



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD.
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
CAMPO DEL CONOCIMIENTO BIOMATERIALES**

**“INFLUENCIA DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS
SUPERFICIALES DE 3 TIPOS DE BIOMATERIALES EN EL POTENCIAL
DE DIFERENCIACIÓN CELULAR *IN VITRO*”.**

**QUE PARA O.P.TAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

M EN C. CECILIA CARLOTA BARRERA ORTEGA

TUTORES

**DRA. SANDRA E. RODIL POSADA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES**

**DR. HIGINIO ARZATE
POSGRADO DE ODONTOLOGÍA**

COMITÉ TUTOR

**DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE CIENCIAS**

CIUDAD DE MÉXICO, MAYO, 2017

CIUDAD UNIVERSITARIA CD. MX.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricción de uso

DERECHOS RESERVADOS©

Todo el material contenido en esta tesis está 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 del 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.

Agradecimientos

En este gran trabajo se refleja parte de mi vida, su realización estuvo siempre bajo la mirada, cuidado y apoyo de personas e Instituciones que confiaron en mí y a ellos quiero manifestar mi gratitud.

A mi *Alma Mater* la Universidad Nacional Autónoma de México que me ha dado la oportunidad desde el nivel medio superior de lograr y continuar mi formación y crecimiento profesional.

A la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.

A la Dra. Elba Rosa Leyva Huerta y al Dr. Edgar Zenteno Galindo coordinadores del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud.

Al Consejo Académico del Área de las Ciencias Biológicas, Químicas y de la Salud durante el tiempo que fuí consejera.

A DGAPA-PAPIIT IN18814 Y IN100116, a CONACYT 251279 por la ayuda económica.

Del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM.

A Lilia García Vázquez secretaria de recursos humanos, a Omar Novelo y Josué Romero por las imágenes del SEM, a Lázaro Huerta por la realización del XPS, a Carlos Flores por las imágenes de AFM.

Y por último, pero más importante, deseo manifestar mi agradecimiento para las personas que con su influencia hacen de mí un recipiente perfecto, donde se funde la paciencia, prudencia, tolerancia, madurez y la superación personal, familiar y profesional.

Especialmente a la Dra. Sandra Elizabeth Rodil Posada tutora de este proyecto gracias por confiar en mí, gracias porque con su dedicación, profesionalismo, dirección y paciencia, me ha demostrado que el límite de nuestros horizontes está en nuestra conciencia y que el conocimiento es inagotable.

Al Dr. Higinio Arzate tutor de este proyecto, gracias por confiar en mí y por enseñarme que no existen límites y que cuando se quiere, se puede lograr.

Al Dr. Marco Antonio Álvarez, por ayudarme en la preparación de mi examen de candidatura, a la Dra. Argelia Almaguer, al Dr. Jesús Arenas, al Dr. Luis Felipe Jiménez, a la Dra. Ana María Fernández Presas, por haber aceptado ser sinodales en mi examen de candidatura.

A mis compañeros del laboratorio Lía, Enrique, Sonia, Gonzalo, Mercedes, Víctor, Rodrigo, Adriana, Fabiola, Marichuy, Phaedra, Roberto, Osmary, Jonatan, Juan Carlos, Abril por ayudarme siempre que los necesité.

A mis compañeros de diplomado Janeth y Miguel.

Especialmente a Lupix Jiménez por acompañarme en el camino de mi vida; por el apoyo, confianza, solidez, dirección y lógica que me das todos los días.

A Greta, Simona y Frida gracias por su compañía y su amor incondicional.

A Brenda Sofía por comprender mis tiempos y enseñarme la paciencia, la prudencia y la tolerancia.

A toda mi familia Jiménez; Lalo, Andy, Vero, Luis, Elisa, Dylan, Joko, Hilda, Ale, Oli, Quique, Mary, Jaime, los amo.

Y a los que ya no están físicamente también les quiero agradecer porque formaron parte fundamental en mi vida: Ismael, Enrique, Gonzalo, Lilia, Jaimito, Karina, Don Lupe, Simón, mi eterna Simona y Liz.

A todos los mencionados y a los que me faltó mencionar, mil gracias.

CONTENIDO

	Glosario	viii
Resumen	xv	
Summary	xvi	
Introducción		1
Capítulo 1. BIOMATERIALES		4
1. Superficies		4
1.1 Metales		4
1.2 Polímeros		5
1.3 Cerámicos		6
Capítulo 2. ASPECTOS BIOLÓGICOS		9
2.1 Periodonto		9
2.2 Encía		9
2.3 Ligamento periodontal		10
2.3.1 Células del Ligamento Periodontal		10
2.4 Hueso alveolar		11
2.5 Osteogénesis		12
2.6 Condrogénesis		12
2.7 Cemento radicular		14
2.8 Cementogénesis		14
2.9 Proteínas no colágenas		16
2.9.1 Fosfatasa Alcalina (ALP)		16
2.9.2 Sialoproteína Ósea (BSP)		17
2.9.3 Osteocalcina (OCN)		17
2.9.4 Proteína del Cemento 1 (CEMP1)		18

2.9.5	Proteína de Adhesión del Cemento (HACD1/CAP).....	19
2.9.6	SOX9.....	20
2.10	Colágenas tipo II, X, XI.....	20
2.10.1	ACAN (Aggrecan).....	21
2.11	Adipogénesis y PPAR γ	21
2.11.1	Lipo-Proteína Lipasa (LPL).....	22
Capítulo 3.	HIPÓTESIS, OBJETIVOS, PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN	23
3.1	Hipótesis de investigación.....	23
3.2	Objetivo General.....	24
3.3	Objetivos Particulares.....	24
3.4	Planteamiento del Problema.....	25
3.5	Justificación.....	26
Capítulo 4.	DISEÑO EXPERIMENTAL	27
4.1	Preparación de la Muestra.....	27
4.1.1	Modificación de la Superficie (Rugosidad).	27
4.2	Caracterización física y química superficial de los materiales.....	28
4.2.1	Técnicas Instrumentales.....	28
4.2.1.1	Rugosidad.....	28
4.2.1.2	Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	30
4.2.1.3	Microscopía de Fuerza Atómica (MFA).....	30
4.2.1.4	Mojabilidad.....	31
4.2.1.5	Espectroscopia de fotoelectrones por rayos X (XPS).....	34
4.2.1.6	Punto de Carga Cero (PCC).....	34
4.3	ENSAYOS BIOLÓGICOS.....	34

4.3.1	Cultivo celular	34
4.3.2	Adhesión celular	34
4.3.3	Proliferación celular.....	35
4.3.4	Expresión Génica	36
4.3.4.1	Extracción de ARN	36
4.3.4.2	Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa con Transcriptasa Reversa (RT-qPCR).....	37
Capítulo 5. RESULTADOS		38
5.1	Resultados Fisicoquímicos.....	38
5.1.1	Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) y Espectrometría de Dispersión de Energía de Rayos X (EDS).....	38
5.1.2	Microscopía de Fuerza Atómica (MFA)	41
5.1.3	Mojabilidad	42
5.1.4	Punto de Carga Cero (PCC).....	49
5.2	Resultados biológicos	50
5.2.1	Ensayo de Adhesión Celular	50
5.2.2	Ensayo de Proliferación Celular	53
5.2.3	Expresión génica.....	54
5.2.3.1	Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa con Transcriptasa Reversa (RT-qPCR).....	54
5.3	Biom mineralización.	67
Capítulo 6. DISCUSIÓN		75
Capítulo 7. CONCLUSIONES		80
Capítulo 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		83
Capítulo 9. ANEXOS		90
9.1	Difusión de Investigación	90

9.2	Artículos realizados durante el doctorado	92
Capítulo 10.	APÉNDICE	94
10.1	RUGOSIDAD CON PERFILOMETRÍA ÓPTICA.....	94
10.1.1	Titanio comercialmente puro	95
10.1.2	Acero inoxidable 316L.....	96
10.1.3	Polietileno de alta densidad.....	97
10.1.4	Polimetacrilato de metilo	98
10.1.5	Circonia	99
10.1.6	Porcelana dental	100

GLOSARIO

AAC	Cemento acelular afibrilar
ACAN	Aggrecan
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AIFC	Cemento acelular de fibras extrínsecas
AI316I	Acero Inoxidable 316L (grado médico)
Al	Aluminio
ALP	Fosfatasa alcalina
Al ₂ O ₃	Alúmina
ARN	Ácido ribonucléico
ARNt	Ácido ribonucléico total
BSP	Sialoproteína ósea
C	Carbono
CaO	Óxido de calcio
CEMP1	Proteína del cemento 1
CIFC	Cemento celular de fibras intrínsecas
Cl	Cloro
CMFC	Cemento celular mixto estratificado
CO ₂	Dióxido de carbono
Col II	Colágena tipo II
Col X	Colágena tipo X
Col XI	Colágena tipo XI
Cr	Cromo
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EDS	Espectroscopia de dispersión de energía por rayos X
F	Adelante (<i>Forward</i> por sus siglas en inglés)
Fe	Hierro
F5	Filter Max TM
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa humana
HA	Hidroxiapatita
HACD1/CAP	Proteína de adhesión del cemento
HPLC	Células humanas derivadas del Ligamento Periodontal
kDa	Kilodaltons
K ₂ O	Óxido de potasio
LPL	Lipo-Proteína Lipasa
MAPK	Proteína quinasas activadas por mitógenos
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MFA	Microscopía de fuerza atómica
MgO	Óxido de magnesio
MPa	Mega Pascales
MSCs	Células troncales mesenquimales
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NaO ₂	Óxido de sodio
Ni	Níquel

OCN	Osteocalcina
OPN	Osteopontina
PCC	Punto de carga cero
PEAD	Polietileno de alta densidad
pH	Potencial de hidrógeno
PMMA	Polimetacrilato de metilo
PPAR γ	Receptor activador de proliferación peroxisoma gamma
PSZ	Circonia parcialmente estabilizada
R	Reversa (<i>Reverse</i> por sus siglas en inglés)
Ra	Rugosidad media
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
SDS	Dodecil sulfato de sodio (detergente)
SFB	Suero fetal bovino
SiC	Carburo de silicio
SiO ₂	Sílice
TCP	Titanio comercialmente puro
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
Ti	Titanio
TZP	Policristales de circonia tetragonal
V	Vanadio
XPS	Espectroscopia de fotoelectrones por rayos X
Y ₂ O ₃	Itrio
ZrO ₂	Circonia
μm	micras

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Perfilometría del barrido lineal 500 μm realizada aleatoriamente, se muestra el más representativo de cada material. A) TCP, B) Al316L, C) PEAD, D) PMMA, E) Circonia y F) Porcelana, después de haber sido desgastados con lijas de diferentes granajes para conseguir la rugosidad media (R_a). Fuente directa. 29
- Figura 2.** Microfotografías de barrido de la topografía superficial a una magnificación de 5,000X para los diferentes materiales, con rugosidad de $2\pm 0.5 \mu\text{m}$ A) TCP, B) Al316L, C) PEAD, D) PMMA, E) Circonia, F) Porcelana. En el ángulo superior derecho de cada imagen se puede observar la R_a . Fuente directa. 39
- Figura 3.** Espectroscopia de dispersión de rayos X (EDS). En los cuadros se observa el elemento y el porcentaje atómico de cada material A) TCP B) Al316L, C) Porcelana D) Circonia, E) PEAD y F) PMMA. Fuente directa. 40
- Figura 4.** Microscopía de fuerza atómica a una amplificación de $30 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$ (eje z). Se usó un tratamiento de superficie para producir una rugosidad media A) TCP, 1B) Al316L, 1C) PEAD, 1D) PMMA, 1E) Circonia y 1F) Porcelana. Todas las superficies de los diferentes materiales con su respectiva rugosidad media (R_a). Fuente directa. 41
- Figura 5.** Se observa la imagen de la gota sobre las superficies de cada material. Del lado izquierdo el TCP, la Circonia y la Porcelana con fuerzas adhesivas y del lado derecho el PEAD, PMMA y Al316L con fuerzas cohesivas. Fuente directa. 42
- Figura 6.** Prueba de mojabilidad donde se compara el comportamiento de los 2 líquidos (agua desionizada y suero fetal bovino 10%) sobre las superficies de los diferentes biomateriales y una línea punteada que divide, según Vogler (98, 117), los materiales de acuerdo a su hidrofobicidad ($>65^\circ$) e hidrofiliidad ($<65^\circ$). Fuente directa. 43
- Figura 7.** En la gráfica de agua desionizada se muestra el comportamiento de los diferentes materiales con su respectiva desviación estándar así como sus diferencias significativas y en la gráfica con SFB 10% se muestra el comportamiento de los diferentes materiales. Prueba de comparación múltiple de *Tukey* ($p \leq 0.05$ significancia). Fuente directa. 44
- Figura 8.** Espectro de baja resolución representativo del análisis por XPS para la superficie de TCP. Fuente directa. 45
- Figura 9.** Espectro de baja resolución representativo del análisis por XPS para la superficie de Al316L. Fuente directa. 46
- Figura 10.** Espectro de baja resolución representativo del análisis por XPS para la superficie de Circonia. Fuente directa. 46

