridas

Palabras Clave: Humectabilidad, Hidróxido de sodio, Implantes dentales, Hidrofilicidad, Fibroblastos del ligamento periodontal

Summary

Introduction: The clinical success of use of Titanium dental implants is directly related with the early osseointegration process and the biocompatibility. The use of surface modifications has been made physical and chemically. In this way the chemical process for hydrophilicity using NaOH has demonstrated an increase in fibroblastic and bone cell adhesion that enhance a favorable osseointegration and consequently the implant clinical success. **Objective:** In vitro adhesion and proliferation quantification of human periodontal ligament fibroblasts (HPLF) in Titanium plates using an alkaline treatment based on NaOH. **Materials and methods:** In vitro experimental study was carried out. Type 1 commercially pure Ti plates were prepared (10x10x0.5mm), polished and sterilized. The plates were analyzed with atomic force microscopy to evaluate surface roughness and treated ultrasonically with NaOH at 0.5 M for 45 sec. HPLF previously established from periodontal tissue were inoculated on the treated Ti plates. The adhered and proliferated viable cell number was determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method for 60 minutes and 24 hrs, respectively. The data was analyzed using Kruskal-Wallis tests and multiple comparisons of the Mann-Whitney test, p value was fixed at 0.05 **Results:** The surface roughness showed mean roughness values equaled 0.04 μm with an almost flat surface and some grooves. The alkaline treatment of Ti plates caused significantly ($p < 0.05$) more pronounced HPLF adhesion and proliferation compared to untreated Ti plates. **Conclusion:** The treatment of Ti plates with NaOH enhances cell adhesion and the proliferation of HPLF cells. Clinically, the alkaline treatment of titanium-based implants could be an option to improve and accelerate osseointegration.

Keywords: wettability, sodium hydroxide, dental implants, hydrophilicity, periodontal ligament fibroblast

Introducción

El uso de implantes dentales como método de tratamiento para la rehabilitación de pacientes edéntulos ha incrementado durante las últimas décadas debido a sus propiedades estéticas, de biocompatibilidad con el huésped y su alta funcionalidad protésica.

El éxito clínico a largo plazo de un implante de titanio (Ti) en odontología está determinado por las reacciones bilaterales entre el material implantado y el medio biológico. Se relaciona principalmente y de manera directa con el proceso de osteointegración que proporciona la estabilidad y dirección de las fuerzas masticatorias mediante la aposición de hueso, con la estabilidad e integración del tejido blando y epitelial de unión que mantiene un volumen suficiente de tejido conectivo para el sellado biológico y finalmente con las propiedades de biocompatibilidad del material en el medio local para mantener las funciones celulares fundamentales.

Estas reacciones dependen de la intensidad de la irritación física-química así como de la naturaleza del material. En este sentido el incremento en la biocompatibilidad de las superficies de Ti ha sido continuamente estudiada. Las características de la superficie del implante representan uno de los factores que influyen sobre los procesos celulares, por lo que su modificación se ha realizado mediante métodos físicos y morfológicos como son: rugosidad, porosidad, topografía, fotocátalisis y funcionalización con péptidos de la matriz extracelular para inducir la adhesión celular, de igual manera con alteraciones químicas que incluyen plasma, soluciones salinas, oxidación anódica y uso de hidroxiapatita.

La energía superficial del implante juega un papel importante en la determinación de las propiedades hidrofílicas o hidrofóbicas que adquiere la superficie, lo que tiene repercusión en los procesos de integración. Generalmente cuando existe una carga positiva, la superficie adquiere características hidrofílicas, que ofrecen ventajas en la integración ósea y de tejidos blandos. Inicialmente, algunas proteínas plasmáticas esenciales son absorbidas de mejor manera por este tipo de superficies, ayudando

al agrupamiento células, adhesión y expresión de genes osteogénicos. Actualmente, diversos métodos han sido introducidos para aumentar la humectabilidad de las superficies y en este sentido el uso de hidróxido de sodio (NaOH) como tratamiento alcalino ha mostrado efectos positivos en la adhesión y proliferación celular. El objetivo de este proyecto fue el de observar los efectos del tratamiento alcalino con NaOH sobre placas de Ti en la adhesión y proliferación celular de fibroblastos del ligamento periodontal humano (FLPH).

CAPÍTULO I

1.1 MARCO TEÓRICO

1.1.1 Implantes dentales

Se entiende por implante dental a aquel aditamento artificial fabricado a base de materiales biocompatibles como Titanio (Ti) o componentes cerámicos, que tiene por función remplazar la estructura biológica radicular mediante su posicionamiento quirúrgico intra-óseo (Figura 1), con la finalidad de brindar soporte o estabilidad a prótesis de rehabilitación; en la actualidad el uso de implantes dentales representa una opción de tratamiento en la rehabilitación oral de pacientes con edentulismo parcial o total.^{1,2}

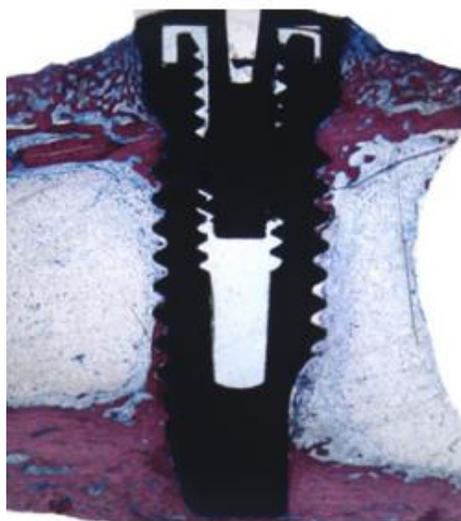


Figura 1 Implante de Ti comercialmente puro a 30 días de su inserción. Fuente: Juliana 2013

1.1.2 Titanio

El titanio es un elemento químico puro representado como Ti, con número atómico 22 y masa atómica igual a 47.90 u. Es un metal de transición ligera, fuerte, ligero, de color blanco metálico y lustroso.³ La ASTM (American Society for Testing and Materials) reconoce 4 grados de titanio comercialmente puro (Figura 2) y 3 aleaciones de Titanio; el Titanio comercialmente puro es una aleación entre el Titanio y oxígeno, que

Components (%)	ASTM grades			
	1	2	3	4
Fe max.	0.20	0.30	0.30	0.50
C max.	0.10	0.10	0.10	0.10
O max.	0.18	0.25	0.35	0.40
N max.	0.03	0.03	0.05	0.05
H max.	0.015	0.015	0.015	0.015
Σ	0.525	0.695	0.865	1.065
Ti (%)	99.470	99.300	99.130	98.930

Fe iron, C carbon, O oxygen, N nitrogen, H hydrogen, Ti titanium

Figura 2 Componentes del Ti comercialmente puro (Grado 1-4). Fuente: Juliana P. 2013

de acuerdo a los estándares para su empleo como implante quirúrgico el oxígeno debe encontrarse en concentraciones de 0.5%.³

Posee diversas propiedades favorables entre las que se encuentra una baja densidad de 4.5 g/cm y una resistencia a la flexión relativamente alta, alta resistencia a la corrosión casi equivalente al platino, resistencia mecánica, baja conducción térmica, alta conducción eléctrica, sólido a temperatura ambiente, tiene la capacidad de formar una capa de óxido de espesor nanométrico en un milisegundo que se comporta como barrera contra la disolución del metal al entrar en contacto con el ambiente, posee un módulo de elasticidad similar al hueso y propiedades altas de biocompatibilidad.⁴

El Ti es un material versátil que ha sido utilizado en diversas industrias como: ingeniería, industria química, naval, nuclear, aeronáutica y militar así como en áreas médicas y odontológicas. En el área odontológica, su uso inicio en los años 60s a partir del trabajo realizado por Branemark en 1965 quien investigaba la microcirculación sanguínea en tibias de ratón utilizando una cámara de observación hecha de Ti y observó una integración entre la cámara y el hueso; basado en esta observación inicio la investigación con enfoque en el uso clínico en humanos introduciendo la técnica para implantes de titanio osteointegrados en el ámbito dental y médico. Implantes a base de Titanio han sido utilizados durante años en el reemplazo de dientes perdidos con altas tasas de éxito ante sus propiedades biológicas favorables.³

1.1.3 Osteointegración

Posterior a la inserción del implante en el hueso del huésped se lleva a cabo una interacción entre los tejidos adyacentes al implante y la superficie del mismo en sentido bidireccional, induciendo respuestas celulares que dan paso a la osteointegración, que se entiende como la conexión estructural y funcional entre el hueso nuevo formado y la superficie del implante sin interposición de tejido conectivo.^{1,2,5,6}

El posicionamiento óseo del implante representa una lesión traumática en los tejidos óseos que generan distintas fases de reparación. La fase temprana de osteointegración ocurre durante las primeras semanas posteriores al posicionamiento del implante, siendo esta etapa la de mayor probabilidad de fracaso. (5)(6)

La respuesta inflamatoria ocurre consecuentemente e interactúa con el

proceso de coagulación y activación plaquetaria. Diversos grupos celulares arriban a la zona dentro de las primeras 24 horas entre los que se encuentran leucocitos, integrantes del grupo de factor de crecimiento tisular (TGF- β), proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) y factores de diferenciación, así mismo citoquinas que serán las primeras moléculas de señalización expresadas fundamentales para la formación ósea.^{1,6}

El espacio existente entre la superficie del implante y los tejidos está ocupada inicialmente por suero y coágulos sanguíneos siendo la zona de primera conexión con el material; las plaquetas liberarán una amplia gama de proteínas relacionadas con el proceso de integración, entre las cuales se presentan el fibrinógeno, fibronectina, vitronectina que participan en el desarrollo del coágulo, interacciones celulares, composición de la matriz extracelular y angiogénesis entre otras funciones.^{7,8}

La formación de una matriz a base de fibrinógeno en conjunto con el coágulo sanguíneo permite la infiltración de componentes celulares, aísla el lecho quirúrgico del ambiente y funciona como barrera ante posibles infecciones (figura 3). Las células pluripotenciales migran a través de la matriz preliminar de fibrina hacia la superficie del implante, mediadas por los factores liberados por plaquetas y

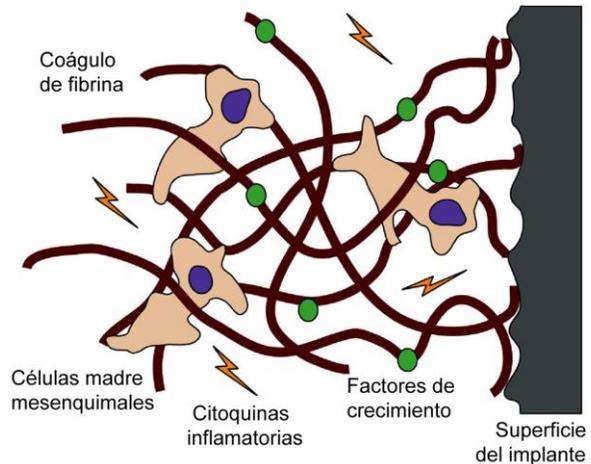


Figura 3. Conformación del coágulo de fibrina y su relación con la superficie del implante. Fuente: Gittens 2014.

leucocitos, estas células colonizan el implante y comienzan secretando una matriz libre de colágeno dentro de las primeras 24 horas post implantación.^{6,8,9}

El proceso de formación ósea inicia con la aposición de una pequeña capa de proteína sérica que envuelve tanto la superficie del implante como el coágulo de sangre el cual evoluciona a tejido de granulación y posteriormente a tejido óseo inmaduro.¹⁰ De esta manera los osteoblastos se dirigen hacia atrás, lejos del frente de mineralización, donde en algunas ocasiones quedan envueltos y se transforman en osteocitos sin laguna ósea, dando paso a la formación de tejido óseo inmaduro de una manera aposicional a partir de la superficie del implante hacia los espacios de corte del hueso conocida como osteogénesis por contacto. Por otro lado, la formación puede realizarse de manera contraria, a partir de los cortes óseos existentes hacia la superficie implantada conocida como osteogenesis a distancia, en esta los osteocitos localizados dentro de los bordes óseos cortados durante la implantación mueren debido a necrosis térmica, donde el hueso muerto resultante es reabsorbido por los osteoclastos, de esta manera los osteoblastos diferenciados migran a la superficie del hueso reabsorbido y forman una línea de cemento no colagenoso, que posteriormente continuará con la formación de una capa de colágeno rica en osteoblastos diferenciados, la mineralización continúa produciendo hueso por aposición.^{1,6}

El hueso primario incluye trabéculas de hueso reticular que será sustituido por hueso laminar y medula que a su vez serán reabsorbidos para la formación nueva de hueso. Entre la semana 1 y 2 el tejido óseo formado durante la estabilidad mecánica primaria, lateral a la región del implante, es reabsorbido y sustituido por hueso nuevo formado.¹⁰

La siguiente fase se concentra en orientar la remodelación para remplazar el tejido óseo primario para la formación de nuevo hueso en la zona laminar y optimizar la absorción de la fuerza oclusal. Al terminar la fase de remodelación alrededor del 60-70% de la superficie del implante ha sido cubierta por hueso.

1.1.4 Adhesión fibroblástica

Además de la osteointegración de tejidos duros actualmente se reconoce que la integración tisular de los tejidos blandos a la zona transmucosa del implante es necesaria para el buen pronóstico del implante ante el sellado del hueso alveolar con respecto al ambiente bucal, en ciertas ocasiones el epitelio muestra una tendencia a migrar apicalmente cuando no existe un correcto soporte de tejido conectivo. La invasión bacteriana y la aposición de biofilm en zonas expuestas de la superficie del implante condiciona al desarrollo de condiciones inflamatorias e infecciosas que pueden alterar la cicatrización inicial así como el comportamiento a largo plazo del implante expresando condiciones como recesiones gingivales o resorciones óseas, es por este motivo que es fundamental la formación y estabilización de los tejidos blandos para la protección biológica de las estructuras periimplantarias así como para la estabilización e integración inicial del implante.^{2,11}

El periodonto es el tejido que rodea y soporta al diente, en condiciones naturales se conforma por: hueso, encía, cemento y ligamento periodontal. El ligamento periodontal incluye fibroblastos del ligamento periodontal, elementos neurovasculares, células epiteliales, cementoblastos, osteoblastos y sus precursores, de igual forma presenta un alto número de macromoléculas. Por otro lado el cemento posee funciones importantes en el recubrimiento de la raíz y como base de anclaje para las fibras del ligamento, de igual manera mantiene la adaptación oclusal, protección pulpar, reparación de lesiones apicales etc. El tejido periodontal se encuentra habitado principalmente por fibroblastos gingivales y del ligamento periodontal, los cuales tienen un papel importante en el desarrollo, función y regeneración de las estructuras de soporte, se involucran en la producción de la matriz extracelular, mantienen la síntesis e integración del tejido conectivo, y participan en los procesos de reparación, remodelación y regeneración.¹²

La adhesión celular juega un papel importante en el éxito o fracaso de implantes dentales, células como lo son osteoblastos y fibroblastos son dependientes del anclaje de adhesión para sobrevivir. Los fibroblastos poseen una superficie de carga

negativa y participan en la producción de componentes esenciales del tejido conectivo como lo son la producción de glucosaminoglicanos y fibras de colágeno. Existen dos tipos de adhesión celular: adhesión de células unas a otras y adhesión por unión con proteínas. Los implantes dentales se encuentran cubiertos por 3 tejidos distintos: epitelio, tejido conectivo y hueso, la mucosa adyacente al implante es un tejido de cicatrización que posee menor número de células y más fibras, por lo tanto puede ser menos efectiva en la encapsulación de lesiones. La orientación de las fibras de colágeno es diferente entre un diente natural y un implante; en un diente natural las fibras corren principalmente de forma perpendicular u oblicua con respecto al mismo con inserción en el cemento, en el caso de un implante estas poseen una trayectoria paralela puesto que no existe cemento ni formación de un ligamento periodontal, si no que existe una unión estructural y funcional directa entre el hueso y el implante. Por lo que una aumento en la adhesión de fibroblastos a la superficie implantaría podría significar un sellado biológico más eficiente, de igual manera una mayor adhesión celular ayuda a la integración del implante al tejido conectivo pues se involucra en la formación de la matriz inicial del proceso de formación ósea, mejora la vascularización y disminuye la encapsulación fibrosa e infección bacteriana.¹³

La fase de nueva formación tisular se inicia con la formación del tejido de granulación, la transición de una fase catabólica a una anabólica necesita la activación de 3 grupos celulares: células endoteliales, fibroblastos y células epiteliales; las células endoteliales son necesarias en la formación de nuevos capilares derivadas de las células originales en sangre, los fibroblastos se derivan del tejido conectivo o por transición epitelio-mesenquimatosa, las células epiteliales se derivan de los queratinocitos y contribuyen a la reepitelización. Se ha encontrado una menor cantidad de fibroblastos y más fibras colágeno en el tejido conectivo alrededor de implantes comparado con los encontrados en dientes naturales; no obstante el número de fibroblastos adyacentes a la superficie es alto y se encuentran interpuestos entre las fibras colágeno orientadas de forma paralela.¹⁴

Posterior al posicionamiento del implante, el proceso de reparación del tejido conectivo incluye distintas fases: formación y adhesión del coágulo de fibrina a la superficie, absorción de las proteínas de la matriz extra celular y células del tejido conectivo y finalmente la migración de las células epiteliales hacia el coágulo de fibrina. El tejido conectivo se divide en 2 zonas, la zona interna se encuentra en contacto directo con la superficie, es rica en fibras con presencia de fibroblastos que se muestran en contacto con el componente transmucoso del implante, esta capa de fibroblastos juega un importante papel en el mantenimiento de un sellado entre el ambiente oral y el hueso peri-implantario.¹⁵

1.1.5 Diseño y modificación de superficie

El éxito clínico de los implantes dentales a base de Titanio (Ti) se relaciona directamente con la rapidez y efectividad del proceso de osteointegración, dónde el diseño, geometría así como las propiedades físico-químicas de la superficie juegan un papel importante. El Ti ha sido empleado como material de implantación debido a sus propiedades mecánicas así como su alta biocompatibilidad *in vitro* e *in vivo* que permite un alto contacto óseo, no obstante la adhesión celular a este material no es siempre óptima por lo que las formulaciones y las características de los implantes han sido modificadas para inducir propiedades biológicas que favorezcan los mecanismos de la osteointegración. La superficie del implante dental debe ser capaz de permitir y soportar la proliferación y diferenciación de las células del huésped hasta la maduración de los osteoblastos y fibroblastos.^{9,16,17,18}

En este sentido algunas de las propiedades que han mostrado afectar la modulación del proceso incluyen la topografía, química, energía de la superficie e hidrofiliidad mostrando que su modificación puede mejorar el proceso. Las modificaciones en la superficie incluyen modificaciones físicas y topográficas a nivel macro, micro y nano como lo son técnicas de revestimiento, rugosidad, porosidad, arquitectura por patrón, nanoestructuras entre otras; de igual manera pueden realizarse modificaciones químicas con plasma, oxidación, inducción de hidrofiliidad (o humectabilidad) entre otros.¹⁹

1.1.5.1 Modificaciones físicas topográficas

A través de la continua modificación de los implantes dentales se ha identificado a la topografía de la superficie como uno de los factores que posee mayor influencia y reacción en los tejidos ante la colocación quirúrgica de los mismos, incluyendo a la rugosidad como uno de los parámetros de modificación.²⁰

La rugosidad de la superficie de Ti induce una excelente respuesta celular (figura 4). Esta puede obtenerse al impactar partículas que consisten en TiO_2 , Al_2O_3 , u otras sustancias contra la superficie a cierta presión para producir irregularidades, de igual manera puede conseguirse por métodos físicos de grabado ácido, abrasión, medios de revestimiento (apatita o cuentas sintetizadas), spray de plasma, nanotopografía o por una combinación de las mismas, tal es el caso de las superficies micro-rugosas de tecnología SLA (por sus siglas en inglés) comercialmente disponibles con tratamiento de arenado por grano grande y grabado ácido que han mostrado promover la diferenciación osteoblástica, incrementar la producción de factores osteogénicos, citoquinas, factores de crecimiento y el contacto óseo al implante. Superficies tratadas mediante grabado ácido en el cual se utilizan ácidos fuertes como ácido sulfúrico, hidrófluorhídrico o nítrico para modificar y limpiar la superficie, muestran una resistencia cuatro veces mayor al par de extracción (herramienta que evalúa la calidad de la unión en la

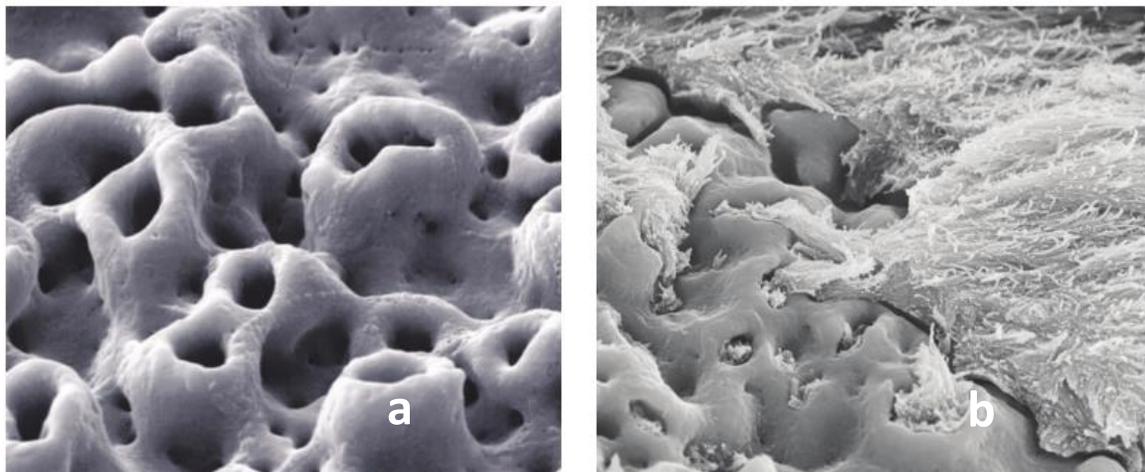


Figura 4 Ejemplo de microestructura por porosidad en implante NobelReplace a), adherencia ósea en la microestructura b) Fuente: Smeets 2015

interfase entre el hueso y la superficie del implante) comparada con superficies únicamente torneadas. De igual manera las superficies arenadas muestran un aumento en el contacto óseo en comparación con las superficies torneadas donde el hueso nuevo formado creció a partir de la superficie arenada mediante una osteointegración a contacto.^{20,21}

Las modificaciones mediante nanoestructuras con rangos entre 1-100 nm han alcanzado gran interés en la investigación de superficies de implantes; el trabajo realizado con cerámicas de nanofase ha mostrado un incremento en la adhesión celular, diferenciación y expresión de la matriz cuando existe una superficie con un tamaño de grano igual o menor a 60nm. Se ha observado que las superficies de Ti modificadas topográficamente con microretención muestran de igual manera altas tasas de éxito en ensayos clínicos así como en la proliferación, diferenciación y adhesión celular *in vitro* por lo que su uso en el desarrollo de nuevas tecnologías de implantes dentales ha sido comúnmente utilizada.^{19,22}

1.1.5.2 Modificaciones químicas

Ciertas modificaciones de superficie poseen efectos químicos cuando estas son adheridas a las físicas o topográficas, generando respuestas óseas más fuertes y efectivas comparadas con el proceso de rugosidad únicamente.²¹ Recubrimientos de varias formas de fosfato de Calcio e hidroxiapatita han sido utilizados ante su similitud con los minerales óseos desde la década de los 80s (Figura 5), que han mostrado clínicamente funcionalidad a largo plazo así como una respuesta ósea rápida con potencial aplicación en casos complejos como pacientes con osteoporosis o de calidad ósea disminuida. Dentro de las modificaciones químicas a su vez se encuentran otros procesos como lo son

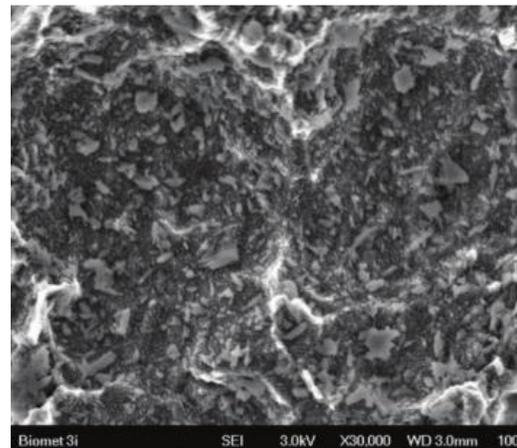


Figura 5 Ejemplo de recubrimiento con Fosfato de Calcio (BIOMET 3i). Fuente: Smeets 2016

superficies modificadas con fluoruro, en el que se reduce la superficie de Ti sobre un cátodo para atraer el catión (ion fluoruro) en una solución de ácido fluorhídrico. Se ha reportado que bajas concentraciones de grabado de fluoruro de hidrógeno sobre superficies de Ti mejoran la unión entre la superficie y el hueso de manera considerable; en los casos en que se adicione a superficies arenadas mostró un aumento en la diferenciación osteoblástica *in vitro* así como un incremento *in vivo* de la formación de hueso. No obstante las superficies tratadas únicamente con revestimientos a base de fosfatos y fluoruro no han mostrado una osteointegración superior *in vivo* frente a su evaluación con superficies micro-retentivas existentes.²¹

Existen otro tipo de tratamientos como lo es la incorporación de estroncio a la capa de dióxido de Ti de las superficies, que ha demostrado una mejora en la osteoconductividad y tiempo de recuperación del tejido óseo así como un incremento en la deposición de hueso sobre la superficie, debido a sus similitudes químicas y físicas con el Calcio, de manera que puede acumularse en el esqueleto aumentando la formación ósea al inhibir la reabsorción por osteoclastos, o bien tratamientos para la biofuncionalización de la superficie que consiste en el revestimiento con componentes de la matriz extracelular ósea para aumentar las interacciones bioquímicas entre las que se encuentran el uso de citoquinas, plasma rico en factores de crecimiento, plaquetas, integrinas, inmovilización de proteínas, enzimas o péptidos entre otras; mediante métodos de fisioabsorción, unión covalente y sistema portador, los cuales han mostrado promover la adhesión proteica inicial y el alineamiento celular.^{23,24}

Recientemente el estudio de la hidrofiliidad de la superficie ha mostrado un aumento en las respuestas biológicas por lo que tratamientos para su inducción han sido desarrollados entre los que se encuentran tratamientos con calor, uso de sales, ácidos y tratamientos alcalinos.