- Figura 11.** Espectro de baja resolución representativo del análisis por XPS para la superficie de Porcelana. Fuente directa. 47
- Figura 12.** Espectro de baja resolución representativo del análisis por XPS para la superficie de PEAD. Fuente directa. 47
- Figura 13.** Espectro de baja resolución representativo del análisis por XPS para la superficie de PMMA. Fuente directa. 48
- Figura 14.** Ensayo de adhesión después de 24 horas de cultivo con células del ligamento periodontal. Fuente directa. 50
- Figura 15.** Ensayo de adhesión después de 4 horas de cultivo con células del ligamento periodontal, donde no se observan diferencias estadísticamente significativas en todos los materiales con respecto al control. Fuente directa 51
- Figura 16.** Ensayo de adhesión después de 24 horas de cultivo celular con fibroblastos gingivales humanos. Fuente directa 52
- Figura 17.** Ensayo de proliferación con células del ligamento periodontal después de 24, 48 y 96 horas con la prueba colorimétrica MTT. Fuente directa 53
- Figura 19.** Expresión génica del marcador de osteoblastos ALP después de 5, 10 y 15 días de cultivo con HPLC sin medio de inducción. Prueba de comparación múltiple de *Tukey* con diferencias estadísticamente significativas (*) $p \leq 0.05$ ($n = 3$). Fuente directa. 55
- Figura 20.** Expresión génica del marcador de osteoblastos OCN después de 5, 10 y 15 días de cultivo con HPLC sin medio de inducción. Prueba de comparación múltiple de *Tukey* con diferencias estadísticamente significativas (*) $p \leq 0.05$ ($n = 3$). Fuente directa. 56
- Figura 21.** Expresión génica del marcador de cementoblastos HACD1/CAP después de 5, 10 y 15 días de cultivo con HPLC sin medio de inducción. Prueba de comparación múltiple de *Tukey* con diferencias estadísticamente significativas (*) $p \leq 0.05$ ($n = 3$). Fuente directa. 57
- Figura 22.** Expresión génica del marcador de cementoblastos CEMP1 después de 5, 10 y 15 días de cultivo con HPLC sin medio de inducción. Prueba de comparación múltiple de *Tukey* con diferencias estadísticamente significativas (*) $p \leq 0.05$ ($n = 3$). Fuente directa. 58
- Figura 23.** Expresión génica del marcador de condroblastos SOX9 después de 5, 10 y 15 días de cultivo con HPLC sin medio de inducción. Prueba de comparación múltiple de *Tukey* con diferencias estadísticamente significativas (*) $p \leq 0.05$ ($n = 3$). Fuente directa. 59
- Figura 24.** Expresión génica del marcador de condroblastos Aggrecan después de 5, 10 y 15 días de cultivo con HPLC sin medio de

- inducción. Prueba de comparación múltiple de *Tukey* con diferencias significativas (*) $p \leq 0.05$ ($n = 3$). Fuente directa. 60
- Figura 25.** Expresión génica del marcador de condroblastos Col tipo II después de 5, 10 y 15 días de cultivo con HPLC sin medio de inducción. Prueba de comparación múltiple de *Tukey* entre superficies con diferencias significativas (*) $p \leq 0.05$ ($n = 3$). Fuente directa. 61
- Figura 26.** Expresión génica del marcador de condroblastos Col tipo X después de 5, 10 y 15 días de cultivo con HPLC sin medio de inducción. Prueba de comparación múltiple de *Tukey* entre superficies con diferencias significativas (*) $p \leq 0.05$ ($n = 3$). Fuente directa. 62
- Figura 27.** Expresión génica del marcador de condroblastos COL tipo X después de 5, 10 y 15 días de cultivo con HPLC sin medio de inducción. Prueba de comparación múltiple de *Tukey* con diferencias significativas (*) $p \leq 0.05$ ($n = 3$). Fuente directa. 63
- Figura 28.** Expresión génica del marcador de adipogénesis PPAR γ después de 5, 10 y 15 días de cultivo con HPLC sin medio de inducción. Prueba de comparación múltiple de *Tukey* con diferencias significativas (*) $p \leq 0.05$ ($n = 3$). Fuente directa. 64
- Figura 29.** Expresión génica del marcador adipogénico LPL después de 5, 10 y 15 días de cultivo con HPLC sin medio de inducción. Prueba de comparación múltiple de *Tukey* con diferencias significativas (*) $p \leq 0.05$ ($n = 3$). Fuente directa. 65
- Figura 30.** Ensayo de mineralización realizado con alizarina roja al 2% en cultivos de HPLC con medio mineralizante después de 7 días de cultivo sobre los diferentes materiales A) TCP, B) Al316l, C) PEAD, D) PMMA, E) Circonia F) Porcelana. Fuente directa. 68
- Figura 31.** Ensayo de mineralización con alizarina roja al 2%, después de 7 días de cultivo sobre los diferentes materiales A) TCP, B) Al316l, C) PEAD, D) PMMA, E) Circonia F) Porcelana. Fuente directa. 69
- Figura 32.** Ensayo de mineralización realizado con alizarina roja al 2% en cultivos de HPLC con medio mineralizante después de 14 días de cultivo celular sobre las superficies A) TCP, B) Al316l, C) PEAD, D) PMMA, E) Circonia F) Porcelana. Fuente directa. 71
- Figura 33.** Ensayo de mineralización con alizarina roja al 2%, después de 14 días de cultivo celular con medio mineralizante. A) TCP, B) Al316l, C) PEAD, D) PMMA, E) Circonia F) Porcelana Fuente directa. 72
- Figura 34.** Microfotografías por microscopía electrónica de barrido con cultivo celular, después de 14 días con medio mineralizante sobre las superficies de los materiales A) TCP, B) Al316l, C) PEAD, D) PMMA, E) Circonia F) Porcelana. Fuente directa 73

- Figura 35.** Esquema que explica las limitaciones de las técnicas utilizadas para determinar los parámetros que describan la topografía de las superficies 81

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para el análisis de la expresión génica con RT-qPCR.	36
Cuadro 2. pH de cada material después de realizar el PCC.	49
Cuadro 3. Relaciones de Ca/P y fase cristalina de los materiales obtenidos después de 14 días en cultivo celular con medio mineralizante obtenida por EDS.	74

RESUMEN

Se ha demostrado que la respuesta celular; adhesión, proliferación y diferenciación está influenciada por las propiedades de superficie de los materiales con los que entran en contacto (1). Por ejemplo, la diferenciación de células mesenquimales hacia el linaje osteoblástico aumenta cuando la rugosidad de la superficie de implantes de titanio es alrededor de 2 micras (2-5). El objetivo de esta investigación es determinar posibles correlaciones entre las propiedades de superficie de diferentes materiales (metales, cerámicos y polímeros) con su potencial de diferenciación celular. Para esto se obtuvieron discos (n=30 por cada material) de acero inoxidable (AI316L); titanio comercialmente puro (TCP); polimetacrilato de metilo (PMMA); polietileno de alta densidad (PEAD), óxido de circonio y porcelana de 14 mm de diámetro y 2 mm de grosor. Se realizó un tratamiento superficial a los materiales para producir rugosidades promedio similares 2 ± 0.5 micras, la cual fue medida utilizando un perfilómetro en un barrido longitudinal de 500 micras y microscopía de fuerza atómica. Se realizó la prueba de mojabilidad y se midieron los ángulos de contacto utilizando agua desionizada y suero fetal bovino al 10%. La toxicidad de los materiales fue evaluada con ensayos de adhesión y proliferación de células de ligamento periodontal. Finalmente, el potencial de diferenciación de dichas células hacia osteoblastos, adipocitos, cementoblastos y condrocitos fue evaluado utilizando RT-qPCR sin agregar ningún tipo de medio de inducción a los cultivos. En cuanto a los resultados ninguna superficie fue citotóxica, no hubo diferencias significativas en la prueba de mojabilidad entre líquidos (SFB10% y agua desionizada), sin embargo determinamos que el AI316L, PEAD y PMMA tienen un comportamiento hidrofóbico, mientras que TCP, Porcelana y Circonia son más bien hidrofílicos. El ensayo de punto de carga cero indicó que el TCP y PMMA tienen valores de PCC por debajo de 7, mientras que el resto tuvo un PCC cercano al pH neutro (7.2). En la expresión génica el material que incremento la expresión génica con los marcadores osteogénicos, condrogénicos, cementogénicos como adipogénicos fue el TCP. Aunque la rugosidad promedio fue similar, la topografía de las muestras presentó diferencias significativas cuyo efecto directo en el potencial de diferenciación es difícil de evaluar al no contar con un valor cuantitativo que la represente. Se observó que el patrón de diferenciación, es decir, los genes sobre-expresados en cada muestra fueron diferentes, sugiriendo que sí hay una influencia de las propiedades físicas y químicas de cada una de ellas en el proceso de diferenciación, pero están actuando de forma sinérgica resultado difícil obtener correlaciones directas.

Palabras Clave: rugosidad, superficies, metales, cerámicos, polímeros, Células del ligamento periodontal, RT-qPCR.

SUMMARY

It has been shown that cellular response; adhesion, proliferation and differentiation are influenced by the surface properties with which they come in contact, such as the topography or the surface energy. In particular, it has been shown that the differentiation of mesenchymal stem cells into the osteoblast phenotype increases when the average surface roughness of titanium implants is about 2 microns. However less is known about the effect of the chemical composition on the differentiation potential for samples presenting a similar surface roughness. The objective is to compare the differentiation potential of periodontal ligament cells (HPLC) into adipocytes, osteoblasts, chondroblasts and cementoblasts of three type of materials (2 metals, 2 ceramic and 2 polymers) having similar roughness (2 ± 0.5 microns) without using any biological induction media. The samples were produced as discs of 14 x 2mm; (n= 30 for each type material) stainless-steel 316L (SS316L); commercially pure titanium (cpTi); polymethyl methacrylate (PMMA); high-density polyethylene (HDPE), zirconia (ZrO_2) and dental porcelain (Porcelain). An adequate surface treatment was used to produce the roughness on each sample. Surface properties such as wettability, chemical composition and point of zero charge were measured in order to correlate them with the biological response. The cell adhesion and proliferation were initially tested to assure non-toxic effects using the MTT assay. As for the results, no surface was cytotoxic, there were no significant differences in wettability test (FBS 10% and deionized water), however we determined that Al316L, HDPE and PMMA have a hydrophobic behavior, whereas TCP, Porcelain and Zirconia are rather hydrophilic. The zero charge point test indicated that TCP and PMMA have PCC values below 7, while the remainder had a PCC close to neutral pH (7.2). In gene expression, the material that increased gene expression with the osteogenic, chondrogenic, cementogenic as adipogenic markers was TCP. Although the average roughness was similar, the topography of the samples presented significant differences whose direct effect on the differentiation potential is difficult to evaluate, since it does not have a quantitative value to represent it. It was observed that the pattern of differentiation, ie the over-expressed genes in each sample were different, suggesting that there is an influence of the physical and chemical properties of each of them in the differentiation process, but they are acting synergistically. Difficult to obtain direct correlations.

Key words: roughness, surfaces, metals, ceramics, polymers, periodontal ligament cells, RT-qPCR.

INTRODUCCIÓN

La capacidad de identificar y manipular las células ha sido un importante avance en la medicina regenerativa y ha contribuido al desarrollo de la ingeniería de tejidos para su uso en terapias clínicas. En los últimos 15 años se han logrado avances en el aislamiento, cultivo y la inducción de la diferenciación de células troncales mesenquimales procedentes de diversas fuentes. A su vez, ha habido mucho desarrollo sobre los biomateriales buscando que estos jueguen un papel activo y permitan la diferenciación de células troncales hacia linajes específicos. El conjunto de modificaciones hechas a los biomateriales con esta finalidad incluye variaciones en las características topográficas a micro y nano-escala, así como modificaciones químicas a través de películas delgadas o adsorción molecular. Sin embargo, dichos cambios se han realizado principalmente de forma empírica, sin contar con conocimiento fundamental que permita dirigir la respuesta específica deseada.

Como ejemplos, se ha demostrado que las superficies de titanio, utilizadas en implantes que sustituyen hueso, con rugosidades del orden de 1–10 micras que maximizan la unión entre el tejido mineralizado y el implante y, a su vez, promueven la proliferación y diferenciación de células troncales hacia el fenotipo osteoblástico (6). Otros estudios han demostrado también que la rugosidad a nivel nanométrico ($<1 \mu\text{m}$) afecta la adhesión celular (7), quizás porque modifica las propiedades de mojabilidad superficial, lo que tiene un impacto en la adsorción de las proteínas del medio y, en consecuencia, en la adhesión celular.

El efecto de otras propiedades superficiales, tales como la energía superficial, la carga superficial, entre otras, no ha sido tan evidente (2). La dificultad radica en cómo controlar de forma individual este conjunto de propiedades, que de por sí están fuertemente correlacionadas.

De manera intuitiva, y como resultado de diferentes estudios, se tiene claro que la composición química de las superficies tiene un impacto sobre la citotoxicidad a corto y largo plazo, lo que limita de forma clara las composiciones de los materiales utilizados para aplicaciones médicas. Por otro lado, la selección de los biomateriales se realiza principalmente basándose en las propiedades mecánicas de los

materiales en relación a su aplicación; metales para sustitución de hueso y polímeros para tejido blando.