1.1.5.2.1 Energía superficial

Físicamente para la generación de una superficie a partir de una masa, es necesaria una deformación de la misma, que reaccione en sentido contrario a las fuerzas de cohesión, con la finalidad de desplazar y repartir las moléculas o los átomos en el interior de la superficie dando paso a interfaces en la misma, en este sentido, las moléculas superficiales poseen una energía más elevada comparada con las localizadas en el núcleo, esta diferencia en la alteración de los enlaces intermoleculares representa la energía superficial que se define como el trabajo requerido para crear una nueva superficie en base al área, bajo condiciones de temperatura y presión constante.^{23,25}

La energía superficial tiene efecto sobre propiedades como la capilaridad y la humectabilidad de las superficies; la humectabilidad es una propiedad recientemente investigada en el área de implantes ya que juega un papel importante en relación con la absorción proteica y de igual manera sobre la adhesión y proliferación celular; la humectabilidad de una superficie se define como la resistencia de una gota líquida de mantenerse en equilibrio al contacto con un cuerpo sólido, dicho de otra manera es la capacidad de una superficie para que un líquido se disemine y se adhiera en ella.^{21,23,25,26}

La humectabilidad se mide de acuerdo al ángulo de contacto (Figura 6), alcanzando valores de 0° en superficies altamente hidrofílicas, así mismo han mostrado mantener la conformación y función de las proteínas, la capacidad de las células para adherirse y migrar hacia las superficies es dirigida por la absorción proteica, al ser afines las superficies hidrofílicas a las proteínas los procesos celulares se ven aumentados.¹

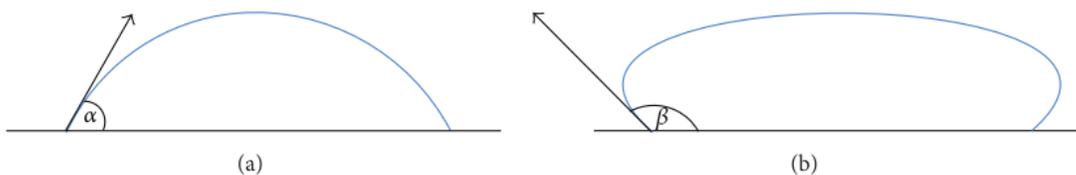


Figura 6 Concepto de hidrofiliicidad. Superficie hidrofílica a) exhibe un ángulo de contacto $<90^\circ$, comparada con superficie hidrófoba con ángulo $>90^\circ$ b). Fuente: Smeets 2015.

Por lo que se ha presentado la hipótesis de que una energía superficial más alta mejora la interacción del entorno biológico al aumentar la humectabilidad también definida como hidrofiliidad.

1.1.5.2.2 Superficies hidrofílicas

La energía superficial determina las propiedades hidrófilas o hidrófobas; cuando la superficie posee una carga superficial positiva, la superficie adquiere propiedades hidrofílicas o viceversa, algunas de las proteínas plasmáticas esenciales para la estabilización del implante son mejor absorbidas por estas superficies además de inducir a una mejor interacción entre el medio biológico y la superficie. El estudio hacía la hidrofiliidad de la superficie ha aumentado ante sus ventajas durante las fases iniciales de la recuperación ósea y los eventos que ocurren durante la osteointegración, estudios han mostrado que fibroblastos y células óseas cultivadas en superficies hidrofílicas expresan mayores marcadores de diferenciación comparadas con superficies hidrófobas.^{10,19}

Bajo condiciones naturales, el Ti se caracteriza por una delgada capa externa de TiO₂ que muestra afinidad con proteínas y minerales óseos, sin tratamientos específicos esta capa es rápidamente contaminada por la absorción de hidrocarburos y carbonatos provenientes del ambiente que le confieren una energía de superficie baja adquiriendo así propiedades hidrofóbicas que provocan que el material repela agua y por lo tanto fluidos tisulares con ángulos de contacto desde los 130-140°, adicional a la contaminación se ha encontrado que la modificación en la topografía de la superficie induce condiciones hidrofóbicas, creando un efecto negativo en el potencial osteointegrativo del implante.²⁷

Tanto modificaciones químicas y físicas pueden inducir superficies hidrofílicas, estas superficies muestran un descenso en la concentración de carbón, lo que provoca un incremento en la cantidad de oxígeno; en teoría, una superficie oxidada hidrofílica al entrar en contacto con el agua se une estructuralmente, formando grupos -OH y O₂ en la capa más externa. Otra teoría indica que una superficie de óxido hidroxilado genera una mayor reactividad hacía los iones, aminoácidos y

proteínas del fluido tisular.¹⁰ La hidroxilación se ha encontrado como un fenómeno común de la mayoría de las superficies metálicas oxidadas, las superficies de TiO₂ en contacto con soluciones acuosas muestran quimioabsorción de moléculas de agua formando grupos hidroxilo (OH). La alta energía superficial es sostenida por una superficie hidroxilada / hidratada que minimiza la absorción de hidrocarburos contaminantes y carbonatos del aire. Alternativamente, la solución de iones hidróxido se puede aplicar para mejorar la humectabilidad de la superficie del implante como se demuestra por Stadlinger.¹⁶

Posterior a los tratamientos alcalinos, los implantes a base de Ti han mostrado formación de apatita similar al hueso al encontrarse en una solución similar a la del cuerpo con concentraciones de iones aproximadas y se sugiere que los osteoblastos y las células osteogénicas reaccionan con estas formaciones de apatita lo que puede inducir el crecimiento y diferenciación.²⁸

El principal sistema con propiedades hidrofílicas es SLActive que ha sido modificado a partir de su predecesor SLA, éste se caracteriza por un alto nivel de hidrofiliidad y un contacto de agua de 0° mostrando influencia en la respuesta ósea temprana así como un mayor contacto hueso-implante comparado con SLA que posee propiedades hidrofóbicas. Para prevenir el contacto de contaminantes en la superficie estos implantes son bañados bajo protección de nitrógeno y se almacenan en soluciones salinas isotónicas hasta su inserción.^{1,21}

El tratamiento de la superficie del implante busca la modificación de la topografía y la energía de la superficie que inducen a la humectabilidad, incrementa la proliferación y crecimiento celular acelerando el proceso.²⁹

Las superficies hidrofílicas permiten la interacción del titanio con las células, fluidos biológicos y tejidos, así mismo permiten la formación de grupos de osteoblastos, fibroblastos y la expresión de genes osteogénicos. Diversos métodos han sido utilizados para mantener o inducir la hidrofiliidad del implante como lo son el arenado, grabado ácido o almacenamiento en soluciones salinas. Otra de las medidas utilizadas se ha basado en tratamiento alcalino y térmico, el uso de soluciones a base de hidróxido de sodio como tratamiento de la superficie ha

reportado una absorción proteica rápida y homogénea con una osteointegración consecuente.¹⁶

1.1.6 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La topografía de una superficie se caracteriza por una secuencia de picos y valles que se cuantifican usando diferentes perfiles y parámetros 2D y 3D.³⁰

A nivel micro, la micro-topografía de superficie está vinculada a la micro-rugosidad que se evalúa dentro de una escala de micrómetros (1-100 μm). Generalmente los parámetros utilizados para describir la rugosidad de una superficie son: R_a (Promedio del perfil de rugosidad) que es el valor promedio de la altura de manera bidimensional y S_a (promedio de rugosidad por área) tridimensional.^{23,30}

Existen diversos métodos para la evaluación de la topografía superficial entre los que se ubica la microscopía de fuerza atómica utilizada en la caracterización de superficie de muestras con características sólidas y

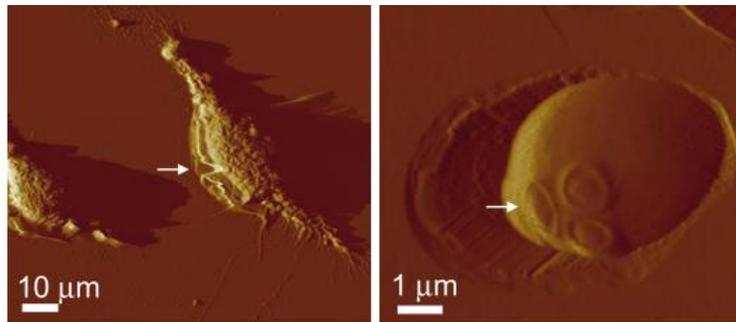


Figura 7. Ejemplo de imágenes AFM de macrófagos sobre cristal, representación en 3D Fuente: Heinisch 2012³¹

semisólidas relativamente planas así como estructuras biológicas (Figura 7). Permite la obtención de representaciones 2D y 3D a partir de imágenes topográficas de las superficies, así como parámetros como: valores en Z, rugosidad, tamaño, límites de grano, homogeneidad de partículas entre otras, de igual manera se utiliza en la determinación de propiedades mecánicas de los materiales, fuerzas de atracción, repulsión, viscosidad, elasticidad y dureza.³¹

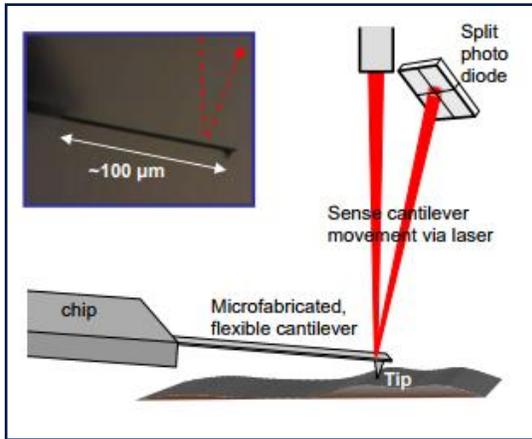


Figura 8 Componentes de Microscopio de Fuerza Atómica. Rodríguez 2013 ⁵²

El microscopio de fuerza atómica (Figura 8) es capaz de detectar fuerzas del orden de los nanonewton y puede realizar 2 tipos de medidas: imagen y fuerza. En la modalidad de imagen la superficie es barrida en el plano de la superficie de manera continua por una punta con direcciones X y Y conectada a un cantilever o listón, la muestra se encuentra montada en un escáner piezoeléctrico que permite el

posicionamiento tridimensional, durante el barrido la fuerza interatómica entre los átomos de la punta y los átomos en la superficie provocan una flexión o deflexión del cantilever, este cambio en el cantilever es registrada por un sensor mediante un haz láser reflejado en la parte posterior de éste y la posición del rayo reflejado se detecta mediante un fotodiodo sensible a la posición.³²

A nivel micro la topografía puede aumentar el contacto del hueso con la superficie incrementando así la conexión biomecánica. Así mismo los procesos biológicos óseos dependen de procesos de anabolismo y catabolismo donde la formación ósea y remodelación requieren espacios mayores a los 50 μm . La mayoría de los implantes comerciales expresan valores para R_a de 1-2 μm ; de acuerdo a Albrektsson y Wennerberg valores entre estos rangos proveen una rugosidad óptima para promover la osteointegración.¹

1.1.7 Ensayo MTT

En la actualidad ensayos de colorimetría basados en el uso de la sal de tetrazolium azul de tiazolio también conocido como MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) son comúnmente empleados en la determinación de la citotoxicidad, proliferación y viabilidad celular dentro de la biología celular al cuantificar el número de células metabólicamente activas durante ensayos *in vitro*.³³

El ensayo de MTT genera una solución acuosa de tonalidad amarillenta, la cual

mediante reducción por deshidrogenasas mitocondriales y agentes reductores presentes en células metabólicamente activas se obtiene un formazano de color azul violeta insoluble en agua (Figura 9). Se puede inferir actualmente que la cantidad de formazán MTT obtenido es directamente proporcional con la cantidad de células vivas. El ensayo se efectúa mediante la incubación de células con MTT, seguido por la extracción de los cristales de formazán de las células y disolución del mismo mediante solventes orgánicos, seguido por la evaluación de la absorbancia con espectrofotometría a 440 nm.^{33,34}

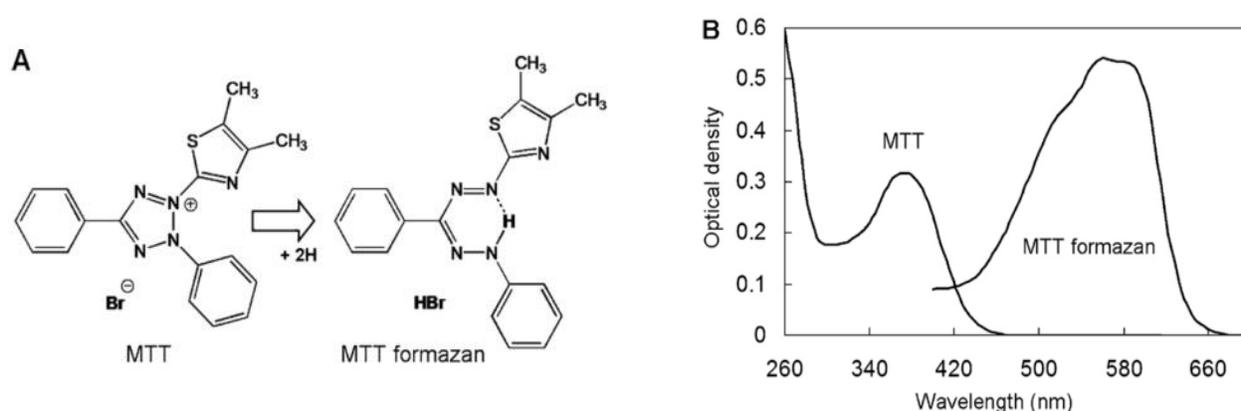


Figura 9 A) Estructura química del MTT y su reducción a formazan; B) espectro de absorción del MTT en agua destilada y formazan en aceite de girasol, en concentración (0.016 mg/ml). Fuente: Stockert 2012

La absorción espectroscópica es un método generalmente utilizado en la determinación de las concentraciones de cromóforos en soluciones, actualmente es utilizado para cuantificar los componentes celulares y parámetros característicos de moléculas funcionales.