Dentro de cada grupo se busca optimizar las propiedades de superficie para lograr la respuesta biológica más adecuada: diferenciación osteoblástica en implantes óseos, o adhesión de fibroblastos y tejido conjuntivo o evitar la formación de coágulos en implantes en contacto con sangre.

De modo que se ha hecho poco esfuerzo por estudiar el efecto de la composición química superficial en la diferenciación de células pluripotentes mesenquimales. Como se mencionaba anteriormente, en el caso de las superficies de Ti, la rugosidad superficial micrométrica se optimiza alrededor 2 micras porque esto asegura un mayor potencial de diferenciación de las células troncales mesenquimales hacia el linaje osteoblástico. Sin embargo, se desconoce si dicha respuesta es exclusiva del titanio o es un efecto general inducido por la rugosidad. En la literatura se encuentran estudios del efecto de modificaciones superficiales en la diferenciación celular, pero solo agrupando algún tipo específico de material, por ejemplo o todos son metales (8-10), o polímeros (11, 12) o cerámicos (13, 14).

En cuanto a la respuesta celular se ha descrito la importancia del conocimiento de las interacciones entre célula/proteína/biomaterial que se pretenda usar o colocar en un tejido. La respuesta biológica final inducida por los biomateriales se encuentra fuertemente influido por las interacciones superficiales entre los componentes biológicos y el material sintético (15). De aquí que es relevante entender las correlaciones entre propiedades superficiales de los materiales y la respuesta biológica; en particular el potencial de diferenciación.

En el campo odontológico, la respuesta biológica de los materiales dentales ha cobrado relevancia debido al interés de conservar la integridad, funcionalidad y estética de los órganos dentarios, así como de los tejidos que los rodean con el empleo de materiales que sean biocompatibles. Por lo que proponemos el uso de células del ligamento periodontal para el estudio del potencial de diferenciación de los materiales propuestos. Estas células, desde el punto de vista funcional se distinguen por ser células formadoras como los fibroblastos, osteoblastos y

cementoblastos; en células resortivas como los osteoclastos y cementoclastos; en células epiteliales de Malassez y en células troncales ectomesenquimales (16).

El objetivo del presente trabajo es generar conocimiento básico sobre el efecto de las propiedades físicas y químicas de diferentes materiales (metales, cerámicos y polímeros) en el potencial de diferenciación celular. Dentro de los materiales que se van a utilizar se encuentra el titanio puro que ofrece una excelente resistencia a la corrosión, tiene alta resistencia mecánica, bajo peso y es biocompatible (17).

Capítulo 1. BIOMATERIALES

El factor más importante que distingue un biomaterial de cualquier otro material es su capacidad de existir en contacto con tejidos del cuerpo humano sin causar un daño inaceptable al cuerpo. Ha quedado claro que hay muchas maneras diferentes en que los materiales y los tejidos pueden interactuar para que esta coexistencia pueda verse comprometida y la búsqueda de biomateriales que sean capaces de proporcionar el mejor rendimiento en los dispositivos se ha basado en la adquisición del conocimiento y comprensión sobre estas interacciones. Estas se discuten habitualmente en el amplio contexto del tema de la biocompatibilidad (18, 19).

1. SUPERFICIES

1.1 METALES

Los metales son elementos que tienen enlaces metálicos y, en general, buena ductilidad, resistencia y conductividad eléctrica (20), presentan propiedades biomecánicas que los hacen adecuados como material de implante. Además son fáciles de procesar y tienen buen acabado. Los implantes metálicos han sido utilizados a través del tiempo pero debido a los avances de la tecnología se ha demostrado un bajo éxito con implantes metálicos tales como: el oro, el acero inoxidable, el cobalto-cromo, entre otros. Estos materiales se han vuelto obsoletos y han sido sustituidos por otros más nuevos. El titanio (Ti) y sus aleaciones (principalmente Ti-6Al-4V) y se han convertido en los metales de elección para implantes dentales. Sin embargo, los componentes protésicos de los implantes aún se elaboran con aleaciones de oro, acero inoxidable, y aleaciones de cobalto-cromo y níquel-cromo (21).

El titanio puro y las aleaciones de titanio son los materiales metálicos más atractivos para las aplicaciones biomédicas (22). Debido a su biocompatibilidad, el titanio se considera el material universal para implantes permanentes tales como los implantes dentales endoóseos (23).

El acero inoxidable es una aleación de hierro (Fe), cromo (Cr), níquel (Ni) y carbono (C). En esta aleación, el Cr (>11% en peso) es el mayor componente que promueve

la resistencia a la corrosión, los aceros tipo 316 y 316L son ampliamente utilizados en implantes.

Para aumentar la resistencia a la corrosión del acero inoxidable 316 en soluciones de cloro (Cl) la cantidad de C es reducida de 0.08% en peso a 0.03% para restringir al máximo la formación de carburos dando lugar al acero inoxidable 316L (bajo en C) (24).

Las aleaciones de acero inoxidable se utilizan para dispositivos ortopédicos e implantes. Las aleaciones a base de hierro se usan para la lámina de la rama mandibular, el marco de la rama, los pernos del estabilizador y un poco de inserto de la mucosa. Es más propenso a la corrosión por picaduras y se debe tener cuidado de usar y retener la condición de superficie pasivada (óxido), ya que esta aleación contiene níquel como elemento principal. No debe utilizarse en pacientes que presenten sensibilidad a alguno de sus componentes. Tienen altos potenciales galvánicos y es resistente a la corrosión. Esto puede resultar en acoplamiento galvánico y biocorrosión, si se usan biomateriales de titanio, cobalto, circonia o implantes de carbono (21).

1.2 POLÍMEROS

Los primeros trabajos con los implantes de polimetacrilato de metilo se encontraron principalmente con fallas. Sin embargo, en 1971, Hodosh (25) informó que los polímeros eran biológicamente sustancias tolerables. La investigación sobre los implantes de réplicas de dientes de polimetacrilato de metilo llevó al desarrollo del concepto de implante de polímero por Milton Hodosh. Al reemplazar un diente natural, la réplica polimérica resultó ser ideal para la restauración de la función y la apariencia. A continuación se enumera los motivos por los cuales los polímeros de metacrilato de metilo fueron seleccionados:

- 1.- Las características físicas de los polímeros pueden alterarse depende del uso, ya que su composición puede cambiarse fácilmente.
2. Los polímeros se pueden cambiar a una forma más porosa o una más suave.
- 3.- Los polímeros pueden manipularse fácilmente y permitir una mejor reproducción.
- 4.- Los polímeros no generan microondas o corriente electrolítica como los metales.

5.- Pueden ser más fácilmente evaluados microscópicamente

6.- Son estéticamente agradables.

Estos materiales presentan algunas desventajas como son:

- a) Propiedades mecánicas inferiores.
- b) Falta de adhesión a los tejidos vivos.
- c) Reacciones inmunológicas adversas (21).

El polimetacrilato de metilo procede del ácido acrílico y de su polimerización, es el acrílico más utilizado en la odontología. Sus cualidades de biocompatibilidad, fiabilidad, relativa facilidad de manipulación, baja toxicidad se utilizan en muchas especialidades médicas diferentes (26).

El PMMA es un material translúcido estético, biocompatible. En virtud de su amplio espectro de propiedades deseadas, posee diversas aplicaciones en odontología clínica que incluyen mantenedores de espacio, prótesis parciales fijas con postes endodónticos, material de férula en los niños. Además se puede utilizar como una alternativa al tratamiento convencional en la odontología pediátrica (27).

1.3 CERÁMICOS

Las cerámicas para dispositivos de implantes quirúrgicos se han utilizado debido a su comportamiento inerte, buena resistencia y por sus propiedades físicas, tales como una conductividad térmica y eléctrica mínima. Sin embargo, algunas características de los cerámicos como lo es la baja ductilidad y fragilidad han limitado su uso (21).

Se pueden definir como materiales cristalinos inorgánicos, es posible que sean los materiales más “naturales” como la arena de la playa y las rocas. Los cerámicos avanzados son materiales resultantes de la refinación de cerámicos naturales y con otros procesos especiales. Poseen una elevada dureza y un alto punto de fusión (20, 21).

Las características inherentes a este material le confieren la capacidad de poder ser fácilmente igualado para conservar la apariencia de los dientes naturales, además de que no presentan actividad química ante los fluidos de la boca (28).

La porcelana dental convencional es una cerámica vítrea basada en una red de sílice (SiO_2) y feldespatos de potasio ($\text{K}_2\text{O Al}_2\text{O}_3 6\text{SiO}_2$) o feldespatos de sodio ($\text{Na}_2\text{O Al}_2\text{O}_3 6\text{SiO}_2$) o ambos. Los pigmentos, opacadores y vidrios son añadidos para controlar la temperatura de fusión, la temperatura de compactación el coeficiente de contracción térmica y la solubilidad. Los feldespatos usados para las porcelanas dentales son relativamente puros y sin color. Por lo tanto, se deben añadir los pigmentos para producir el matiz de los dientes naturales o la apariencia del color de los materiales de restauración de color del diente que pueda existir en los dientes adyacentes. El sílice (SiO_2) puede existir en cuatro formas diferentes; cuarzo cristalino, cristobalita cristalina, tridimite cristalino y sílice fundido no cristalino. Éste último es un material cuya temperatura de alta fusión se le atribuye a la red tridimensional de enlaces covalentes entre sílice tetraédrico, que son las unidades estructurales básicas de la red de vidrio. También se incluyen fundentes (vidrios de baja fusión) para reducir la temperatura lo suficientemente bajas para que la aleación a la que se unen no se funda o se deforme (29).

Los feldespatos en las porcelanas dentales, ya sean de potasio o de sodio son minerales compuestos de óxido de potasio (K_2O), óxido de sodio (NaO_2), alúmina (Al_2O_3) y óxido de sílice (SiO_2). Cuando el feldespato de potasio se mezcla con varios óxidos metálicos y es cocido a temperaturas altas, puede formar leucita y una fase de vidrio que se ablanda y fluye levemente. Cuando se reblandece la fase de vidrio durante el calentamiento de la porcelana se da el proceso por el cual las partículas se unen y se llama fase líquida de compactación, proceso controlado por la difusión entre las partículas a temperatura suficientemente alta para formar un sólido denso (29). Por lo tanto, la porcelana dental es uno de los materiales más utilizados para la reconstrucción de la estructura dental natural perdida (la parte coronal), ya que gracias a sus propiedades podemos usarla para solucionar problemas funcionales y estéticos.

La circonia se utilizó para la cirugía protésica dental con implantes endóseos a principios de los años noventa. Cranin (30) y colaboradores publicaron el primer trabajo de investigación sobre circonia en 1975. Los implantes cerámicos se introdujeron para la osteointegración, además de que entra una menor acumulación

de biopelícula resultando en la mejora de la gestión de tejidos blandos, y la consideración estética como una alternativa a los implantes de titanio. La estructura de la circonia polimórfica presenta tres formas de cristal: monoclinica (M), cúbica (C) y tetragonal (T). La circonia a temperatura ambiente, adquiere una estructura monoclinica y tetragonal a 1170°C, seguido de una fase cúbica a 2370 °C. A temperatura ambiente, estas fases son inestables y se rompen en trozos al enfriarse. La fase C de circonia pura puede estabilizarse mediante la adición de CaO, MgO e Y₂O₃ (itrio), resultando en un material multifásico llamado circonia parcialmente estabilizada (PSZ por sus siglas en inglés *partially stabilized zirconia*) que combina las fases cúbica, monoclinica y tetragonal en el orden de importancia. Los policristales de circonia tetragonal (TZP por sus siglas en inglés *tetragonal zirconia polycrystals*), que contienen sólo fase tetragonal, se pueden obtener añadiendo itrio a temperatura ambiente. El TZP estabilizado con itrio posee baja porosidad, alta densidad, alta flexión y resistencia a la compresión y es adecuado para aplicaciones biomédicas (21).

La circonia es un material cerámico con propiedades mecánicas adecuadas para la fabricación de dispositivos médicos. La resistencia a la compresión de ZrO₂ es de aproximadamente 2000 MPa. Este material se utiliza como dispositivo ortopédico (31). También se usa en odontología por los fuertes enlaces covalentes e iónicos junto con sus propiedades microestructurales, es estética, biocompatible y tiene resistencia química, puede ser parcial o totalmente estabilizada lo que la hace dura y frágil (32, 33).

Capítulo 2. ASPECTOS BIOLÓGICOS

En este trabajo se propone evaluar la diferenciación de células del ligamento periodontal hacia los fenotipos osteogénico, cementogénico, condrogénico y adipogénico, por lo que en el presente capítulo se describen los tejidos de interés como el periodonto que se considera un sistema orgánico compuesto de dos tejidos duros (cemento radicular y hueso alveolar) y dos tejidos blandos (ligamento periodontal y encía), que en su conjunto mantienen el funcionamiento adecuado del diente (34, 35). Y el proceso de diferenciación a través del cual las células troncales del ligamento periodontal pueden generar dichos tejidos.

2.1 PERIODONTO

El periodonto es un conjunto de tejidos que soportan y protegen a los órganos dentales y unen el diente al hueso alveolar. Está constituido por cuatro componentes estructurales: hueso alveolar, ligamento periodontal, cemento radicular y encía (36). La principal función del periodonto es anclar al diente y amortiguar las fuerzas masticatorias debido a que sufre una presión mecánica constante. El periodonto es un poderoso sistema que regula la homeostasis, y la integridad fisiológica en íntimo contacto con tejidos blandos y tejidos mineralizados, bajo la constante influencia de microorganismos y cambios físicos (37).

2.2 ENCÍA

En el adulto en condiciones de salud, la encía está compuesta por epitelio gingival y tejido conectivo que cubre al hueso alveolar y las raíces de los dientes a nivel coronal, a través de la unión cemento esmalte. (36). Está constituida predominantemente por fibras de colágena, proteoglicanos, fibronectina, osteonectina, tenasina y elastina. La contribución variable de estas moléculas a la arquitectura gingival depende en gran medida de la ubicación (38).

2.3 LIGAMENTO PERIODONTAL

El desarrollo del ligamento periodontal comienza con la formación radicular antes de la erupción dental, tanto en su desarrollo como en la madurez, contiene células troncales mesenquimales con potencial de diferenciación hacia osteoblastos, cementoblastos y fibroblastos (39, 40). El ligamento periodontal es tejido conectivo especializado, vascularizado el cual le brinda sostén y nutrición al órgano dental: es considerado como sistema de amortiguación pues resiste y distribuye las fuerzas de masticación, además que contribuye a la reparación de daño tisular y genera homeostasis. Esta última es una de las características más interesantes, mide entre 0.15 y 0.38 mm, aproximadamente, de ancho (41). El ligamento periodontal tiene el potencial de presentar una remodelación constante y resorción del cemento radicular, ligamento y hueso alveolar. Sin embargo, una vez que ha sido destruido el daño es irreversible (42).

2.3.1 Células del Ligamento Periodontal

Hay evidencia de que el ligamento periodontal contiene poblaciones celulares capaces de diferenciarse en cementoblastos, osteoblastos y adipocitos (43-45). La presencia de múltiples tipos celulares en el ligamento periodontal sugiere que este tejido es un nicho de células troncales heterogéneas de origen mesenquimal que mantienen la homeostasis del tejido periodontal. Seo (46) aisló una población de células troncales heterogéneas mesenquimales a partir del ligamento periodontal que mostraron ser positivas a marcadores como STRO-1, escleraxis (factor de transcripción específico de tendón) así como también marcadores de fenotipos cementoblástico/osteoblástico. Estudios *ex vivo* muestran que las células troncales heterogéneas del ligamento periodontal pueden regenerar estructuras similares al ligamento periodontal y al cemento después de ser trasplantadas en ratones inmunocomprometidos; dichas estructuras son totalmente distintas a las estructuras formadas por otras células troncales dentales (47, 48).

Las células troncales heterogéneas del ligamento periodontal humano forman un tejido denso de colágena tipo I que simula el ligamento periodontal. Las fibras de colágena generadas, *in vivo*, son capaces de conectarse con una estructura similar

al cemento radicular que mimetiza la unión fisiológica de las fibras de Sharpey, dentro de defectos periodontales en ratones inmunocomprometidos. La alta tasa proliferativa, que muestran las células troncales heterogéneas del ligamento periodontal, permite que sean la mejor opción para la aplicación clínica en el tratamiento de regeneración tisular (46, 47).

2.4 HUESO ALVEOLAR

El hueso alveolar es una parte especializada de los huesos mandibular y maxilar que forma la estructura de soporte primario de los dientes. Aunque pueden ser comparables con otros tejidos óseos del cuerpo, el hueso alveolar se somete a un remodelado continuo y rápido asociado con la erupción de los dientes y, posteriormente, a las demandas funcionales de la masticación. La capacidad del hueso alveolar para someterse a una rápida remodelación es también importante para la adaptación posicional de los dientes, pero puede ser perjudicial para la progresión de la enfermedad periodontal (49).

El proceso alveolar consiste en una delgada capa de hueso que forma la pared de la cavidad del órgano dentario y contiene insertadas las fibras de Sharpey. Los procesos alveolares son estructuras óseas dependientes de los órganos dentarios que se desarrollan y sufren remodelación de acuerdo a la formación y erupción de los dientes. La forma, localización y función de los dientes determinan la morfología ósea. Durante el desarrollo de las raíces comienza los principales cambios, como la altura del proceso alveolar, por lo que esto se encuentra íntimamente relacionado con la formación del ligamento periodontal y el cemento radicular. Las funciones generales del proceso alveolar son anclar a las raíces dentales, absorber y distribuir el constante esfuerzo debido a los contactos oclusales (35, 50).

El hueso alveolar está compuesto por matriz orgánica, de la cual la colágena tipo I y III son las más abundantes, además contiene proteínas no colágenas como sialoproteína ósea (BSP), osteocalcina (OCN), osteopontina (OPN), proteínas morfogenéticas de hueso y factores de crecimiento. Los osteoblastos son las células que producen la matriz orgánica del hueso, y se diferencian de células foliculares pluripotentes. El otro componente estructural es la matriz inorgánica, formada por

minerales, principalmente calcio y fósforo, en forma de cristales de hidroxiapatita (50).

2.5 OSTEOGÉNESIS

La osteogénesis es la diferenciación de células troncales mesenquimales en osteoblastos. La diferenciación osteogénica es impulsada por Runx2, que es un factor de transcripción que regula los niveles de expresión de genes osteogénicos. Estos genes incluyen fosfatasa alcalina (ALP), osteopontina (OPN), Colágena tipo I, osteocalcina (OCN) y osterix.

Existen otras vías de señalización implicadas en la diferenciación osteogénica, incluyendo la proteína morfogenética ósea (BMP), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), y Wnt / β -catenina. Al igual que la adipogénesis, la diferenciación osteogénica se basa en el estímulo mecánico con la superficie de crecimiento apropiada, la topografía, el estrés, etc. Un principio general es que la estimulación de adipogénesis es el resultado en la supresión de la osteogénesis y viceversa. Dada la inducción de la adipogénesis por muchos productos químicos disruptores endocrino (EDCs), es lógico que se ha demostrado que los EDC reducen la expresión de genes y la actividad de factores de transcripción implicados en células troncales mesenquimales (MSCs) que experimentan diferenciación osteogénica (51).

2.6 CONDROGÉNESIS

La diferenciación de los condrocitos y la hipertrofia son eventos clave en la formación ósea. Existen dos procesos de formación ósea: uno es la osificación intramembranosa, durante la cual las células troncales mesenquimales (MSCs) se diferencian directamente en osteoblastos. De esta manera se forman huesos irregulares, que incluyen el hueso del cráneo, la clavícula y parte de la mandíbula. Por otro lado, los huesos largos y el esqueleto de los vertebrados están formados por otro proceso llamado osificación endocondral. En pocas palabras, la osificación endocondral es un proceso que comienza con la condensación de las MSCs, que se diferencian a los condrocitos y luego forman una plantilla de cartílago. Gradualmente, la plantilla de cartílago es reemplazada por minerales óseos. Las

MSCs durante la condensación expresará SOX9, que es un factor regulador fundamental en la condrogénesis y estas células se diferencian en condrocitos con dos subpoblaciones: condrocitos redondos y de baja proliferación en los extremos distales de la condensación que continúan expresando SOX9 y condrocitos de alta proliferación situados en columnas hacia el centro que luego experimentan maduración. (52)

Durante el proceso de maduración, los condrocitos en la región central del cartílago se retirarán del ciclo celular y se diferencian en pre-hipertróficos y condrocitos hipertróficos con alrededor de 20 veces mayor volumen. Los condrocitos hipertróficos producen una matriz extracelular, que es una plantilla para la subsiguiente sustitución por hueso (53). Alrededor del elemento cartilaginoso está el pericondrio, que consiste en una capa de células parecidas a fibroblastos. Las células en pericondrio se diferenciarán en osteoblastos para formar el periostio altamente vascularizado. Y luego los vasos sanguíneos del periostio junto con osteoblastos y osteoclastos invaden la matriz calcificada producida por los condrocitos hipertróficos, lo que da como resultado la sustitución del cartílago mineralizado por hueso para formar el centro de osificación primaria. Y la matriz se remodelará adicionalmente para formar el hueso cortical y la cavidad de la médula ósea para proporcionar una matriz hematopoyética. Los centros secundarios de osificación generalmente surgen en la etapa de desarrollo postnatal y se localizan en los extremos distales del hueso largo. (54)

La expresión génica varía con las diferentes etapas de la osificación endocondral. Los condrocitos inmaduros expresan los factores de transcripción SOX5, SOX6 y SOX9 y la estructura de las proteínas colágeno tipo II, $\alpha 1$, aggrecan. Todos ellos son los marcadores de la diferenciación de los condrocitos. Después de esa etapa es la pre-hipertrofia de los condrocitos, que está marcada por el receptor de la hormona 1 de la paratiroides (Pth1r) y la expresión del hedgehog (Ihh). Luego, el estadio va a los primeros condrocitos hipertróficos que expresan colágena tipo X, $\alpha 1$ (Col10 $\alpha 1$). Posteriormente, la expresión de SOX5, SOX6, SOX9 y Col tipo II disminuyó. Finalmente, los condrocitos procedieron al estado hipertrófico tardío con la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGFA), la

metaloproteinasa de matriz 13 (MMP13) y la osteopontina. Las expresiones de estos genes anuncian que la matriz está siendo invadida por osteoblastos, osteoclastos y células endoteliales y eso significa que las plantillas de cartílago van a ser reemplazadas por huesos. (55)

Los estudios han informado de que el desarrollo de los huesos depende del equilibrio entre la proliferación de condrocitos y la diferenciación. Una vez que se altera el equilibrio, se cambiará la longitud y la estabilidad de los huesos (53).

2.7 CEMENTO RADICULAR

El cemento radicular es un tejido conectivo heterogéneo mineralizado que recubre la superficie de la raíz del diente, es de los componentes más importantes del aparato de inserción porque es el sitio donde se insertan las fibras de Sharpey. Histológicamente el cemento radicular es muy similar al hueso; sin embargo, análisis químicos y físicos indican que el cemento es menos calcificado que la dentina. Dentro de las características que difieren con el hueso son: ausencia de vasos sanguíneos, vasos linfáticos, no tiene inervación, no sufre reabsorción fisiológica o remodelación, pero es caracterizado por su continua deposición durante toda la vida. Las funciones más importantes de este tejido son: revestir y anclar las fibras principales del ligamento periodontal, la participación en el mantenimiento de la relación oclusal (adaptación), la reparación de los defectos de las raíces después de la resorción o fractura, y la protección de la pulpa (56).

2.8 CEMENTOGÉNESIS

Durante la formación de la raíz, el mesénquima apical continúa proliferando para formar el periodonto, mientras el epitelio interno y externo se fusionan a nivel cervical para formar una vaina epitelial llamada vaina epitelial de Hertwig (HERS). Las células de la vaina proliferan y migran hacia la zona apical, donde se dividen en la papila y el folículo dental. Las células de HERS migran de la raíz a la región del futuro ligamento periodontal y se re-asocian, para formar los restos epiteliales de Malassez que persisten en los adultos en una aposición cercana a la superficie radicular. Una vez que se ha perdido la continuidad de las células de HERS, las células foliculares ecto-mesenquimales comienzan a depositar el cemento radicular

sobre la dentina recién depositada y/o sobre la matriz secretada por las células de HERS. La región apical de la raíz en desarrollo contiene células ectomesenquimales progenitoras de fibroblastos, pre-odontoblastos y pre-cementoblastos (57).

Actualmente estas dos teorías válidas que postulan la existencia de diferentes tipos de cementoblastos: los originados de las células de la vaina epitelial de Hertwig por medio de la transformación epitelio-mesénquima (formando el cemento acelular); los que derivan de las células del folículo dental (formando en el cemento celular). La biología del cemento, los aspectos moleculares y celulares de la cementogénesis han propuesto diferentes tipos de cemento clasificados de acuerdo a su origen y sus fibras:

1. El cemento acelular de fibras extrínsecas (AIFC) se encuentra en la parte media y coronal de la raíz y contiene principalmente fibras de Sharpey. Este tipo de cemento es parte importante el aparato de unión y conecta al órgano dentario con el hueso alveolar
2. El cemento celular de fibras intrínsecas (CIFC), contiene cementocitos embebidos en la matriz de fibras de colágeno, estas fibras intrínsecas se encuentran orientadas principalmente paralelas a la superficie de la raíz, ubicadas principalmente en la reabsorción y contiene fibras intrínsecas y cementocitos.
3. El cemento acelular afibrilar (AAC) generalmente se encuentra depositado en las superficies del esmalte maduro. Es decir, durante la formación y erupción del órgano dental, localizado por arriba del esmalte cervical y la unión amelo-cementaria; el principal componente son los glicosaminoglucanos.
4. El cemento celular mixto, estratificado (CMFC) está presente en el tercio apical de las raíces dentales y en las furcas. Se sabe que le proporciona un sistema de remodelación de la superficie de la raíz compensando el desplazamiento de los órganos dentales en sus cavidades alveolares: contiene fibras intrínsecas, extrínsecas, así como también cementocitos.