La espectrofotometría mide la interacción de moléculas con la radiación electromagnética,³⁵ cuando una onda encuentra a una molécula, esta puede cambiar la dirección de propagación (dispersión) o puede ser absorbida (absorbancia); en el último caso una molécula absorbe un fotón y su energía interna aumenta, entrando en un estado inestable, por lo que rápidamente libera esa energía sobrante y regresa a su estabilidad original, la energía liberada puede ser en forma de calor o radiación electromagnética.³⁶ La radiación solo se absorbe o emite en fotones y el conjunto de radiaciones electromagnéticas se llama espectro,

así mismo si se conoce el espectro de absorción de una molécula, se puede identificar con bastante exactitud.³⁵

La absorción de un soluto depende de la concentración por lo que es ideal para mediciones cuantitativas. De igual manera la longitud de absorción y la fuerza de absorción de una molécula no solo depende de la naturaleza si no del ambiente en donde se encuentre el cromóforo.³⁶

1.2 ANTECEDENTES

- ✓ Branemark 1965; En un estudio *In vivo* sobre la microcirculación en tibias de conejo con cámara de Ti se observó una integración perfecta entre el metal y el hueso.
- ✓ Park 2010; En un estudio piloto se aplicaron microrugosidades a superficies de Ti así como grabado ácido para investigar su efecto sobre la hidrofiliidad, la actividad osteogénica y proliferación celular de células de ratón preosteoblásticas MC3T3. Los resultados mostraron un aumento de la hidrofiliidad al aplicar microrugosidades; de igual manera el grupo con las microrugosidades indujo una mayor proliferación celular sin diferencia significativa entre grupos con respecto a la actividad osteogénica.³⁷
- ✓ Tugulu 2010; Superficies de Ti fueron divididas en 3 grupos: superficie de manufactura, superficie de manufactura con tratamiento de arenado y superficie de manufactura + arenado + grabado ácido térmico. Los tres grupos fueron tratados con una solución acuosa con 0.05M de NaOH para evaluar la súper hidrofiliidad. Los resultados mostraron que el tratamiento alcalino con NaOH adicionado a microrugosidades incrementa la hidrofiliidad de la superficie, así mismo la absorción proteica fue mayor en las superficies tratadas alcalinamente comparadas con las no tratadas.²⁷
- ✓ Lee 2012; Se confeccionaron discos de Ti comercialmente puro y Ti-8tantalum-3niobium tratado alcalinamente y con calor para evaluar las propiedades de superficie así como la respuesta biológica de células fetales de ratón. Los resultados mostraron una mayor proliferación celular así como una actividad de fosfatasa alcalina superior; de igual manera mostró un menor ángulo de contacto y mayor energía superficial comparada con el Ti comercialmente puro.²⁸
- ✓ Al Mustafa 2013; En un estudio *in vitro* utilizando aleación de Ti-6AL-4V procesado mediante tratamiento alcalino a base de NaOH 0.05M se

- determinó la adhesión celular de fibroblastos gingivales y células óseas, los resultados arrojaron un incremento en la adhesión celular de fibroblastos gingivales y células óseas comparado con superficies no tratadas.¹⁶
- ✓ Held 2013; En un estudio *in vivo* se posicionaron 35 implantes hidrofílicos en 10 pacientes con calidad ósea clase 3 y 4, donde se evaluó torque de inserción, resistencia táctil, y nivel vertical óseo en periodos de 4,8,12 semanas y un año, observando un éxito de 34 implantes aún con compromiso óseo.⁸
 - ✓ Alfarsi 2014; Se evaluaron 3 superficies para implantes: Liso, Superficie con micro-rugosidad (SLA) e hidrofílicas con micro-rugosidad (SLA activado), para cuantificar la adhesión y activación plaquetaria. Los resultados mostraron una menor adhesión plaquetaria en la superficie SLA comparada con las otras superficies, sin embargo la superficie SLA mostró los niveles más altos en activación plaquetaria.⁷
 - ✓ Ernst 2014; Se compararon 36 implantes con superficie de Titanio anodizado altamente cristalino y enriquecido con fosfato contra 36 implantes hidrofílicos (SLA), los cuales fueron insertados en el hueso pélvico de 6 ovejas maduras, se evaluó el contacto hueso-implante y estabilidad, sin encontrar una diferencia estadísticamente significativa en el contacto hueso-implante entre ambos grupos.³⁸
 - ✓ Lee 2015; En un estudio *in vivo* se compararon 5 implantes hidrofílicos (modSLA) contra 5 implantes anodizados (hidrofóbicos), los cuales fueron insertados en la tibia de 5 conejos (un implante por cada tibia) para evaluar contacto hueso-implante y área ósea obteniendo mayores resultados en los implantes modSLA del grupo hidrofílico en la evaluación de contacto hueso-implante, sin encontrar diferencias significativas en la prueba para el área ósea.¹⁷
 - ✓ Lee 2015; Se prepararon discos de 3 tipos de Titanio; discos de manufactura, discos hidrofílicos (SLA) y discos SLA con microrugosidad. Posterior a la

evaluación de la topografía el ángulo de contacto y energía superficial fueron determinados. Fibroblastos gingivales humanos y células osteoblásticas murinas fueron cultivadas e insertadas en perros Beagle, que posteriormente fueron eutanasiados para la evaluación de adhesión de proteínas mediante ensayo de inmunofluorescencia, donde los resultados arrojaron mejores resultados para todas las evaluaciones en el grupo de superficies SLA con microrugosidad.

CAPÍTULO II

2.1 Planteamiento del problema

El edentulismo dental total o parcial es una condición que a pesar de haber disminuido su prevalencia, actualmente se presenta considerablemente en la población; se describe como la pérdida de la dentición natural de manera irreversible y constituye una pérdida de la integridad física resultado de enfermedades bucales prevalentes (caries y enfermedad periodontal) o resultado secundario ante motivos ortodóncicos, estéticos, requerimientos protésicos, traumatismo entre otros motivos.^{39,40}

De acuerdo a datos del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales en México en el 2015, menos del 1% de la población adulta evaluada (280,133 personas) presentaban pérdida total de la dentición, dentro del grupo de 80 años se encontró una prevalencia de 6.9% y un promedio de dientes presentes de 27.8 dentro de la población con edentulismo parcial.⁴¹

La Organización Mundial de la Salud integra a la salud bucal como elemento esencial para el mantenimiento de la salud general y calidad de vida además de favorecer la armonía craneofacial y la adecuada función bucal. En este sentido dentro de las opciones de tratamiento disponibles para el restablecimiento de la función estomatognática se encuentran las prótesis totales o parciales removibles, sin embargo, se ha encontrado que los usuarios de éstas presentan una cuarta parte de la capacidad masticatoria, además de problemas relacionados al uso de la misma como estomatitis, queilitis angular, candidiasis, úlceras traumáticas, aumento en la aparición de hiperplasias y disquinesia así como requerimientos estéticos no satisfactorios.⁴²

Por estas razones el uso de implantes dentales ha adquirido un papel importante en la rehabilitación de pacientes edéntulos a partir del trabajo de Branemark, debido a sus características estéticas, de biocompatibilidad, estabilidad así como su capacidad para recuperar la fisiología y anatomía radicular.⁴³

Branemark fue el primero en describir el proceso de oseointegración hace aproximadamente 45 años, sin embargo el requerimiento de obtener una

osteointegración completa enfocó la investigación hacia el potencial osteoinductivo de las superficies de los implantes durante la última década, introduciendo cambios en las propiedades de las mismas con métodos aditivos o de sustracción, mediante modificaciones con técnicas mecánicas, químicas, físicas y combinadas buscando el incremento del crecimiento y la proliferación celular.^{1,29}

Con fin de modificar las propiedades de la superficie como es el caso de la topografía, se han utilizado técnicas de arenado, grabado ácido, ionización, abrasión, creación de nanoestructuras entre otras; de igual manera se han desarrollado recubrimientos para las superficies o tratamientos con componentes bioactivos con la finalidad de inducir efectos en el medio biológico adyacente al implante. Actualmente el estudio de la humectabilidad como característica potencial en la inducción de las respuestas celulares se ha incrementado utilizando distintos métodos como el uso de soluciones salinas, fotocatalisis, tratamientos térmicos y recientemente el uso de tratamientos a base de Hidróxido de Sodio. Estas técnicas dan respuesta al aumento de la eficacia en la integración ósea y de tejidos blandos para el éxito clínico del implante que busca el restablecimiento de las funciones orales.^{18,43,44}

No obstante el estudio de los efectos citotóxicos en el ambiente celular de estos métodos no está ampliamente estudiado ante su reciente empleo, por lo que es necesario continuar el estudio de sus efectos y aumentar la evidencia científica para sus posibles futuras aplicaciones clínicas a fin de asegurar la biocompatibilidad y eficacia de la técnica. Con base en lo anterior es posible plantear la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuáles son los efectos *in vitro* del tratamiento alcalino con hidróxido de sodio en placas de Ti sobre la adhesión y proliferación celular de fibroblastos del ligamento periodontal humano?

2.2 Justificación

El éxito a largo plazo de un implante dental está determinado por las reacciones bilaterales entre el material implantado y el medio biológico. Se relaciona directamente con el proceso de osteointegración que proporciona la estabilidad y dirección de las fuerzas masticatorias, así mismo el estudio de la implantación transmucosa indica la importancia de la estabilidad e integración del tejido blando y epitelial de unión para mantener un volumen suficiente de tejido conectivo que posea el mínimo infiltrado inflamatorio, no solo ayuda en las fases iniciales de integración, pues una inflamación crónica en la región transmucosa puede generar recesiones gingivales o procesos de peri-implantitis y finalmente está relacionado con las propiedades de biocompatibilidad del material en el medio local para mantener las funciones celulares fundamentales.^{45,46}

Los rangos de vida promedio y de éxito clínico de los implantes dentales son excelentes, no obstante, los reportes de fracaso siguen ocurriendo en un porcentaje de pacientes. El fracaso por implantación primaria debido a una deficiente osteointegración ocurre en 1-2% de los casos dentro de los primeros meses mientras que el fracaso por implantación secundaria aún después de la osteointegración representa 5% de la población y es causada principalmente por peri-implantitis ante colonización bacteriana, sobrecarga oclusal, deficiencia en la técnica quirúrgica etc.¹

La osteointegración deficiente se ha encontrado puede estar relacionada con condiciones sistémicas del paciente como diabetes mellitus, osteoporosis, medicación con bifosfonatos o ante procedimientos subsecuentes a radioterapia donde la calidad y cantidad de hueso se ve afectada.¹

La osteointegración conlleva a la agregación de células osteogénicas a la superficie del implante, el cual debe permitir la proliferación y diferenciación celular hasta la maduración por lo que el uso de implantes con modificaciones de superficie para acelerar la osteointegración sugieren una mejor opción de tratamiento; así mismo

buscan asegurar el máximo contacto óseo con el implante sin pérdida de hueso marginal.¹⁶

La inducción de la hidrofiliidad o humectabilidad en los sistemas de implantes ha sugerido una de las principales modificaciones de superficie al generar potencial osteogénico en las superficies pues incrementa el contacto de la superficie con los fluidos biológicos.²⁷

Numerosas técnicas han sido introducidas para reducir los niveles de contaminación por hidrocarburos y por consiguiente inducir la humectabilidad a la superficie, sin embargo algunas de ellas requieren alta inversión de tiempo, demandas técnicas o uso de productos químicos agresivos por lo que la búsqueda de métodos de inducción de la hidrofiliidad ha aumentado introduciendo a los tratamientos alcalinos como un método eficiente para la inducción de la humectabilidad.²⁷ En este sentido la implementación de tratamientos a base de hidróxido de sodio representa una excelente opción en el incremento de la humectabilidad pues proporciona un método con técnica reproducible, de bajo costo, tiempos cortos de trabajo y sin requerimientos de aparatología adicional, además de sugerir ventajas en la adhesión y proliferación celular.¹⁶

No obstante al tratarse de una técnica recientemente introducida el efecto de los agentes utilizados en el ambiente bucal así como el impacto citotóxico de los mismos al contacto con las células no han sido estudiados ampliamente por lo que la evaluación de su efecto y sus beneficios deben realizarse mediante pruebas de citotoxicidad. El desarrollo de esta investigación proporcionará información a la odontología basada en evidencias sobre los efectos in vitro de estos agentes sobre la adhesión celular inicial y citotoxicidad para su enfoque a nuevas líneas de investigación para su consideración de uso en la terapia de implantes.