El cemento está constituido, aproximadamente, de 50% de hidroxapatita y 50% de proteínas colágenas y no colágenas

2.9 PROTEÍNAS NO COLÁGENAS

Las proteínas de matriz no colágenas que han sido identificadas son la sialoproteína ósea (BSP), la proteína de la matriz de la dentina 1 (DMP-1), la sialoproteína dentinaria (DSP), la fibronectina (FN), la osteocalcina (OCN), la osteopontina (OPN), la osteonectina, la tenascina, los proteoglicanos, los proteolípidos, y varios factores de crecimiento que comparten similitud con la matriz extracelular del hueso, con la diferencia de que existen proteínas exclusivas del cemento como son: la proteína de adhesión del cemento (HACD1/CAP), y la proteína del cemento 1 (CEMP1). En estudios se demostró la presencia de proteínas propias del esmalte, que se sabía que participaban en la formación del cemento, sin embargo, encontraron la presencia de amelogenina (AMEL) dentro del núcleo de los cementoblastos. Que actúan como un factor de crecimiento relacionado en los procesos de proliferación y diferenciación. Por su parte, la presencia de la proteína ameloblastina (AMBN), actúa en sinergismo con AMEL en los procesos de regulación de la diferenciación de los cementoblastos (41).

2.9.1 Fosfatasa Alcalina (ALP)

Es una enzima lisosomal, en 1972, Warners (58) sugirió que está implicada en los procesos de la mineralización del hueso y la calcificación del cartílago, debido a que tiene dominios de unión a la colágena tipo I, II, y X. Se ha encontrado su presencia en osteoblastos, fibroblastos, neutrófilos, el suero y también en el fluido gingival crevicular. Se relaciona con el incremento de la inflamación gingival. Más aún, la actividad de la fosfatasa alcalina se observa también en el ligamento periodontal que recubre al cemento acelular, células de la médula ósea, células endosteales y cementoblastos. La actividad de ALP puede diferenciar a los fibroblastos del ligamento periodontal hacia osteoblastos o cementoblastos, no así en los fibroblastos gingivales. La fosfatasa alcalina es una fosfoproteína necesaria para la iniciación y maduración de la formación del cristal de hidroxiapatita; esto a través de la hidrólisis del pirofosfato. Por lo tanto es una molécula que incrementa su actividad, una vez iniciada la mineralización.

En la ausencia de ALP, como sucede en una hipofosfatasa, se presenta una mineralización anormal en el desarrollo esquelético y, en cavidad oral, se observa escasez de cemento. Este proceso origina la pérdida prematura de los órganos dentales (35, 59, 60).

La fosfatasa alcalina es una proteína glicosilada localizada, en la porción externa de la membrana citoplasmática y en vesículas de matriz, regula las concentraciones extracelulares de fosfatos, y cataliza la hidrólisis de fosfomonoésteres a un pH alcalino. La actividad específica de esta enzima es como indicador de desarrollo y diferenciación celular. Su actividad se ha localizado en placas de crecimiento de cartílago, médula ósea, osteoblastos y cementoblastos. En el hueso se ha localizado en el frente de mineralización (35, 61).

2.9.2 Sialoproteína Ósea (BSP)

Es una glicoproteína altamente fosforilada de 59 kDa, con altos niveles de ácido glutámico. Se expresa durante estadios tempranos del desarrollo de la raíz y en el diente maduro. Posee la secuencia RGD (arginina, glicina y ácido aspártico), secuencia de unión celular que interacciona con las integrinas y con dos distintas regiones enriquecidas en ácido glutámico que contribuyen a la unión de las células de hueso a la matriz extracelular. También intervienen para la formación de cristales de hidroxiapatita y afinidad por el calcio (62). Además, se encuentra relacionada con funciones de adhesión celular y participa en el inicio de la mineralización. Es una proteína quimio-atrayente de pre-cementoblastos: promueve su adhesión y diferenciación. Tiene la capacidad de una proteína nucleadora de cristales de hidroxiapatita, por lo que se le atribuye un papel importante durante las primeras etapas de mineralización (63).

2.9.3 Osteocalcina (OCN)

Es una proteína de 84-100 aminoácidos y un peso molecular de 5.8 kDa. Dentro de su secuencia contiene cinco residuos de ácidos glutámicos (GLA). Debido a sus funciones actúa como marcador de tejidos calcificados, maduración de osteoblastos, odontoblastos, cementoblastos, condrocitos hipertróficos. Otra de sus

funciones es unir a los iones de calcio y cristales de hidroxiapatita: influye en el movimiento y proliferación de los osteoclastos. Recientemente se ha sugerido que regula el frente de mineralización, inclusive recientemente se ha sugerido que actúa como hormona, ya que influye en el metabolismo de la energía, ya que la regula la secreción de insulina. Es altamente conservadora entre las especies. Sin embargo se ha observado su expresión en riñón, pulmón, corazón cartílago, células del musculo liso y las paredes de los vasos sanguíneos (41, 64, 65).

2.9.4 Proteína del Cemento 1 (CEMP1)

La proteína del cemento 1 es una proteína de aproximadamente 50 kDa inicialmente aislada a partir del medio condicionante de una línea celular derivada de un cementoblastoma humano *in vitro*, que se ha localizado y expresado en poblaciones celulares del ligamento periodontal, cementoblastos y células de espacios endosteales, por lo que podría ser considerado como un marcador de cementoblastos. La CEMP1 promueve la adhesión, proliferación y la diferenciación celular, incluso mediante la transfección a células no mineralizantes (fibroblastos gingivales humanos). También se conoce que la CEMP1 cambia el fenotipo de los fibroblastos hacia tejido mineralizante. Se observó que la proteína específica del cemento radicular tiene una alta afinidad por la hidroxiapatita y que participa en los procesos de mineralización ya que regula el crecimiento y morfología a través de la nucleación de cristales de fosfato octacálcico (OCP) (cristal precursor de la hidroxiapatita). En estudios *en vivo* se ha observado que la CEMP1, actúa como quimio-atrayente en el reclutamiento de células troncales mesenquimales con STRO-1 positivas, promueve la proliferación y la mineralización de estas células (66-68).

Cuando se colocó CEMP1 en cultivo 3D de células del ligamento periodontal se observó el cambio de fenotipo hacia cementoblástico / condroblástico / osteoblástico (69), por lo que representa una molécula ideal con potencial de regeneración en hueso. Usando la recombinante humana se demostró tener potencial osteoinductivo en la formación y maduración del hueso, con lo que se demostró que la CEMP1

puede ser utilizada como agente terapéutico en la regeneración de defectos de tamaño crítico en ratas Wistar (66, 70-72).

Un estudio reciente reveló que hrCEMP1 expresada en *Pichia pastoris* tiene 2.4% de glicosilaciones, es termoestable y posee una masa molecular de 28,770 Da. El espectro de dicroísmo indicó un contenido de estructura secundaria de 28.6% de hélice α , 9.9% de hoja β y 61.5% de estructura aleatoria. Los ensayos de actividad biológica demostraron que hrCEMP1 nuclea y regula el crecimiento de cristales de hidroxiapatita. Por este medio se demuestra por primera vez que CEMP1 tiene una actividad de tipo lectina (tipo C) y reconoce específicamente el manopiranosido. La información producida por esta caracterización bioquímica y estructural puede contribuir a comprender mejor las funciones biológicas de CEMP1 (73).

2.9.5 Proteína de Adhesión del Cemento (HACD1/CAP)

El gen de la proteína de adhesión del cemento se localiza en el cromosoma 10 región p13-p14, se considera un empalme (*splicing*) alternativo del gen PTPLA (se expresa mayoritariamente en el desarrollo y etapas posnatales de músculo cardiaco y en menor medida en músculo esquelético). La proteína de adhesión del cemento tiene 140 aminoácidos y un peso molecular de 14.920 kDa, su carga eléctrica es neutra (pH 7.78) y carece de péptido señal. Es una proteína con una movilidad relativa de 54-57 kDa que se ha aislado, caracterizado y purificado a partir de extractos de cemento maduro bovino y humano, mediante el empleo de un anticuerpo monoclonal anti-CAP bovina (3G9). Se ha inmunolocalizado en la matriz del cemento radicular, en espacios endosteales del hueso alveolar y en zonas paravasculares del ligamento periodontal; así como en cementoblastos *putativos in vitro* e *in vivo* (67, 74, 75).

El papel biológico de la proteína de adhesión del cemento es principalmente quimiotáctico de células del ligamento periodontal y del hueso alveolar hacia la superficie radicular. Se sugiere que su función de adhesión podría estar mediada por el receptor de integrinas $\alpha 5 \beta 1$, así como una alta afinidad por la fibronectina, hidroxiapatita, dentina y cemento radicular. Incrementa la actividad de ALP, así

como la expresión de proteínas asociadas al proceso de biomineralización. Se ha demostrado que, en fibroblastos gingivales, la proteína CAP activa la vía de MAPK, mediada por ERK2 e induce la expresión de c-fos, el cual es un factor de transcripción que participa en la proliferación celular (76-80). La proteína de adhesión promueve la propagación de células mesenquimales, por lo que la CAP puede interactuar selectivamente con cierto tipo de células y subtipos celulares, y afectan sus actividades. Por lo tanto juegan un papel determinante durante la formación y regeneración de tejido conectivo periodontal, actúan como molécula inductora de la diferenciación hacia un fenotipo mineralizante (67, 70, 76, 81, 82).

2.9.6 SOX9

Es miembro de una gran familia de genes SOX: un factor de transcripción que contiene un grupo dominio de gran movilidad (HMG), similar a SRY, que se requiere para la diferenciación de los condrocitos y la formación de cartílago. SOX9 también se expresa en otros tejidos como el sistema nervioso y el sistema urinario. SOX9 une las secuencias esenciales en Col II α 1 y Colágena XI α 2, Col XI α 2 activadores específicos de los condrocitos, es co-expresado con colágena tipo II, y es un activador del gen promotor y activador del aggrecan (55).

2.10 COLÁGENAS TIPO II, X, XI

En el cartílago articular hay diversos tipos de colágena; representa el 20% del peso total; el 95% es **colágena tipo II** que actúa como un modulador de la osteogénesis, también le confiere la estructura y rigidez del cartílago (83). Sus principales funciones son proporcionar al tejido propiedades tensiles e inmovilizar los proteoglicanos dentro de la matriz extracelular y provee un microambiente osteoinductivo. La integrina α 2 β 1 puede ser responsable de la interacción con la colágena tipo II y de la diferenciación en estadio temprano.

La colágena es un homotrímero, tiene un alto nivel de organización estructural. La unidad básica es el tropocolágena, que está compuesta por tres cadenas polipeptídicas o cadenas α . La **colágena tipo IX** está formada por tres tipos distintos de cadenas α 1 α 2 y α 3, la cadena α 1 contiene una región globular no helicoidal y

la cadena $\alpha 2$ esta modificada para contener una cadena de glucosaminoglicanos. La **colágena tipo X** es de bajo peso molecular que contiene tres cadenas idénticas, se encuentra en la zona calcificada del cartílago (84, 85).

2.10.1 ACAN (Aggrecan)

Es el proteoglucano principal del cartílago también es el componente principal de la matriz extracelular, en forma de agregados de alto peso molecular necesarios para la hidratación del cartílago y satisface sus demandas mecánicas de soporte de peso. El ensamblaje agregado es un proceso altamente ordenado que requiere la formación de un complejo ternario entre aggrecan, proteína de enlace e hialuronano (83, 86), es decir, que se une al ácido hialurónico formando agregados (87). Forma el 35% de las proteínas presentes en el tejido. El tamaño de los agregados varía en función del tamaño de la cadena del ácido hialurónico.

2.11 ADIPOGÉNESIS Y PPAR γ

La adipogénesis es la diferenciación de preadipocitos en adipocitos y es importante para el almacenamiento de lípidos y en el metabolismo del cuerpo humano. La adipogénesis requiere un entorno de apoyo y un receptor activado por un ligando proliferador de peroxisoma gamma (PPAR γ), con el fin de apoyar la diferenciación adipogénica la densidad celular apropiada, la distribución espacial de las células, la matriz extracelular y un estímulo hormonal soluble, tal como receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina, receptor glucocorticoide, o proteína dependiente de monofosfato cíclico de adenosina dependiente de quinasa. Debe estar presente como regulador maestro de la adipogénesis, tanto *in vitro* como *in vivo*, se ha demostrado que PPAR γ es necesario, único y suficiente para la diferenciación adipogénica.

La expresión de PPAR γ inducida por CCAAT/proteína de unión a potenciador (C / EBP) $\beta \alpha \delta$, se acopla en un *loop* de avance directo con C / EBP α para promover adipogénesis (51, 88, 89).

2.11.1 Lipo-Proteína Lipasa (LPL)

Es una enzima que participa en el proceso metabólico de los lípidos, en la regulación de la diferenciación de células espumosas de macrófagos derivados, en el proceso catabólico de lípidos, en el proceso de biosíntesis y catabolismo de los triglicéridos (90).

CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS, OBJETIVOS, PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN

3.1 HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

La hipótesis del presente trabajo es la respuesta de diferenciación de las células del ligamento periodontal es distinta y depende de las propiedades de superficie de cada material. Para realizar dicha evaluación es necesario identificar las diferentes propiedades de superficie tales como la mojabilidad, la topografía, la carga de superficie.

3.2 OBJETIVO GENERAL

Determinar las posibles correlaciones entre las propiedades de superficie (topografía, mojabilidad, carga superficial y composición química) de diferentes materiales (metales, cerámicos y polímeros) con su potencial de diferenciación de células del ligamento periodontal.

3.3 OBJETIVOS PARTICULARES

Cada material tiene una composición diferente, la cual será determinada previamente mediante espectroscopia de dispersión de rayos X (EDS) y se correlacionó con:

- La mojabilidad de los materiales, es decir, el ángulo de contacto del agua sobre las superficies de estudio.
- La composición de la superficie determinada por una técnica de análisis de superficie (espectroscopia de fotoelectrones, XPS)
- La carga en la superficie, es decir, el punto de carga cero.
- La adhesión, viabilidad y citotoxicidad de las superficies con cultivo de células del ligamento periodontal (HPLC).
- La diferenciación celular hacia adipocitos, condrocitos, cemento y osteoblastos sin utilizar medios inductivos de diferenciación.

3.4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para el desarrollo de los biomateriales en el futuro se propone obtener materiales que no solo ofrezcan una respuesta inerte, sino más bien que induzcan respuestas específicas al interactuar con los tejidos biológicos. Para esto es necesario entender el papel que juegan las propiedades superficiales en la respuesta inducida al estar en contacto con las células. En particular, consideramos que la diferenciación celular es un tema que solo ha sido estudiado parcialmente. En la literatura se encuentran estudios del efecto de modificaciones superficiales en la diferenciación celular, pero solo agrupando algún tipo específico de material, por ejemplo o todos son metales, o polímeros o cerámicos o materiales compuestos. Nuestra propuesta es comparar diferentes tipos de materiales; dos metales (titanio comercialmente puro y acero inoxidable 316L), dos cerámicas (porcelana dental y circonita) y dos polímeros (polimetacrilato de metilo y polietileno de alta densidad [PMMA y PEAD]) para ver el efecto de sus propiedades superficiales en el potencial de diferenciación de células de ligamento periodontal hacia cuatro fenotipos; adipocitos, osteoblastos, cemento y cartílago.

3.5 JUSTIFICACIÓN

Los materiales para aplicaciones médicas son seleccionados de acuerdo a sus propiedades volumétricas (dureza y rigidez). Sin embargo, son las características superficiales las que determinan directamente la interacción a nivel celular. De modo que se ha observado que al modificar las propiedades superficiales se puede obtener una mejor respuesta celular, sin que se alteren las propiedades volumétricas del material, como la resistencia mecánica o el módulo a la flexión. A pesar de esto, hay muy pocos estudios que correlacionen propiedades superficiales de materiales totalmente diferentes, como un polímero y un metal o un metal y un cerámico, en lo que se refiere a la respuesta celular. En particular, nos interesa determinar si el potencial de diferenciación celular de cada superficie depende de sus propiedades físicas y químicas, incluyendo las diferentes composiciones químicas. Con esta finalidad seleccionamos 6 materiales, dos de cada familia; polímeros, metales y cerámicos. La propuesta es evaluar, bajo las mismas condiciones de cultivo celular, si la diferenciación celular es diferente entre ellos y determinar si las diferencias tienen un origen claro en consecuencia de las propiedades superficiales.

CAPÍTULO 4. DISEÑO EXPERIMENTAL

4.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

4.1.1 Modificación de la Superficie (Rugosidad).

Se usaron discos (N=180) de acero inoxidable 316L (AI316L) (n=30); titanio comercialmente puro (TCP, Straumann™) (n=30); polimetacrilato de metilo (PMMA, Lucitone 199™) (n=30); polietileno de alta densidad, (n=30) (PEAD, Poly-Maq Paloma 100™); óxido de circonia (ZrO₂. Natura ZIR™) (n=30) y porcelana dental (VITA VM13™) (n=30) de 14 mm de diámetro y 2 mm de grosor, se midió la rugosidad inicial, se realizó un tratamiento superficial por medio de desgaste con lijas de diferente granaje, a todas las superficies de los materiales para producir rugosidades en el intervalo de $2\pm 0.5 \mu\text{m}$, para este procedimiento se utilizó una pulidora UNIPOL-810 MLT; las muestras fueron lavadas y sonicadas con la finalidad de remover los residuos del pulido mecánico para lo cual, las muestras fueron colocadas en un baño de ultrasonido, se utilizaron tres diferentes disolventes en tiempos específicos: acetona por 10 minutos, 20 minutos en isopropanol y 20 minutos en agua destilada estos lavados fueron específicos para los metales; para cerámicos y polímeros se lavaron con agua destilada únicamente.

4.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y QUÍMICA SUPERFICIAL DE LOS MATERIALES

4.2.1 Técnicas Instrumentales

4.2.1.1 *Rugosidad*

La perfilometría es una técnica sencilla y muy sensible para el análisis de la rugosidad superficial de una muestra sólida, posee una punta que puede ser móvil o fija, y ésta detecta los desplazamientos verticales que sufre la punta en su recorrido a lo largo de la superficie de la muestra con la cual se puede determinar su topografía (91).

En perfilometría se utilizan dos modos: de contacto y de no contacto (óptico). La perfilometría de contacto es una técnica directa ya que no requiere modelado. En el perfilómetro de contacto la punta es estática, mientras el portamuestra se mueve vertical o lateralmente bajo la punta haciendo contacto con ella.

La perfilometría de contacto es ampliamente usada para estudios en biomateriales pues determina la rugosidad de la muestra a escalas comparables con las dimensiones celulares(92).

Para evaluar la morfología de las muestras se estableció la rugosidad final de cada superficie hasta obtener la rugosidad deseada (2 ± 0.5 micras) para la obtención de dicha rugosidad final se utilizó un perfilómetro (Veeco Dektak 150™), se hicieron 10 barridos lineales de 500 μm de longitud en cada disco, aleatoriamente. Los perfiles se muestran en la Figura 1Figura 1.

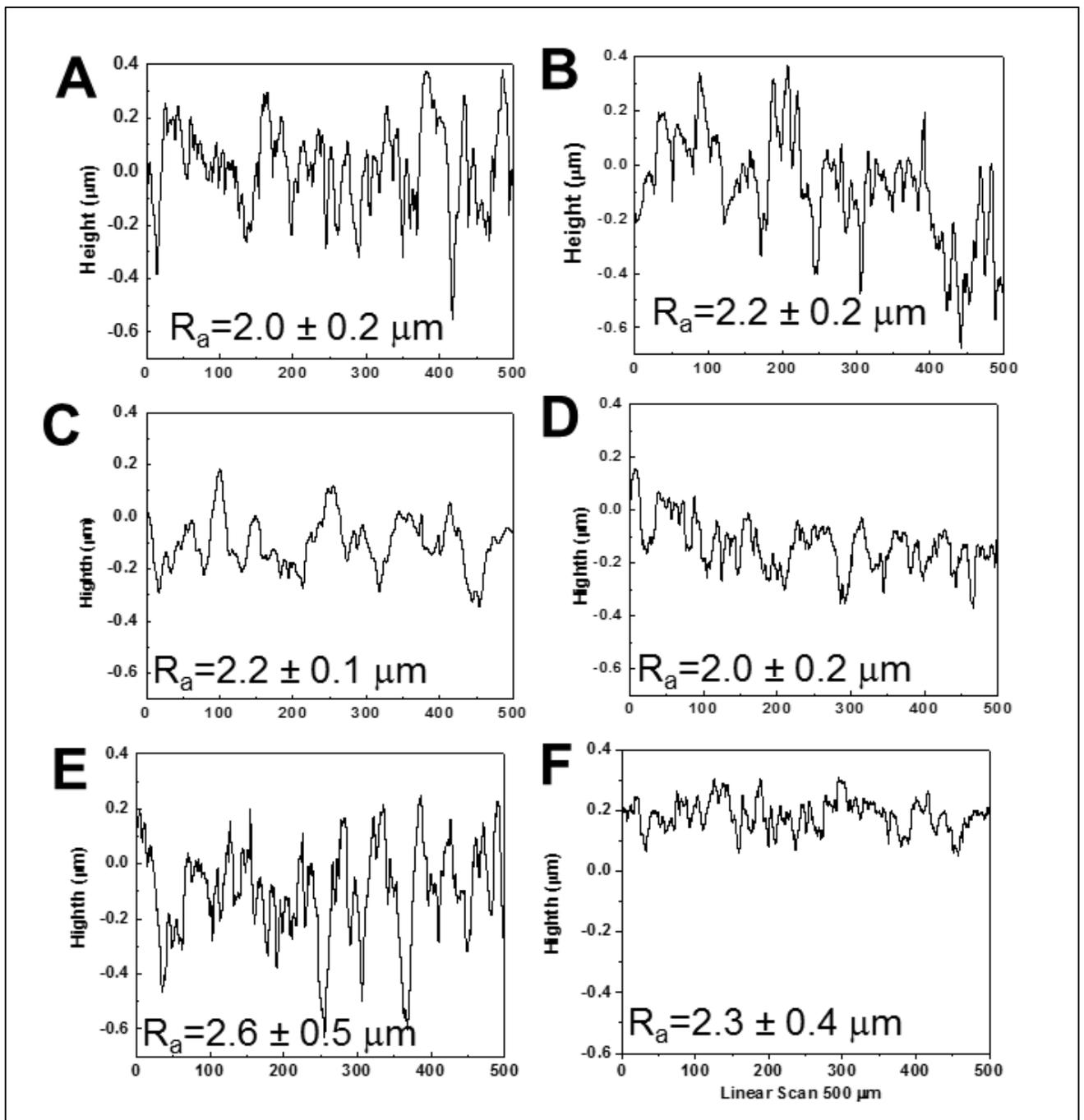


Figura 1. Perfilometría del barrido lineal 500 μm realizada aleatoriamente, se muestra el más representativo de cada material. A) TCP, B) Al316L, C) PEAD, D) PMMA, E) Circonia y F) Porcelana, después de haber sido desgastados con lijas de diferentes granajes para conseguir la rugosidad media (R_a). Fuente directa.

4.2.1.2 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

El principio del funcionamiento del MEB (*Scanning Electron Microscope* por sus siglas en inglés) se basa en un haz de electrones acelerados procedentes de un filamento, el haz es focalizado mediante una serie de lentes electromagnéticas hacia una muestra. Debido a la interacción que sufren estos electrones con la muestra se generan una serie de señales que se recogen y amplifican para obtener información tanto de la morfología, como de la composición química, a través del análisis semicuantitativo.

Una vez obtenida la rugosidad en toda la muestra, se observaron al microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-7600F Field, donde se observaron varias áreas de los discos a diferentes magnificaciones (1,000 y 5,000 X) y a su vez se realizó un análisis semicuantitativo con la técnica de espectroscopia de dispersión de rayos X (EDS, por sus siglas en inglés *energy-dispersive X-ray spectroscopy*)

4.2.1.3 Microscopía de Fuerza Atómica (MFA)

El mecanismo del MFA (*Atomic Force Microscope* por sus siglas en inglés), se basa en la detección de fuerzas que actúan entre una sonda afilada (*cantilever* de silicio) y la superficie de la muestra. Existen varios modos de operación del MFA

1. Modo de contacto: Es ampliamente utilizado entre los diferentes modos del MFA. La punta del MFA está en contacto real con la superficie de la muestra. En este modo se comparan entre los dos tipos de exploración MFA: modo tapping (a) y modo de contacto (b). Por lo general, el primero puede minimizar la deformación de la muestra.
2. Microscopía de fuerza lateral: Mediante este modo se miden las áreas de las fuerzas de fricción superiores e inferiores.
3. Modo de No-contacto: El voladizo oscila por encima de la superficie de interés a una distancia en este modo, que ya no está en el régimen repulsivo sino en el régimen atractivo de la curva de fuerza intermolecular. La operación de la formación de imágenes de nanocontacto es bastante difícil en las condiciones ambientales, debido a la capa delgada existente de agua en la punta y la superficie de interés.

A medida que la punta se aproxima a la superficie de la muestra, se crea un pequeño puente capilar entre la punta y la muestra, y hace que la punta "salte al contacto"

4. Fuerza dinámica \ contacto intermitente: Esto también se conoce como el modo de derivación. La punta del MFA toca o golpea la superficie y está más cerca de la superficie que el modo de no-contacto. Este modo se sabe que mejora la resolución lateral de muestras blandas.
5. Modulación de la fuerza: En este modo se mide la pendiente de la curva fuerza-distancia, que está relacionada con la elasticidad de la muestra
6. Imagen de fase: En este modo se mide el desplazamiento de fase del voladizo oscilante, en relación con la señal de accionamiento. Este desplazamiento de fase puede correlacionarse con propiedades de material específicas que influyen en la interacción punta / muestra. El cambio de fase puede usarse para diferenciar áreas de una muestra con propiedades tan diferentes como fricción, adhesión, viscosidad y elasticidad (93).