2.3 Objetivo

Determinar los efectos del tratamiento alcalino con hidróxido de sodio sobre placas de Ti en la adhesión de FLPH y proliferación de los mismos usando un bioensayo de colorimetría rápida de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolio (MTT) para determinar la viabilidad celular y la adhesión celular.

2.4 Objetivos específicos

- Observar y medir la micro-rugosidad de superficie y definir los valores para Ra y RMax de ambos grupos mediante evaluación con Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).
- Cuantificar la adhesión celular de FLPH sobre las superficies de los grupos control y con modificación alcalina mediante el método de MTT.
- Cuantificar la proliferación celular a 24 y 48 horas de los mismos grupos mediante método de MTT.

2.5 Pregunta de investigación

¿Cuáles son los efectos *in vitro* del tratamiento alcalino con hidróxido de sodio en placas de Ti sobre la adhesión y proliferación celular de fibroblastos del ligamento periodontal humano?

2.6 Hipótesis

- Hipótesis de investigación:

El tratamiento alcalino con hidróxido de sodio sobre las placas de Ti muestra un efecto positivo en el incremento de adhesión y proliferación *in vitro* de fibroblastos del ligamento periodontal humano

- Hipótesis nula:

El tratamiento alcalino con hidróxido de sodio sobre las placas de Ti muestra un efecto igual o nulo en la adhesión y proliferación *in vitro* de fibroblastos del ligamento periodontal humano

CAPÍTULO III

3.1 Metodología

3.1.1 Diseño de estudio

- Tipo de estudio

Se realizó un estudio experimental comparativo *in vitro*

- Diseño

Basado en un estudio experimental puro

3.1.2 Universo de trabajo

Implantes de Titanio

3.1.3 Población

Superficies con modificación

3.1.4 Muestra

n=5

3.1.5 Criterios de selección

- Placas de Ti completamente puro
- Placas pulidas sin tratamientos previos de superficie
- Placas de superficie de topografía lisa

3.1.6 Operacionalización de variables

VARIABLES DEPENDIENTES

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Análisis
Adhesión celular	Es la habilidad de una célula individual para unirse a otra célula, matriz extracelular, sustrato o superficie mediante una unión de anclaje. ⁴⁷	La modificación en la adherencia celular inducida por el tratamiento con NaOH de las placas de Ti al contacto con FLPH será determinada mediante el método de MTT que mide el número de células metabólicamente activas.	Cuantitativa discreta	Razones 0-n N° de células adheridas	Kruskal-Wallis Mann-Whitney

Viabilidad celular	La capacidad de una célula para continuar con las funciones celulares en base a la evaluación del crecimiento, reproducción, metabolismo, algunos grados de respuesta y adaptabilidad, relacionada con el número de células vivas. ⁴⁸	La modificación en la viabilidad celular inducida por el tratamiento con NaOH de las placas de Ti al contacto con FLPH será determinada mediante el método MTT, que mide el número de células metabólicamente activas	Cuantitativa discreta	Razones 0-n N° de células viables	Kruskal-Wallis Mann-Whitney
--------------------	--	---	-----------------------	--------------------------------------	------------------------------------

VARIABLES INDEPENDIENTES

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Análisis
Hidróxido de Sodio	Sólido cristalino, blanco, inodoro, delicuescente y soluble en agua. ⁴⁹	Sustancia utilizada como tratamiento alcalino para la remoción de contaminantes	Cualitativa	Nominal 0.5 M	Ninguno
Topografía superficial	Principios y técnicas dirigidos a la descripción gráfica de las características de una superficie. ³⁰	Observación y determinación de valores R_a y R_{max} de la topografía de la superficie de Ti, mediante evaluación de microscopía de fuerza atómica con área de $80 \times 80 \mu\text{m}$	Cualitativa	Intervalos	Ninguno

3.1.5 Desarrollo del proyecto

Preparación de la muestra

Se realizó estudio experimental *in vitro* en la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad León, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), dentro del Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria en el Área de Nanoestructuras y Biomateriales. Titanio comercialmente puro (Ti: 99.5%; Tokuriki, Chiyoda-Ku, Tokyo, Japón) se utilizó para elaborar placas (n=5) con dimensiones iguales a 10x10x0.5 mm, las cuáles fueron colocadas en resina epóxica y pulidas con pulidor automático (160-200 rpm; Buehler, Lake Bluff, USA) así como con lija de agua de diferentes calibres (#400, 800, 1000, 1500 y 2000). El terminado de la superficie se realizó con suspensión diamantada policristalina de 0.05-1 μm , usando un paño pulidor (Chemomet, Buehler, Lake Bluff, IL, USA). Posterior al pulido, las placas fueron removidas de la resina y lavadas con agua destilada y etanol durante 5 minutos en ultrasonido y secadas bajo chorro de aire. Las muestras fueron empaquetadas y esterilizadas mediante tratamiento con autoclave.

Topografía de superficie

La superficie fue evaluada con AFM (Nanosurf FlexAFM, Liestal, Switzerland) para considerar los valores R_a y R_{max} en un área de 80x80 μm utilizando de acuerdo a ISO 4287:1997: Geometrical Products Specifications (GPS)-Surface texture: Profile method.

Tratamiento alcalino de la superficie

Las muestras experimentales fueron destinadas para modificarse con tratamiento alcalino a base de NaOH 0.5 M. Las muestras fueron sumergidas en una solución de NaOH y sonicadas por 45s. Las muestras se secaron a temperatura ambiente (23°C) dentro de la cámara de flúidos por 5 minutos y las células fueron inoculadas sobre las placas de Ti experimentales y control.

Cultivo celular

Fibroblastos del ligamento periodontal humano (FLPH) fueron obtenidos mediante extracción de tejido periodontal proveniente de terceros molares de un paciente de

18 años de edad, con previo consentimiento escrito de los padres. El proyecto fue autorizado por el Comité de Bioética de la ENES, UNAM, Unidad León. Los dientes extraídos fueron suspendidos en PBS; el tejido fue lavado dos veces con PBS y suspendido en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM Life Technologies, Gibco, Carlsbad, CA, USA) suplementado con 20% de suero fetal bovino inactivado con calor (FBS, Life Technologies, Gibco), 100µ/ml de Penicilina G y 100mg/ml de Sulfato de Estreptomicina (Life Technologies, Gibco). Las células fueron incubadas a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ durante dos semanas para el crecimiento exponencial con cambios en el medio de crecimiento cada tercer día. FLPH tuvieron una esperanza de vida alrededor de PDL 40(Population Doubling Level). Las células fueron desprendidas mediante el uso de 0.25% tripsina-0.025% EDTA-2Na en PBS para cada experimento.

Ensayo de la adhesión y proliferación celular

FLPH fueron sub cultivados como células adherentes en DMEM complementado con 10% FBS y antibióticos. Las células fueron inoculadas sobre las placas de Ti control y modificadas a una densidad 2x10⁶ células/ml. La inoculación se realizó inmediatamente después del tratamiento alcalino; 150µl fueron colocados en cada placa y se dejaron incubar a temperatura ambiente (23°C) durante 60 minutos. Las placas fueron lavadas dos veces con 150 µl de PBS para remover las células no adheridas. Para el ensayo de proliferación celular, las células fueron incubadas otras 24 horas a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%. Las células adheridas viables y las células de proliferación fueron determinadas mediante el método de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). 0.2mg/ml de agente MTT fue disuelto en DMEM+10%FBS durante 3 horas. El formazán fue disuelto con 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO); las células fueron recolectadas desde las placas de Ti y fueron transportadas a un plato de 96 pocillos, y posteriormente analizadas a 540 nm utilizando un lector de micro placa (Thermo Fisher Scientific). Los datos fueron reproducidos mediante un triplicado desde 3 experimentos independientes.

Análisis estadístico

El promedio, desviación estándar y porcentaje fue calculado. Los datos fueron sujetos al examen de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, Kruskal-Wallis y múltiples comparaciones de Mann Whitney. La significancia estadística fue considerada para $p < 0.05$ con un intervalo de confiabilidad a 95%.

CAPÍTULO IV

4.1 Resultados

4.1.1 Topografía de superficie

Los valores obtenidos para Ra y Rmax de las placas de Titanio evaluadas mediante AFM fueron $0.04 \pm 0.02 \mu\text{m}$ y $1.83 \pm 0.10 \mu\text{m}$ respectivamente. La figura +A y B muestran micrografías 2D y 3D de las placas de Titanio pulidas, con una superficie en su mayoría lisa con la presencia de algunas grietas y rugosidades sobre un área analizada de $80 \times 80 \mu\text{m}$.

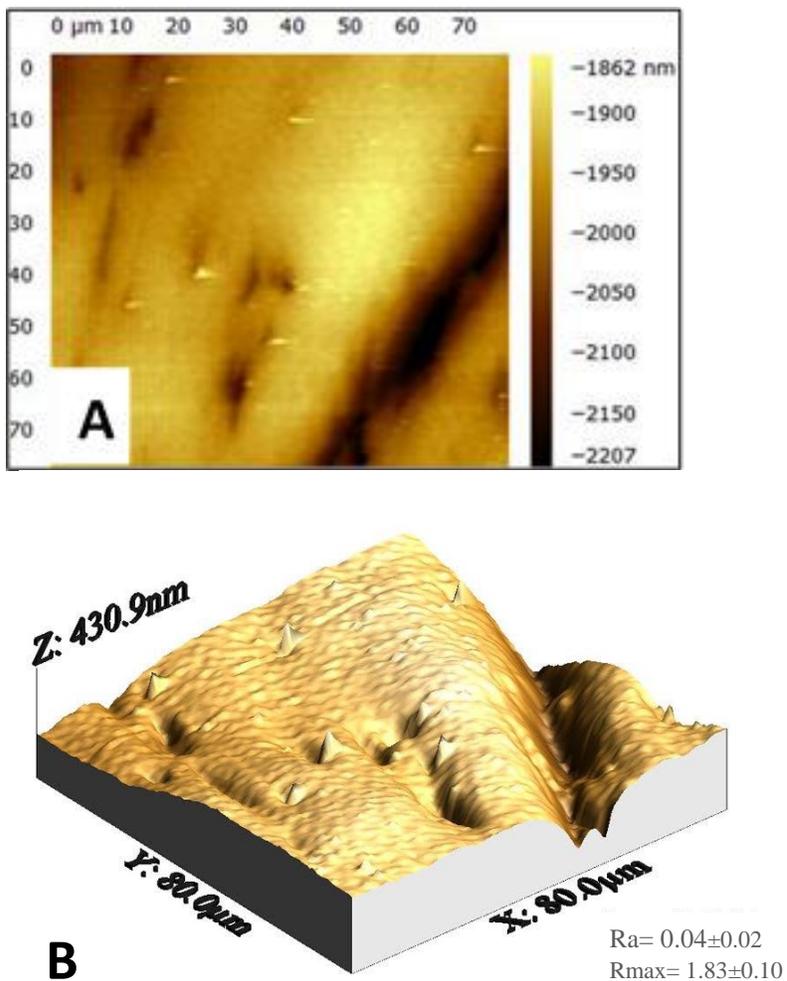


Figura 10 Micrografías AFM de rugosidad de superficie en placas de Titanio. Los valores de rugosidad correspondientes a Ra y Rmax de un área de $80 \times 80 \mu\text{m}$ se obtuvieron usando la modalidad tapping de acuerdo con ISO 4287:1997. A) micrografía 2D, B) 3D. Fuente propia.

4.1.2 Adhesión y proliferación celular

Las placas de Ti tratadas con hidróxido de sodio indujeron significativamente ($p < 0.05$) la adhesión de HPLF. El tratamiento alcalino causó una pronunciada adhesión celular ($p < 0.05$) para la línea de fibroblastos de ligamento periodontal comparada a las placas de Ti control (Figura*A) con 30% más células adheridas. La cuantificación de células con proliferación posterior a la incubación por 24 horas mostró 90% más células adheridas ($p < 0.01$) en placas de Titanio con NaOH, indicando una proliferación activa, comparada con las placas control (Figura*B).

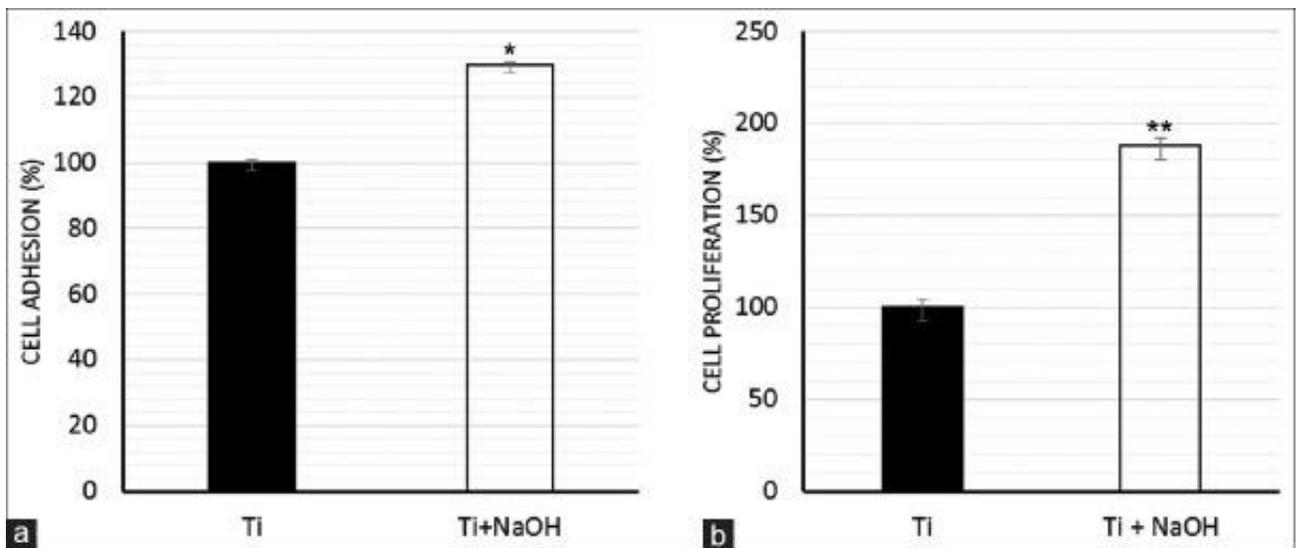


Figura 11 Efectos del tratamiento alcalino sobre la adhesión celular de fibroblastos del ligamento periodontal a) y proliferación b). Los datos fueron reproducidos en triplicado desde tres experimentos independientes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ basados en la prueba Mann-Whitney

4.1.3 Artículo de investigación publicado

Miryam Cuellar-Flores, Laura Susana Acosta-Torres, Omar Martínez-Álvarez, Benjamín Sánchez-Trocino, Javier de la Fuente-Hernández, Rigoberto García-Garduño, Rene García-Contreras. Effects of alkaline treatment for fibroblastic adhesion on Titanium. Dent Res J. 2016; 13:473-7

La carta de aceptación (anexo 1) y artículo publicado (anexo 2) se anexan en este documento.

DISCUSIÓN

El tratamiento con NaOH como modificación de superficie en implantes ha demostrado generar una absorción proteica rápida y homogénea a través de la hidrofiliidad y la atracción electrostática de las células. Las superficies hidrofílicas en implantes de Ti y su respuesta celular han sido estudiadas ante su potencial biológico bajo condiciones *in vitro* e *in vivo*. Este tratamiento propone el incremento de la activación celular, absorción proteica y la formación de la matriz de fibrina durante las fases tempranas de osteointegración para asegurar el éxito clínico. El estudio presente se enfocó en los efectos del tratamiento alcalino con NaOH como un acondicionador de superficies hidrofílicas para la adhesión celular de fibroblastos de ligamento periodontal humano. Consistente con otros hallazgos, la adhesión celular es generalmente mayor en superficies hidrofílicas tratadas con diferentes materiales y métodos entre las que se encuentra el uso de Hidróxido de Sodio.²¹²⁷¹⁹

De manera similar a nuestros resultados, el tratamiento alcalino fue efectivo para fibroblastos gingivales y las líneas celulares MG63 y L929 expuestos a una solución 5M de NaOH con incremento de la adhesión celular y proliferación celular en superficies de Ti.¹⁶ Acorde a nuestro protocolo, el tratamiento alcalino con Hidróxido de Sodio indujo la humectabilidad de superficies tratadas además de una absorción proteica homogénea. Por otro lado los resultados de proliferación en nuestra investigación coinciden con otros ensayos sin diferencia significativa después de 24 horas de incubación.^{16 27}

En cuanto al tratamiento con hidróxido de sodio Connor reporta que los principales eventos que ocurre sobre la capa de TiO_{2-x} bajo condiciones químicas suaves son la protonación y desprotonación de los grupos Ti-OH y los puentes oxigenados Ti-O-Ti, Boehm mostró además que el intercambio de protones se llevó a cabo incluso a concentraciones de 1mM y a concentraciones de NaOH de 0.5M el 70-75% de los sitios ácidos OH en la superficie del Ti se desprotonaron, bajo condiciones más extremas se reporta una disolución parcial de la capa de TiO_{2-x} .^{50 27}

Se ha reportado que la contaminación de la superficie por hidrocarburos muestra una disminución en la humectabilidad de la superficie, en este sentido Connor y Tugulu reportan que el tratamiento con Hidróxido de Sodio es efectivo en la remoción de contaminantes de acuerdo a resultados de espectroscopía de fotoelectrones de rayos X al mostrar una reducción en la concentración de carbón absorbido post tratamiento. De acuerdo a estos reportes se puede fundamentar que el efecto del tratamiento alcalino aumenta la humectabilidad ante la remoción de contaminantes y el aumento de la energía superficial por protonación de la superficie que coincide con los resultados reportados en este trabajo. ²⁷

Por otro lado, la rugosidad de superficie juega un papel importante en la adhesión celular y la proliferación. La variación de la rugosidad superficial puede alterar los resultados de adhesión; superficies muy lisas y pulidas se infiere, pueden generar menores rangos de adhesión debido a condiciones mecánicas puesto que existe poca fricción para permitir un anclaje adecuado, de igual forma se relaciona con el aplanamiento de las células sobre dichas superficies lo que impide su nutrición a largo plazo, por otro lado modificaciones topográficas con alta aspereza en la superficie han demostrado disminuir la humectabilidad de la superficie creando superficies hidrofóbicas, de igual manera crestas con demasiada distancia solo alcanzaran un contacto máximo con el hueso o bien pueden ser percibidas estas crestas como superficies planas por si mismas con las desventajas ya mencionadas; en este sentido la mayoría de sistemas de implantes expresan valores para R_a entre 1 y 2 μm , de acuerdo a Albrektsson y Wennerberg valores entre estos rangos proveen una rugosidad óptima para promover los procesos de integración, valores acordes a los promedios reportados en este estudio. ^{51 1}

Los principales hallazgos de la investigación soportan evidencia sobre que el tratamiento con hidróxido de Sodio permite propiedades hidrofílicas sobre las superficies de las placas de Ti e induce la adhesión de células y la proliferación de fibroblastos de ligamento periodontal humano ante el incremento en el número de células viables consistente con estudios previos. El protocolo reportado parece ser un método relativamente rápido y reproducible para la determinación del número de células adheridas utilizando un ensayo *in vitro* de células metabólicamente activas

Este estudio es preliminar y una de sus limitaciones fue la recuperación del número total de células adheridas sobre las placas de Titanio con DMSO, pues se sugiere que una pequeña cantidad de células pueden permanecer sobre la superficie. Experimentos futuros requieren un tiempo de incubación más pronunciado (4 o 5 horas) del agente MTT para inducir el formazan y recuperar el número total de células con DMSO. Futuras investigaciones deben enfocarse en la evaluación de la duración del proceso y los cambios morfológicos que surgen, como contar las células redondas y planas en la superficie metálica así como medir el área adjunta y el perímetro de las células en las placas como se informó anteriormente. También, es necesaria una evaluación *in vivo* para obtener mayor evidencia científica. El tratamiento de placas de Ti con NaOH induce la adhesión celular y la proliferación celular de fibroblastos del ligamento periodontal sobre la superficie. Estos datos ayudan a ilustrar el posible efecto de la hidrofiliidad en el proceso de formación del hueso en la superficie de Titanio. Clínicamente, el tratamiento alcalino de implantes de base de Titanio puede ser una opción para inducir y acelerar la osteointegración.

Conclusión

El tratamiento de placas de Ti con NaOH aumenta de manera significativa la adhesión celular y proliferación de fibroblastos del ligamento periodontal humano. Clínicamente el tratamiento alcalino de implantes con base de Ti puede representar una opción pre-operatoria para inducir y acelerar la integración de tejidos blandos y duros.

Referencias bibliográficas

1. Smeets R, Stadlinger B, Schwarz F, et al. Review article: Impact of dental implant surface modifications on osseointegration. *BioMed Research International*.2016; 2016-16.
2. Schwarz F, Wieland M, Schwartz Z, et al. Review potential of chemically modified hydrophilic surface characteristics to support tissue integration of titanium dental implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008; 88(2):544-557.
3. Jorge JRP, Barão VA, Delben JA, Faverani LP, Queiroz TP, Assunção WG. Titanium in dentistry: Historical development, state of the art and future perspectives. *J Indian Prosthodont Soc.* 2013;13(2):71-77.
4. Ananth H, Kundapur V, Mohammed HS, Anand M, Amarnath GS, Mankar S. A review on biomaterials in dental implantology. *Int J Biomed Sci.* 2015; 11(3):113-120.
5. Stadlinger B, Pilling E, Huhle M, et al. Influence of extracellular matrix coatings on implant stability and osseointegration : an animal study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007; 83(1):222-231.
6. Kuzyk P, Schemitsch E. The basic science of peri-implant bone healing. *Indian J Orthop.* 2011;45(2):108.
7. Alfarsi MA, Hamlet SM, Ivanovski S. Titanium surface hydrophilicity enhances platelet activation. *Dent Mater J.* 2014;33(6):749-756.
8. Held U, Rohner D, Rothamel D. Early loading of hydrophilic titanium implants inserted in low-mineralized (D3 and D4) bone: one year results of a prospective clinical trial. *Head Face Med.* 2013;9:9-37.
9. Kubies D, Himmlová L, Riedel T, et al. The interaction of osteoblasts with bone-implant materials: 1. The effect of physicochemical surface properties of implant materials. *Physiol Res.* 2011; 60:95-111.

10. Sartoretto SC, Terezinha A, Novellino N, Figueiredo R, Resende B. Early osseointegration driven by the surface chemistry and wettability of dental implants. *J Appl Oral Sci.* 2015;23(3):279-287.
11. Baltriukienė D, Sabaliauskas V, Balčiūnas E, Melninkaitis A, Liutkevičius E, Bukelskienė V, Rutkūnas V. The effect of laser-treated titanium surface on human gingival fibroblast behavior. *J. Biomed Mater Res A.* 2014; 102(3):713-20
12. Pivodovaa V, Frankovaa J, Ulrichovaa J. Osteoblast and gingival fibroblast markers in dental implant studies. *Biomed Pap.* 2011;155(2):109-116.
13. Hamdan M, Blanco L, Khraisat A, Tresguerres IF. Influence of titanium surface charge on fibroblast adhesion. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2006; 8:32-38.
14. Sculean A, Gruber R, Bosshardt DD. Soft tissue wound healing around teeth and dental implants. *J Clin Periodontol.* 2014;41:56-522.
15. Satué M, Gómez-Florit M, Monjo M, Ramis JM. Improved human gingival fibroblast response to titanium implants coated with ultraviolet-irradiated vitamin D precursor and vitamin E. *J Periodontal Res.* 2016;51(3):342-349.
16. Al Mustafa M, Agis H, Müller H-D, Watzek G, Gruber R. In vitro adhesion of fibroblastic cells to titanium alloy discs treated with sodium hydroxide. *Clin Oral Implants Res.* 2015; 26 :15-19.
17. Lee H, Yang I, Kim S, Yeo I, Kwon T. In vivo comparison between the effects of chemically modified hydrophilic and anodically oxidized titanium surfaces on initial bone healing. *J. Periodontal Implant Sci.* 2015; 45:94-100.
18. Carvalho DR De, Carvalho PSP De, Magro Filho O, de Mello JDB, Beloti MM, Rosa AL. Characterization and in vitro cytocompatibility of an acid-etched titanium surface. *Braz Dent J.* 2010; 21(1):3-11.
19. Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A.* 2005;74(1):49-58.

20. Vlacic-Zischke J, Hamlet SM, Friis T, Tonetti MS, Ivanovski S. The influence of surface microroughness and hydrophilicity of titanium on the up-regulation of TGF β /BMP signalling in osteoblasts. *Biomaterials*. 2011; 32(3):665-671.
21. Yeo I. Reality of dental implant surface modification : a short literature review. *Open Biomed Eng J*. 2014; 8:114-119.
22. Stanford CM. Surface modifications of dental implants. *Australian Dental Journal*. 2008; 53: S26-S33
23. Bruschi M, Steinmüller-Nethl D, Goriwoda W, Rasse M. Composition and modifications of dental implant surfaces. *J Oral Implant*. 2015; 2015:14.
24. Meng H, Chien EY, Chien H. Dental implant bioactive surface modifications and their effects on osseointegration : a review. *Biomark Res*. 2016:1-15.
25. Allex E, Alvares L, Caro S. Determinación de la energía superficial libre de cementos asfálticos colombianos. *Rev Ing E Investig Univ Nac*. 2009; 29(2): 20-24.
26. Rompen E, Domken O, Degidi M, Pontes AEP, Piattelli A. The effect of material characteristics, of surface topography and of implant components and connections on soft tissue integration: A literature review. *Clin Oral Implants Res*. 2006; 17(2):55-67.
27. Tugulu S, Löwe K, Scharnweber D, Schlottig F. Preparation of superhydrophilic microrough titanium implant surfaces by alkali treatment. *J Mater Sci Mater Med*. 2010; 21(10):2751-2763.
28. Lee B-A, Kang C-H, Vang M-S, et al. Surface characteristics and osteoblastic cell response of alkali-and heat-treated titanium-8tantalum-3niobium alloy. *J Periodontal Implant Sci*. 2012;42(6):248-255.
29. Jemat A, Ghazali MJ, Razali M, Otsuka Y. Surface modifications and their effects on titanium dental implants. *BioMed Research International* 2015; 791725: 11
30. Dohan Ehrenfest DM, Coelho PG, Kang BS, Sul YT, Albrektsson T. Classification of osseointegrated implant surfaces: Materials, chemistry and

topography. Trends Biotechnol. 2010; 28(4):198-206.