Para esta técnica se utilizó microscopía de fuerza atómica en modo de contacto. Este sondeo se realizó sobre las superficies de los 6 diferentes materiales y las áreas de barrido fueron de 30 μm x 30 μm . Para medir se empleó el *Nanosurf Naio AFM* y para el análisis de las imágenes se utilizó el *software SPIP™* (94).

4.2.1.4 Mojabilidad

La energía libre superficial, desde un concepto básico, es el exceso de energía presente en la superficie de un material, como consecuencia de que los átomos de superficie no tienen todos sus enlaces saturados (95). La energía superficial es determinante para comprender la interacción de un material con su medio ambiente, e incluyen interacciones entre diferentes fases; sólido, líquido o vapor. La energía libre superficial de un sólido y la tensión superficial de un líquido son equivalentes (96). Ambas dependen de las interacciones intermoleculares entre las moléculas superficiales de ambas sustancias. Se puede determinar a partir del ángulo que el líquido forma en la superficie de contacto con el sólido. El ángulo de contacto es indicativo de un fenómeno conocido como humectación de la superficie o mojabilidad, ya que los materiales pueden clasificarse como hidrofílicos (mojables)

o hidrofóbicos (no mojables) de acuerdo al intervalo de valores en que se encuentre el ángulo de contacto (97). La mojabilidad es la habilidad de un solvente de propagarse sobre un sólido, esta propiedad es muy importante para los biomateriales que interactúan con fluidos fisiológicos. Para los biomateriales, donde las interacciones de superficie ocurren en soluciones ricas en biomoléculas. Algunos autores han propuesto que el límite entre hidrofobicidad e hidrofiliidad se define a partir de los 65° (98-100). Se realizó la prueba de mojabilidad, se midieron los ángulos de contacto con un goniómetro (*Rame-hart instrument co*TM) con agua desionizada y suero fetal bovino al 10% (Gibco®) con una muestra total de N=210, dando un total de 1120 datos para poder realizar así la prueba estadística. El objetivo de esta prueba es determinar la energía superficial del material formando una gota que se almacena por una cámara de vídeo (*Software Pinnacle Studio Ultimate Collection*®) y se analiza una imagen (*software Image J*®) que calcula el ángulo de contacto de la forma de la gota izquierdo y derecho (2).

4.2.1.5 Espectroscopia de fotoelectrones por rayos X (XPS)

También llamada ESCA (Espectroscopia Electrónica para Análisis Químico). La técnica XPS (por sus siglas en inglés *X-ray photoelectron spectroscopy*) se cataloga dentro de las técnicas analíticas de espectroscopias electrónicas superficiales, denominadas de este modo porque se miden electrones en la superficie.

La emisión de fotoelectrones se puede imaginar como un proceso de 3 etapas:

1. Los rayos X interactúan con los electrones de los átomos que conforman la superficie del material, y le transmiten suficiente energía a estos para ser expulsados y generar los llamados fotoelectrones.
2. Algunos de estos electrones, al viajar a través del sólido hacia la superficie, sufren procesos de dispersión y son emitidos sin ninguna energía característica, lo que da lugar al fondo de emisión del espectro.
3. Los electrones que alcanzan la superficie sin sufrir pérdidas de energía son emitidos al vacío (después de superar la función de trabajo) con una energía cinética característica que permite identificar el elemento del cual proviene.

La energía cinética de los fotoelectrones emitidos se deriva de la diferencia entre la energía de los rayos X incidentes, menos la energía de enlace del electrón en los niveles de energía de los sólidos y la función de trabajo (101).

El análisis básico de XPS de una superficie proporciona información cualitativa y cuantitativa de todos los elementos presentes, excepto H y He; con aplicaciones más sofisticadas de la técnica se obtiene información detallada de la química, de organización y de la morfología de la superficie. La técnica XPS es sensible a la superficie. Es por esto que se utilizó esta técnica para establecer los elementos en superficie y con una erosión previa (19).

4.2.1.6 Punto de Carga Cero (PCC)

El punto de carga cero (PZC por sus siglas en inglés *point of zero charge*) es el pH en el cual la carga neta en la superficie es cero. Debido a que la mayoría de los sitios (cargas) están neutros (102). Es decir, la densidad de sitios positivos y negativos en la superficie es la misma. Para los biomateriales el PCC es importante porque da una idea sobre la carga que está presente en la superficie en un pH fisiológico y como esto puede influir en la interacción del biomaterial con las proteínas, células o bacterias (7, 103).

El PCC se realizó con la valoración potenciométrica de una sal de fondo, con cloruro de potasio 0.01M (KCl). Se ajustó a un pH inicial con ácido clorhídrico 0.01M (HCl) y se colocó cada una de las muestras. Se tituló con hidróxido de sodio 0.01M (NaOH) en volúmenes de 2 ml, se registró el cambio de pH y se obtuvo una curva de pH vs volumen del titulante. El punto en el cual se observa un cambio en la pendiente de la curva obtenida representa el PCC (104).

La valoración se realizó con un potenciómetro *Jeanway* modelo 3540. El ensayo de PCC se validó previamente. Por lo tanto el PCC de cada muestra se realizó una sola vez (105-107).

4.3 ENSAYOS BIOLÓGICOS

4.3.1 Cultivo celular

Las células del ligamento periodontal se aislaron según Hoz (69) y se cultivaron células humanas derivadas del ligamento periodontal (HPLC *Human periodontal ligament cells* por sus siglas en inglés), fueron incubadas en cajas de cultivo de 75 cm², en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*™), suplementado con Suero Fetal Bovino al 10% y antibióticos (100 µg/ml estreptomicina y 100 U/ml penicilina, aminoácidos no esenciales y 1 mM piruvato sódico (Todos de Gibco®). Las células fueron incubadas en un ambiente con 100% de humedad relativa a 37° C, 95% de aire y 5% de CO₂ (69). Los cultivos celulares se usaron en el segundo pasaje para todos los procedimientos experimentales.

4.3.2 Adhesión celular

Se realizaron tres ensayos de adhesión celular:

En el primer ensayo se sembraron 2X10⁴ células del ligamento periodontal sobre los materiales midiendo la absorbancia después de 24 horas de cultivo.

El segundo ensayo de adhesión se sembraron 5X10³ células en cada pozo sobre los diferentes materiales midiendo la absorbancia ahora después de 4 horas de cultivo.

Finalmente el tercero con otra línea celular, fibroblastos gingivales humanos, se sembraron 5X10³ células sobre las superficies de los materiales, midiendo la absorbancia después de 24 horas. Todo lo anterior para ver el comportamiento de las células sobre las superficies comparadas con el control.

Las células del ligamento periodontal fueron sembradas sobre los materiales por triplicado, en cajas de cultivo de 24 pozos (*Costar Corporation*™), se incubaron durante 4 y 24 horas respectivamente en medio DMEM suplementado con 10% de SFB, antibióticos, aminoácidos no esenciales y piruvato sódico, bajo las mismas condiciones del cultivo celular. Una vez concluido el tiempo, se retiró el medio, se

cambiaron los materiales a otro plato de cultivo nuevo y se colocó azul de toluidina al 1% y paraformaldheido al 3.5% durante 3 horas, cumplido el tiempo se retiró todo el sobrenadante, se realizaron varios enjuagues con agua desionizada y una vez secas las muestras se preparó una solución detergente con SDS al 10% y agua desionizada, y se le colocó a cada pozo 300 μ l, los platos de cultivos se pusieron en un agitador (*Orbital Shaker*) durante 15 minutos. Una vez concluido este tiempo se tomaron 150 μ l de cada pozo y se colocaron en cajas de lectura de 96 pozos para medir la absorbancia a 595 nm (Filter Max 5 TM).

4.3.3 Proliferación celular.

El análisis de citotoxicidad mediante el ensayo de MTT se realizó por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de células metabólicamente activas, la cual transforma al MTT de un compuesto hidrofílico de color amarillo a un compuesto azul, hidrofóbico (formazán) (108-110). Las células derivadas del ligamento periodontal humano se sembraron en cajas de cultivo de 96 pozos, a una densidad de 2.5×10^3 células por pozo. El día siguiente se le asignó como día 0, se cambió el medio y se colocaron 10 μ l de MTT (0.5 mg/ml) (110) y se dejaron incubar 4 horas. Posteriormente se retiró todo el medio, se cambian los materiales a una caja de pozos nueva y se colocaron 1000 μ l de DMSO, los platos se agitaron y se incubaron durante 15 minutos, se retiraron 150 μ l de cada pozo y se leyó la absorbancia a 570 nm en el FM5. Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron dos veces. El mismo número de células se evaluaron a 24, 48, y 96 horas, bajo las mismas condiciones.

4.3.4 Expresión Génica

4.3.4.1 Extracción de ARN

El ARN total purificado de las células del ligamento periodontal cultivadas sobre las diferentes superficies mediante la técnica de tiocinato de guanidinio fenol cloroformo (Trizol® *Reagent*) (111) de acuerdo a las especificaciones del fabricante (112). El ARN purificado cuantificado espectrofotométricamente mediante *Nanodrop* 2000 -

2000c, (*Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA™*) con 2 µl de muestra y una absorbancia de 260 nm. La relación de absorbancia a 260nm / 280nm se utilizó para evaluar la pureza del ARN, valor de 2 ± 1 fue aceptado.

Se realizó RT-qPCR con ARN total para determinar la expresión de los genes. La cadena de ADNc fue sintetizada del ARN total. RT-qPCR se usaron los *primers* específicos como se muestra en el Cuadro 1 y el kit SuperScript® III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR (*Invitrogen, Carlsbad, CA*). Para determinar la expresión relativa se utilizó el método de cuantificación relativa $\Delta \Delta C T$ ($2^{-[\text{delta}]}$ $[\text{delta}] C t$) (113) y se utilizó a GAPDH como control endógeno (114).

Cuadro 1. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para el análisis de la expresión génica con RT-qPCR.

Gen (<i>primer</i>)	Secuencia F(5'-3')	Secuencia R (5'-3')
GAPDH	CAACGGATTTGGTCGTATTGG	GCAACAATATCCACTTTACCAGAGTTAA
ALP	AGCACTCCCCTTCATCTGGAA	GAGACCCAATAGGTAGTCCACATTG
BSP	AACGAAGAAAGCGAAGCAGAA	TCTGCCTCTGTGCTGTTGGT
OCN	GGGCTCCCAGCCATTGAT	CAAAGCCTTTGTGTCCAAGCA
CEMP1	TGAGAACCTCACCTGCCTCT	ACCCCTTAGGAAGTGGCTGT
CAP	TCCAGACATTTGCCTTGCTT	TTACAGCAATAGAAAACAGCATGA
Coll II	CGGCTTCCACACATCCTTAT	CTGTCTTCGGTGTTCAGGG
Coll X	GTGGACCAGGAGTACCTTGC	CATAAAAGGCCCACTACCCA
Coll XI	GTCATATGCTGCCTTGGGAT	AATGGAATCACGGTTTTTGG
Aggrecan	ACAGCTGCAGTGATGACCCT	TTCTTGGAGAAGGGAGTCCA
SOX 9	GTAATCCGGGTGGTCCTTCT	GACGCTGGGCAAGCTCT
LPL	TCAGCTGTGTCTTCAGGGG	CTCCAGAGTCTGACCGCCT
PPARγ	AGGCCATTTTGTCAAACGA	GAGAGATCCACGGAGCTGA

4.3.4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa con Transcriptasa Reversa (RT-qPCR)

La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-qPCR del inglés *Reverse transcription polymerase quantitative chain reaction*) es una variante de PCR una técnica de laboratorio usada en biología molecular para generar una gran cantidad de copias de ADN, proceso llamado "amplificación". En el RT-qPCR, sin embargo, un templado de ARN es retrotranscripto en ADN complementario (ADNc) mediante una enzima llamada transcriptasa inversa:

Un templado de ADN, un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado una ADN polimerasa; a dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo, en un termociclador que albergue sensores ópticos. Para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos (115).

CAPÍTULO 5. RESULTADOS

5.1 RESULTADOS FISICOQUÍMICOS

5.1.1 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) y Espectrometría de Dispersión de Energía de Rayos X (EDS)

El análisis de las superficies mostró que a pesar de que los valores de rugosidad promedio fueron muy similares entre las muestras, la topografía superficial luce muy diferente. La rugosidad promedio es similar entre los materiales pero la topografía de cada uno depende de sus propiedades estructurales y mecánicas. Los metales presentan claramente las rayas del pulido mecánico, mientras que los polímeros presentan un patrón fibroso, totalmente desordenado en el PEAD y alineado en el PMMA. La circonia, por su parte, muestra los granos cristalinos y la porcelana muestra los rasgos característicos de su producción por un proceso de empastado, como se observa en la Figura 2.