31. Heinisch JJ, Lipke PN, Beaussart A, et al. Atomic force microscopy - looking at mechanosensors on the cell surface. J Cell Sci. 2012; 125(18): 4189-4195.
32. Dufrene YF. Atomic Force Microscopy, a powerful tool in microbiology. J Bacteriol. 2002; 184(19):5205-5213.
33. Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva Á. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. Acta Histochem. 2012; 114(8):785-796.
34. Young FM, Phungtamdet W, Sanderson BJS. Modification of MTT assay conditions to examine the cytotoxic effects of amitraz on the human lymphoblastoid cell line, WIL2NS. Toxicol Vitro. 2005; 19(8):1051-1059.
35. Nilapwar SM, Nardelli M, Westerhoff H V., Verma M. Absorption spectroscopy. Method Enzymol. 2011; 500: 59-75.
36. Arenas I, López JL. *Espectrofotometría de Absorción*. Cuernavaca, Morelos; 2004. Disponible:
http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/espectrometria_de_absorcion.pdf
37. Park J-A, Leesungbok R, Ahn S-J, Lee S-W. Effect of etched microgrooves on hydrophilicity of titanium and osteoblast responses: A pilot study. J Adv Prosthodont. 2010; 2(1):18-24.
38. Ernst S, Sch P, Klein K, Ferguson SJ. Comparison of two dental implant surface modifications on implants with same macrodesign: An experimental study in the pelvic sheep model. Clin. Oral. Impl. Res. 2015; 26: 898-908.
39. Luengas-Aguirre MI, Sáenz-Martínez LP, Tenorio-Torres G, Garcilazo-Gómez A, Díaz-Franco MA. Aspectos sociales y biológicos del edentulismo en México : un problema visible de las inequidades en salud. Rev. Cienc. Clín. 2016; 16(2).
40. Fayad M, Baig M, Alrawaili A. Prevalence and pattern of partial edentulism among dental patients attending College of Dentistry, Aljouf University, Saudi

Arabia. J Int Soc Prev Community Dent. 2016;6(9):187.

41. Secretaría de Salud. Resultados del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales SIVEPAB 2015. 2015.
<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/212323/SIVEPAB-2015.pdf>.
42. Emami E, De Souza RF, Kabawat M, Feine JS. The impact of edentulism on oral and general health. Int J Dent. 2013; 2013(498305) :7
43. Contreras RG, Adachi K, Yokote Y, et al. Quantification of Enhanced osteoblastic adhesion to ultraviolet-treated titanium plate. In vivo. 2010; 524:519-523.
44. Zhang W, Li Z, Huang Q, et al. Effects of a hybrid micro/nanorod topography-modified titanium implant on adhesion and osteogenic differentiation in rat bone marrow mesenchymal stem cells. Int J Nanomedicine. 2013; 8:257-265.
45. Meza-Rodríguez A, Martínez-Álvarez O, Acosta-Torres L, De la Fuente-Hernández J, García-Contreras R. Fibroblast response to initial attachment and proliferation on titanium and zirconium surface. J Oral Res. 2016; 5(5):194-199.
46. Gómez-Florit M, Ramis JM, Xing R, et al. Differential response of human gingival fibroblasts to titanium- and titanium-zirconium-modified surfaces. J Periodontal Res. 2014; 49(4):425-436.
47. Khalili AA, Ahmad MR. A review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications. Int J Mol Sci. 2015;16(8):18149-18184.
48. Eynard AR, Valentich MA, Rovasio RA. *Histología y Embriología del ser humano: Bases celulares y moleculares*. 4a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008.
49. Picado AB, Álvarez M. *Química I: Introducción al estudio de la materia*. San José, Costa Rica: EUNED; 2008.
50. Connor PA, Dobson KD, James McQuillan A. Infrared spectroscopy of the TiO₂/aqueous solution interface. Langmuir. 1999;15(7):2402-2408.

51. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: A systematic review. Clin Oral Implants Res. 2009; 20(4):172-184.

52. Rodríguez G. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), modos de operación y aplicaciones. Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP); 2013. Disponible:
http://www.ictp.csic.es/ICTP2/sites/default/files/Gema_23072013.pdf

Anexos

Anexo 1. Carta de aceptación

Dear Dr. Garcia-contreras,

We are pleased to inform that your manuscript "Effects of alkaline treatment for fibroblastic adhesion on titanium" is now acceptable after clearing the dues for publication of the manuscript.

The payment for author-side fee can be done online through credit card or by a cheque. Please visit the journal's manuscript submission system and login into your account for the details

Once the payment is received at our end, the manuscript would be processed further and you would receive an edited version of article in about 2-3 weeks from now for a final check and correction.

We thank you for submitting your valuable research work to Dental Research Journal.

With warm personal regards,

Yours sincerely,

Maryam Khoroushi

Dental Research Journal

Original Article

Effects of alkaline treatment for fibroblastic adhesion on titanium

Miryam Cuellar-Flores¹, Laura Susana Acosta-Torres¹, Omar Martínez-Alvarez², Benjamin Sánchez-Trocino³, Javier de la Fuente-Hernández⁴, Rigoberto García-Garduño⁵, Rene García-Contreras¹

¹Interdisciplinary Research Laboratory, Nanostructures and Biomaterials Area, ²Oral and Maxillofacial Surgery Area, ³Oral Public Health, National School of Higher Education, Unit Leon, National Autonomous University of Mexico, Leon, ⁴Politecnich University of Guanajuato, Cortazar, Gto, ⁵Faculty of Dentistry, Autonomous University State of Mexico, Toluca, Mexico

ABSTRACT

Background: The surface energy of titanium (Ti) implants is very important when determining hydrophilicity or hydrophobicity, which is vital in osseointegration. The purpose of this study was to determine how Ti plates with an alkaline treatment (NaOH) affect the adhesion and proliferation of human periodontal ligament fibroblasts (HPLF).

Materials and Methods: *In vitro* experimental study was carried out. Type I commercially pure Ti plates were analyzed with atomic force microscopy to evaluate surface roughness. The plates were treated ultrasonically with NaOH at 5 M (pH 13.7) for 45 s. HPLF previously established from periodontal tissue was inoculated on the treated Ti plates. The adhered and proliferated viable cell numbers were determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide method for 60 min and 24 h, respectively. The data were analyzed using Kruskal–Wallis tests and multiple comparisons of the Mann–Whitney U-test, *P* value was fixed at 0.05.

Results: The mean roughness values equaled 0.04 μm with an almost flat surface and some grooves. The alkaline treatment of Ti plates caused significantly ($P < 0.05$) more pronounced HPLF adhesion and proliferation compared to untreated Ti plates.

Conclusion: The treatment of Ti plates with NaOH enhances cell adhesion and the proliferation of HPLF cells. Clinically, the alkaline treatment of Ti-based implants could be an option to improve and accelerate osseointegration.

Key Words: Cells, periodontal ligament, sodium hydroxide, titanium, wettability

Received: December 2015
Accepted: August 2016

Address for correspondence:
Dr. Rene García-Contreras,
Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria, Área de Biomateriales Dentales, Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, Blvd. UNAM 2011 Predio el Saucillo y el Potrero, Comunidad de los Tepetates, León, Gto, México.
E-mail: dentist.garcia@gmail.com

INTRODUCTION

The clinical success of titanium (Ti) implants in odontology is directly related to the osseointegration process, which results from the interaction between tissues and implant surfaces.^[1] Integration occurs when the implant comes into contact with the oral fluids and tissues after implantation in a host bond. This bilateral interaction will depend on the intensity of the mechanical and chemical irritation and the nature of

the implant surface.^[2] The increasing biocompatibility of Ti surfaces has been continuously researched.^[3] The characteristics of the implant surface are one of the factors that affect the rate of osseointegration. Some studies have determined that surface modifications include physical and morphological aspects such as roughness, porosity, topography,^[4] photocatalysis,^[5] and surface functionalized with extracellular matrix

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as the author is credited and the new creations are licensed under the identical terms.

For reprints contact: reprints@medknow.com

How to cite this article: Cuellar-Flores M, Acosta-Torres LS, Martínez-Alvarez O, Sánchez-Trocino B, de la Fuente-Hernández J, García-Garduño R, *et al.* Effects of alkaline treatment for fibroblastic adhesion on titanium. *Dent Res J* 2016;13:473-7.

Access this article online	
	Website: www.drj.ir www.drjournal.net www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1480

peptide^[6] to enhance the cellular adhesion. Moreover, chemical treatment alterations involving plasma, saline solutions, anodic oxidation, and hydroxyapatite^[7] have improved cellular aggregation.^[8]

The early phase of osseointegration occurs during the 1st week after implant positioning as this stage has the highest failure probability.^[3] The reactions induce biofilm formation, which regulates cellular responses. During the 1st week, bone formation starts as a result of osteoblasts differentiating, as well the production of osteogenic factors, cytokines, and growth factors. Primary bone includes trabeculae of woven bone, which will be replaced by lamellar bone and marrow bone that will in turn be reabsorbed for new bone formation.^[9] The initial phase of osseointegration leads to the aggregation of osteogenic cells to the implant surface, which should allow cellular proliferation and differentiation until maturation.^[9]

The surface energy of the implant plays an important role in determining the hydrophilicity or hydrophobicity of the surface, which is important in osseointegration. In general, when a positive charge exists, the surface acquires hydrophilic characteristics, which offers advantages in bone integration. Initially, some essential plasma proteins are absorbed by these surfaces, helping to enhance cell grouping and the expression of osteogenic genes.^[5,9]

Studies concerning the hydrophilicity of dental implants have become increasingly important as bone response increases osteogenic potential and osseous tissue formation in early bone response and therefore osteointegración.^[10-12] Current studies in human bone marrow-derived mesenchymal cells have demonstrated an increase in the gene expression levels of the markers and transcription runt-related factor 2, with bone sialoprotein also observed.^[11] *In vitro* tests show higher cell adhesion on hydrophilic surfaces such as photocatalysis^[5,13] compared to anodized coating with calcium phosphate on hydrophobic surfaces.^[11] As mentioned above, an increase in the hydrophilicity of the surface represents an increase in the adhesion of bone and gingival fibroblast cells not only on the apical surface of the implant but also on the accession of the peri-implant soft tissue. Both mechanisms would enhance osseointegration and reduce torsional forces.^[14,15] The processes used to maintain surface hydrophilicity may include acid etching,^[16] sandblasting and in saline storage, as well

as treatment with sodium hydroxide.^[15] The purpose of this study was to determine the effects of alkaline treated (sodium hydroxide) Ti plates in the adhesion of human periodontal ligament fibroblasts (HPLF) and proliferation of the cells using a rapid colorimetric 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) bioassay to determine cell viability of the cell attachment.

MATERIALS AND METHODS

Sample preparation

An *in vitro* experimental study was performed at the Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad León, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Interdisciplinary Research Laboratory, Nanostructures and Biomaterials area. Type I commercially pure Ti (Ti: 99.5%; Tokuriki, Chiyoda-Ku, Tokyo, Japan) was used to prepare 10 × 10 × 0.5 mm (*n* = 5 per group, control and experimental samples) plates because it is the most used in the manufacture of dental implants for biological properties, which were placed in epoxy resin and polished with an automatic polisher (160–200 rpm; Buehler, Lake Bluff, USA) and #400, 800, 1000, 1500, and 2000 water sandpaper. The surface was finished with a polycrystalline diamond suspension of 0.05–1 μm using a polishing cloth (Chemomet, Buehler, Lake Bluff, IL, USA). After polishing, the samples were removed and washed with distilled water and ethanol for 5 min in ultrasound and then blow dried. Samples were packed and sterilized using an autoclave treatment.^[13]

Surface topography

The surface was evaluated with atomic force microscopy (AFM) (Nanosurf FlexAFM, Liestal, Switzerland) to consider average roughness (R_a) and maximum roughness height within a sample length (R_{max}) area of 80 × 80 μm using the tapping mode according to ISO 4287:1997: Geometrical products specifications-surface texture: Profile method.

Alkaline surface treatment

Alkaline surface treatment was implemented based on published protocol. Experimental samples were intended for alkaline treatment modification with 0.5 M of NaOH (pH 13.7) (23°C). The samples were soaked in NaOH solution and sonicated for 45 s. The samples were then dried at room temperature (23°C) in the chamber fluid for 5 min, and the cells were inoculated on the control and experimental Ti plates.^[3]

Cell culture

HPLFs were obtained through periodontal tissue extraction of the third molar from an 18-year-old patient, with the prior written informed consent from the parents. The project was authorized by the Bioethics Committee of ENES, ENES Unidad León, UNAM, Unidad León. The extracted tooth was suspended in phosphate buffered saline (PBS); the tissue was washed twice with PBS and suspended in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM Life Technologies, Gibco, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 20% of heat inactivated Fetal Bovine Serum (FBS, Life Technologies, Gibco), 100 μ /ml penicillin G, and 100 mg/ml of sulfate streptomycin (Life Technologies, Gibco). The cells were incubated at 37°C with an atmosphere of 5% CO₂ for 2 weeks for exponential growth with changes in the growth medium every 3rd day. HPLF have an *in vitro* life expectancy of about 40 population doubling level. Cells were detached using 0.25% trypsin and 0.025% ethylenediaminetetraacetic acid-2Na in PBS for each experiment.^[13]

Assay of cell adhesion and proliferation

HPLF cells were subcultured as adherent cells in DMEM supplemented with 10% FBS and antibiotics. Cells were inoculated in each experimental and control Ti plate at 2×10^6 cells/ml. Cell inoculation was performed immediately after the alkaline treatment; 150 μ l was placed in each plate and allowed to incubate at room temperature (23°C) for 60 min. Plates were washed twice with 150 μ l of PBS to remove unattached cells. In case of cell proliferation, cells were incubated for a further 24 h at 37°C with 5% CO₂. The viable adherent and proliferated cells were determined by MTT method. Briefly, 0.2 mg/ml of a MTT reagent was dissolved

in DMEM + 10% FBS for 3 h. The formazan was dissolved with 100 μ l of dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA); cells were collected from Ti plates and were transported to a 96-well plate, and then analyzed at 540 nm using a microplate reader (Thermo Fisher Scientific). Data were reproduced in triplicate from three independent experiments.^[13]

Statistical analysis

The mean, standard deviation, and percentage were calculated. All data were subject to test for normality data by Kolmogorov-Smirnov (Lilliefors), Kruskal-Wallis tests, and multiple Mann-Whitney U-test comparisons. The significance was considered at $P < 0.05$ with a 95% interval confidence.

RESULTS

Surface roughness

The values obtained for R_a and R_{max} of the Ti plates were $0.04 \pm 0.02 \mu$ m and $1.83 \pm 0.10 \mu$ m, respectively. Figure 1a and b exhibits two-dimensional and three-dimensional AFM micrographs of polished Ti plates with an almost flat surface and some scratches and grooves on the $80 \times 80 \mu$ m analyzed area.

Cell attachment and proliferation

The treatment of Ti plates with sodium hydroxide significantly enhanced ($P < 0.05$) the adhesion of HPLF. The alkaline treatment caused more pronounced cell attachment ($P < 0.05$) for the HPLF line compared to the Ti control plates [Figure 2a] with 30% more adhered cells. The quantification of proliferated cells after incubation for 24 h showed 90% higher attached cells ($P < 0.01$) in Ti plates treated with NaOH, indicating an active proliferation, compared to control plates [Figure 2b].

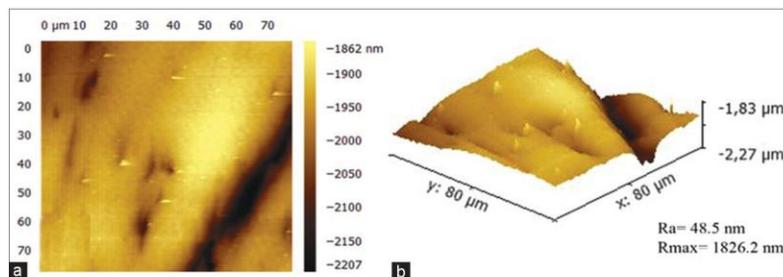


Figure 1: Micrographs of atomic force microscopy roughness of titanium plate surface. The roughness values corresponded to R_a and R_{max} of a $80 \times 80 \mu$ m area using the tapping mode in accordance with ISO 4287:1997. (a) Two-dimensional, (b) Three-dimensional micrograph.

Cuellar-Flores, *et al.*: NaOH-titanium for fibroblastic adhesion

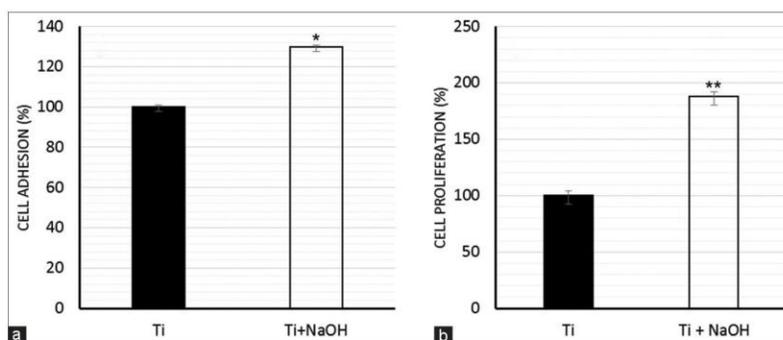


Figure 2: Effects of alkaline treatment on human periodontal ligament fibroblasts cell adhesion (a) and proliferation (b). Cells were subcultured as adherent cells in Dulbecco's Modified Eagle's Medium, supplemented with 10% fetal bovine serum. They were then inoculated on titanium plates at 2×10^6 cells/ml for 60 min for adhesion (a) and a further 24 h of incubation at 37°C with 5% CO₂ for proliferation. The viable adherent and proliferate cells were determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide method (0.2 mg/ml) and analyzed at 540 nm using a microplate. Reader values represent a mean \pm standard deviation. Data were reproduced in triplicate from three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ based on the Mann-Whitney U-test.

DISCUSSION

The treatment with NaOH has shown that this modification supports fast and homogeneous protein absorption through hydrophilicity and the electrostatic attraction to cells.^[17] Hydrophilic surfaces in Ti implants and cell response have been studied for their osteolytic potential *in vitro*^[11] and *in vivo*^[1] conditions. This treatment proposes increasing cell activation, protein intake, and the forming of fibrin matrix during the early phases of osseointegration for clinical success. This study focused on the effects of alkaline treatment with NaOH as a hydrophilic surface conditioner for cell attachment. Consistent with our findings, cell adhesion is usually greater on hydrophilic surfaces treated with different materials and methods including alkaline treatment.

On the other hand, similar to our investigation, alkaline treatment was effective for mouse osteoblast cell exposed to a 5 M solution of NaOH with 20% higher attachment and proliferation^[18] of the MC3T3-E1 mouse preosteoblast cell line to the hydrophilic surface.^[19] Similarly, another assay has reported better effects in the use of sodium hydroxide 0.05 M in monocyte and osteoblastic cell adhesion and platelet activation.^[17] Chemical modification with hydrochloric/sulfuric acids increased osteogenic differentiation in five primary human osteoblast cell lines.^[20] Proliferation results in our research coincide with other assays without significant difference after 24 h^[3,21] of incubation.

Surface roughness plays a very important role in cell attachment and bone proliferation. Varying

surface roughness alters adhesion results. This may be attributed to the additional use of surface modifications such as microgrooves as studies have reported that hydrophilicity on the surface may have a stronger effect on bone formation.^[1]

The main findings of the research support evidence that sodium hydroxide treatment allows hydrophilicity on the surface of Ti plates and enhances the attachment of cells and proliferation of HPLF by increasing the number of viable cells, coinciding with a previous study.^[13] The protocol reported here seems to be a reproducible and rapid method for determining the attached cell number using a metabolically active *in vitro* assay as previously reported.^[13] It is based on the conversion of yellow, water-soluble MTT to a purple, water-insoluble end product formazan using mitochondrial dehydrogenase. The amount of formazan formed is proportional to the number of metabolically active cells.^[22] The key steps in the assay are to incubate cells with MTT, extract the formazan crystals from the cells, dissolve the formazan, and measure absorbance between 540 and 570 nm.^[23]

This study is preliminary, and one of its limitations was the recovery of a number of total attached cells on Ti plates with DMSO, suggesting that a few cells can remain on the surface. Future experiments will require a longer incubation time (4 or 5 h) of the MTT reagent to enhance the formazan and recover the total number of cells with DMSO. Future research should be focused on evaluating the duration of the sprouting

process and the morphological features that arise, such as counting the round and flat cells on the metal surface and measuring the attached area and perimeter of cells in the plates as previously reported.^[5] Moreover, an *in vivo* evaluation is necessary to obtain more scientific evidence. The treatment of Ti plates with NaOH enhanced the cell attachment and proliferation of HPLF culture cells over the surface. These data help to illustrate the possible effect of hydrophilicity in the process of bone formation on a Ti surface.

CONCLUSION

The treatment of Ti plates with NaOH enhances significantly the cell adhesion and the proliferation of HPLF cells. Clinically, the alkaline treatment of Ti-based implants could be an option to improve and accelerate osseointegration.

Financial support and sponsorship

DGAPA-UNAM projects PAPIIT IA204516, IN225516 and PAPIME 210616.

Conflicts of interest

The authors of this manuscript declare that they have no conflicts of interest, real or perceived, financial or non-financial in this article.

REFERENCES

1. Lee HJ, Yang IH, Kim SK, Yeo IS, Kwon TK. *In vivo* comparison between the effects of chemically modified hydrophilic and anodically oxidized titanium surfaces on initial bone healing. *J Periodontal Implant Sci* 2015;45:94-100.
2. Kubies D, Himmlová L, Riedel T, Chánová E, Balík K, Douderová M, *et al.* The interaction of osteoblasts with bone-implant materials: 1. The effect of physicochemical surface properties of implant materials. *Physiol Res* 2011;60:95-111.
3. Al Mustafa M, Agis H, Müller HD, Watzek G, Gruber R. *In vitro* adhesion of fibroblastic cells to titanium alloy discs treated with sodium hydroxide. *Clin Oral Implants Res* 2015;26:15-9.
4. Zhang W, Li Z, Huang Q, Xu L, Li J, Jin Y, *et al.* Effects of a hybrid micro/nanorod topography-modified titanium implant on adhesion and osteogenic differentiation in rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Nanomedicine* 2013;8:257-65.
5. García-Contreras R, Kanagawa S, Beppu Y, Nagao T, Sakagami H, Nakajima H, *et al.* Morphological features of osteoblasts cultured on ultraviolet-irradiated titanium plates. *In Vivo* 2011;25:649-55.
6. Bell BF, Schuler M, Tosatti S, Textor M, Schwartz Z, Boyan BD. Osteoblast response to titanium surfaces functionalized with extracellular matrix peptide biomimetics. *Clin Oral Implants Res* 2011;22:865-72.
7. Lou W, Dong Y, Zhang H, Jin Y, Hu X, Liu J, *et al.* Preparation and characterization of lanthanum-incorporated hydroxyapatite coatings on titanium substrates. *Int J Mol Sci* 2015;16:21070-86.
8. Kawano T, Prananingrum W, Ishida Y, Goto T, Naito Y, Watanabe M, *et al.* Blue-violet laser modification of titania treated titanium: Antibacterial and osteo-inductive effects. *PLoS One* 2013;8:e84327.
9. Sartoretto SC, Alves AT, Resende RF, Calasans-Maia J, Granjeiro JM, Calasans-Maia MD. Early osseointegration driven by the surface chemistry and wettability of dental implants. *J Appl Oral Sci* 2015;23:279-87.
10. Alfarsi MA, Hamlet SM, Ivanovski S. Titanium surface hydrophilicity enhances platelet activation. *Dent Mater J* 2014;33:749-56.
11. Yeo IS. Reality of dental implant surface modification: A short literature review. *Open Biomed Eng J* 2014;8:114-9.
12. Held U, Rohner D, Rothamel D. Early loading of hydrophilic titanium implants inserted in low-mineralized (D3 and D4) bone: One year results of a prospective clinical trial. *Head Face Med* 2013;9:37.
13. Contreras RG, Adachi K, Yokote Y, Sakagami H, Hibino Y, Nakajima H, *et al.* Quantification of enhanced osteoblastic adhesion to ultraviolet-treated titanium plate. *In Vivo* 2010;24:519-23.
14. Tugulu S, Löwe K, Scharnweber D, Schlottig F. Preparation of superhydrophilic microrough titanium implant surfaces by alkali treatment. *J Mater Sci Mater Med* 2010;21:2751-63.
15. Lee HJ, Lee J, Lee JT, Hong JS, Lim BS, Park HJ, *et al.* Microgrooves on titanium surface affect peri-implant cell adhesion and soft tissue sealing; an *in vitro* and *in vivo* study. *J Periodontal Implant Sci* 2015;45:120-6.
16. Carvalho DR, Carvalho PS, Magro Filho O, de Mello JD, Beloti MM, Rosa AL. Characterization and *in vitro* cytocompatibility of an acid-etched titanium surface. *Braz Dent J* 2010;21:3-11.
17. Milleret V, Tugulu S, Schlottig F, Hall H. Alkali treatment of microrough titanium surfaces affects macrophage/monocyte adhesion, platelet activation and architecture of blood clot formation. *Eur Cell Mater* 2011;21:430-44.
18. Lee BA, Kang CH, Vang MS, Jung YS, Piao XH, Kim OS, *et al.* Surface characteristics and osteoblastic cell response of alkali- and heat-treated titanium-8tantalum-3niobium alloy. *J Periodontal Implant Sci* 2012;42:248-55.
19. Park JA, Leesungbok R, Ahn SJ, Lee SW. Effect of etched microgrooves on hydrophilicity of titanium and osteoblast responses: A pilot study. *J Adv Prosthodont* 2010;2:18-24.
20. Vlacic-Zischke J, Hamlet SM, Friis T, Tonetti MS, Ivanovski S. The influence of surface microroughness and hydrophilicity of titanium on the up-regulation of TGFβ/BMP signalling in osteoblasts. *Biomaterials* 2011;32:665-71.
21. Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, *et al.* High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A* 2005;74:49-58.
22. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
23. Young FM, Phungtamdet W, Sanderson BJ. Modification of MTT assay conditions to examine the cytotoxic effects of amitraz on the human lymphoblastoid cell line, WIL2NS. *Toxicol In Vitro* 2005;19:1051-9.