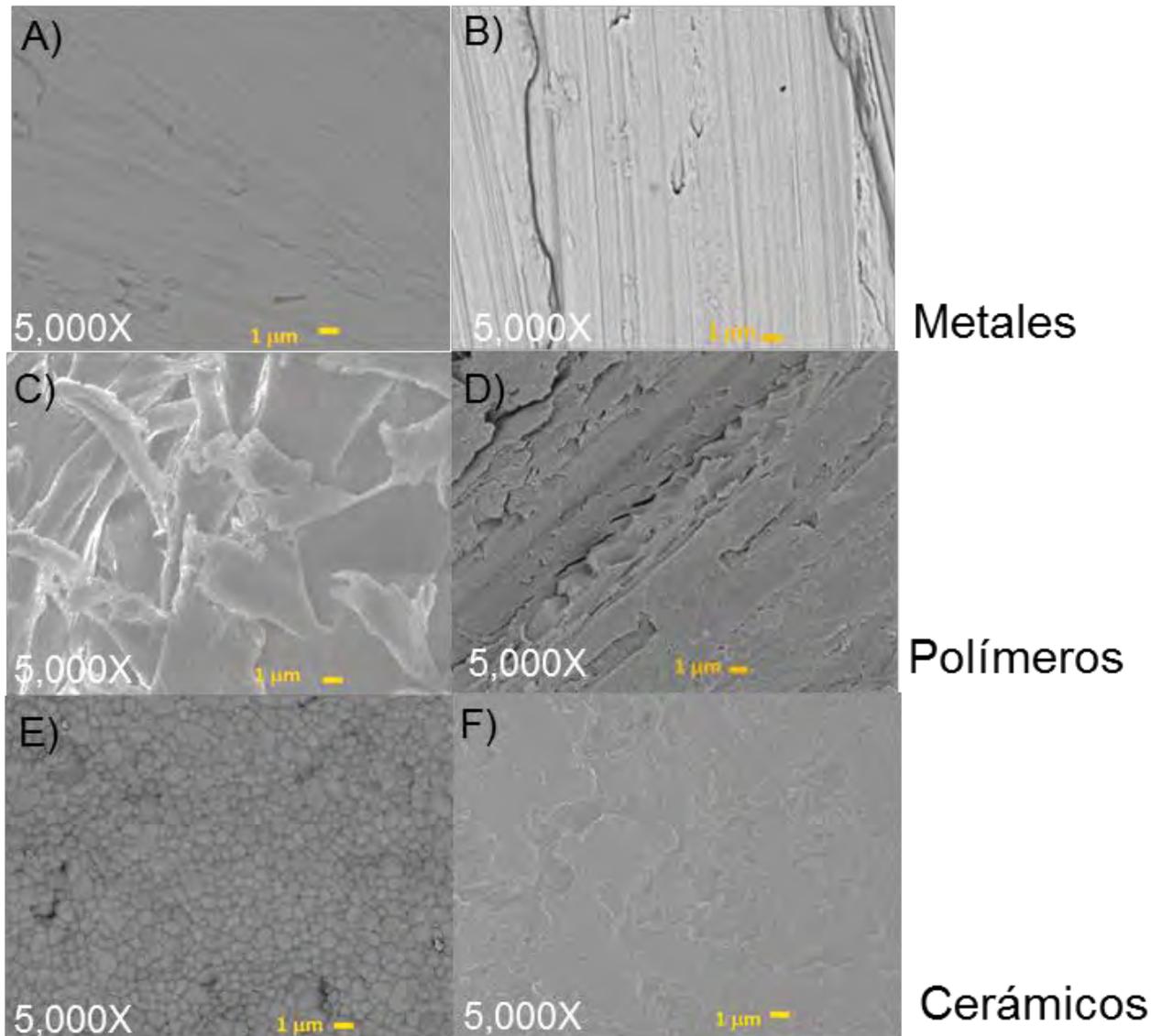


Figura 2. Microfotografías de barrido de la topografía superficial a una magnificación de 5,000X para los diferentes materiales, con rugosidad de $2 \pm 0.5 \mu\text{m}$ A) TCP, B) Al316L, C) PEAD, D) PMMA, E) Circonia, F) Porcelana. En el ángulo superior derecho de cada imagen se puede observar la Ra. Fuente directa.

Se realizó el análisis semicuantitativo con EDS a cada superficie como se observa en la Figura 3. El titanio (figura 3A) solo presenta picos relacionados con el Ti. Es decir, es 100% de Ti. Para el acero (figura 3B) se observan los principales elementos; Fe seguido del Cr, Ni, y C. La porcelana (figura 3C) presenta Na, C, Si, O y N mientras que la circonia presenta solo señales de Zr y O (figura 3D). Ambos polímeros solo presentan presencia de C y Oxígeno (figura 3 E y F)

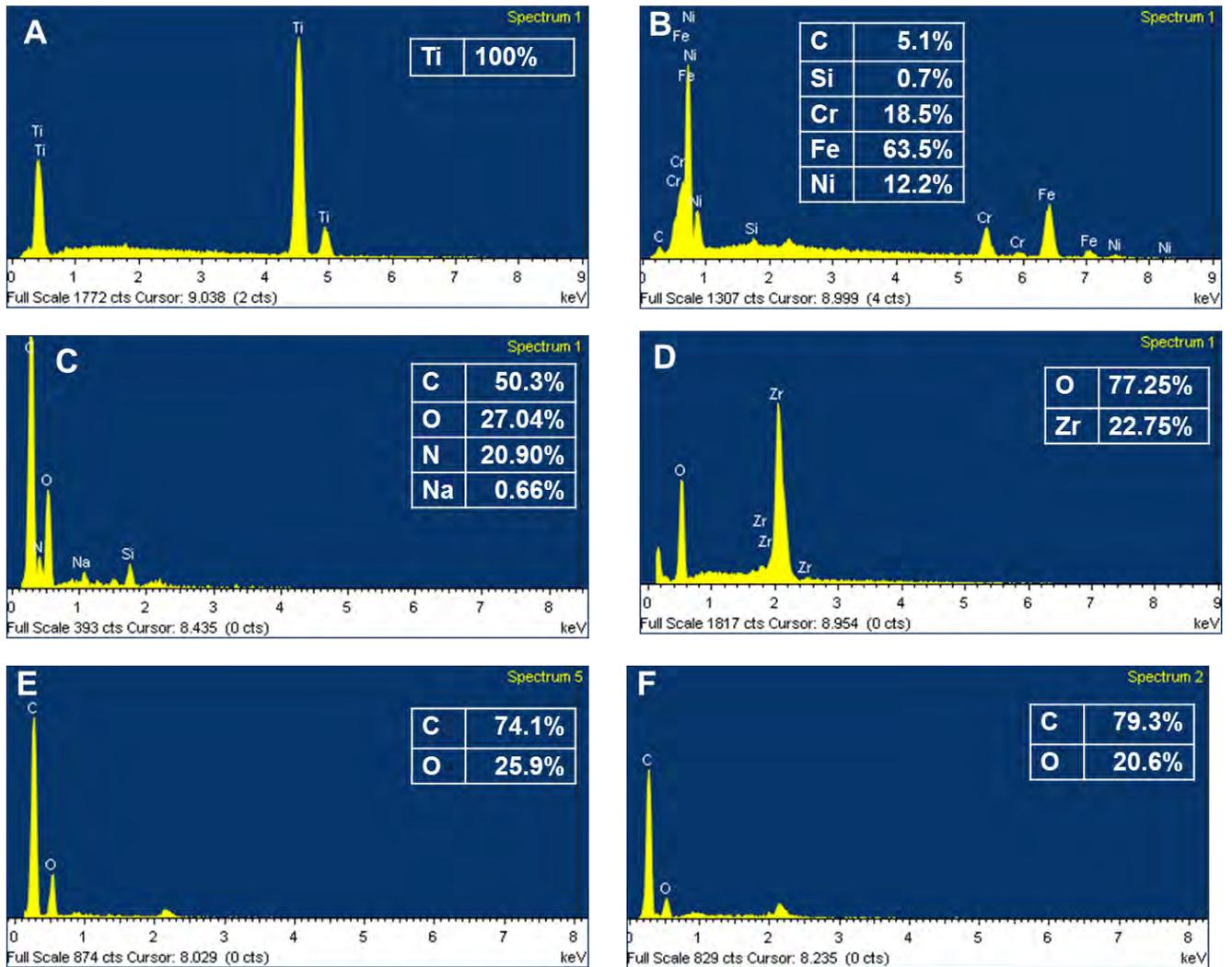


Figura 3. Espectroscopia de dispersión de rayos X (EDS). En los cuadros se observa el elemento y el porcentaje atómico de cada material A) TCP B) Al316L, C) Porcelana D) Circonia, E) PEAD y F) PMMA. Fuente directa.

5.1.2 Microscopía de Fuerza Atómica (MFA)

La técnica de MFA aporta un mejor contraste topográfico de la superficie de una muestra, pues oscurece las partes más bajas de la superficie, mientras que las partes más altas las aclara y, además, se obtiene una medida directa de la altura. Por lo tanto, con esta técnica es posible obtener características de la superficie relacionadas con la topografía. En la Figura 4 se observa el mapeo de las superficies con la respectiva rugosidad media (R_a) de cada muestra al centro de cada imagen, y se representa el resultado de las diferentes superficies, en nm.

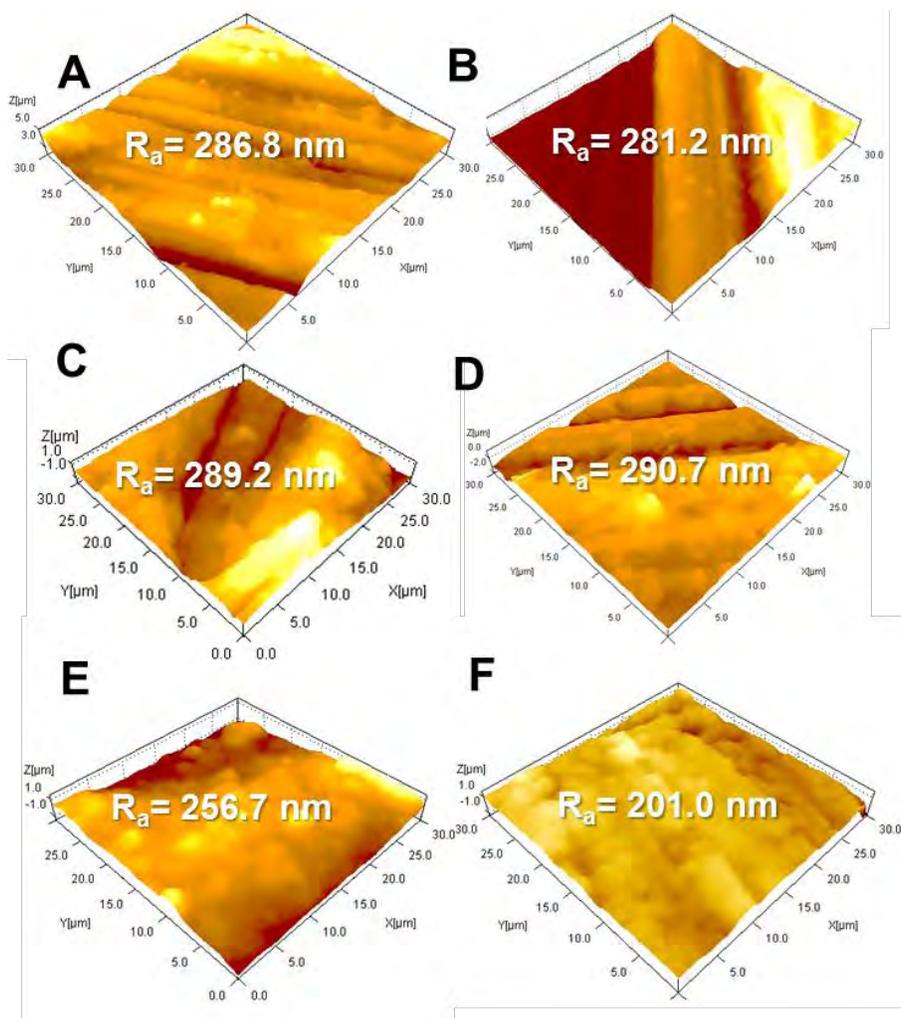


Figura 4. Microscopía de fuerza atómica a una amplificación de $30 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$ (eje z). Se usó un tratamiento de superficie para producir una rugosidad media A) TCP, 1B) Al316L, 1C) PEAD, 1D) PMMA, 1E) Circonia y 1F) Porcelana. Todas las superficies de los diferentes materiales con su respectiva rugosidad media (R_a). Fuente directa.

5.1.3 Mojabilidad

En la prueba de mojabilidad se midieron ambos ángulos de contacto (izquierdo y derecho), en la Figura 5 se observa las imágenes de las gotas de agua desionizada sobre los diferentes materiales, donde el TCP, circonia y porcelana mostraron fuerzas adhesivas. Es decir, el líquido se extiende por casi toda la superficie y el PEAD, PMMA y Al316L mostraron fuerzas cohesivas, es decir, cuando el líquido se abulta y tiende a evitar la superficie (116).

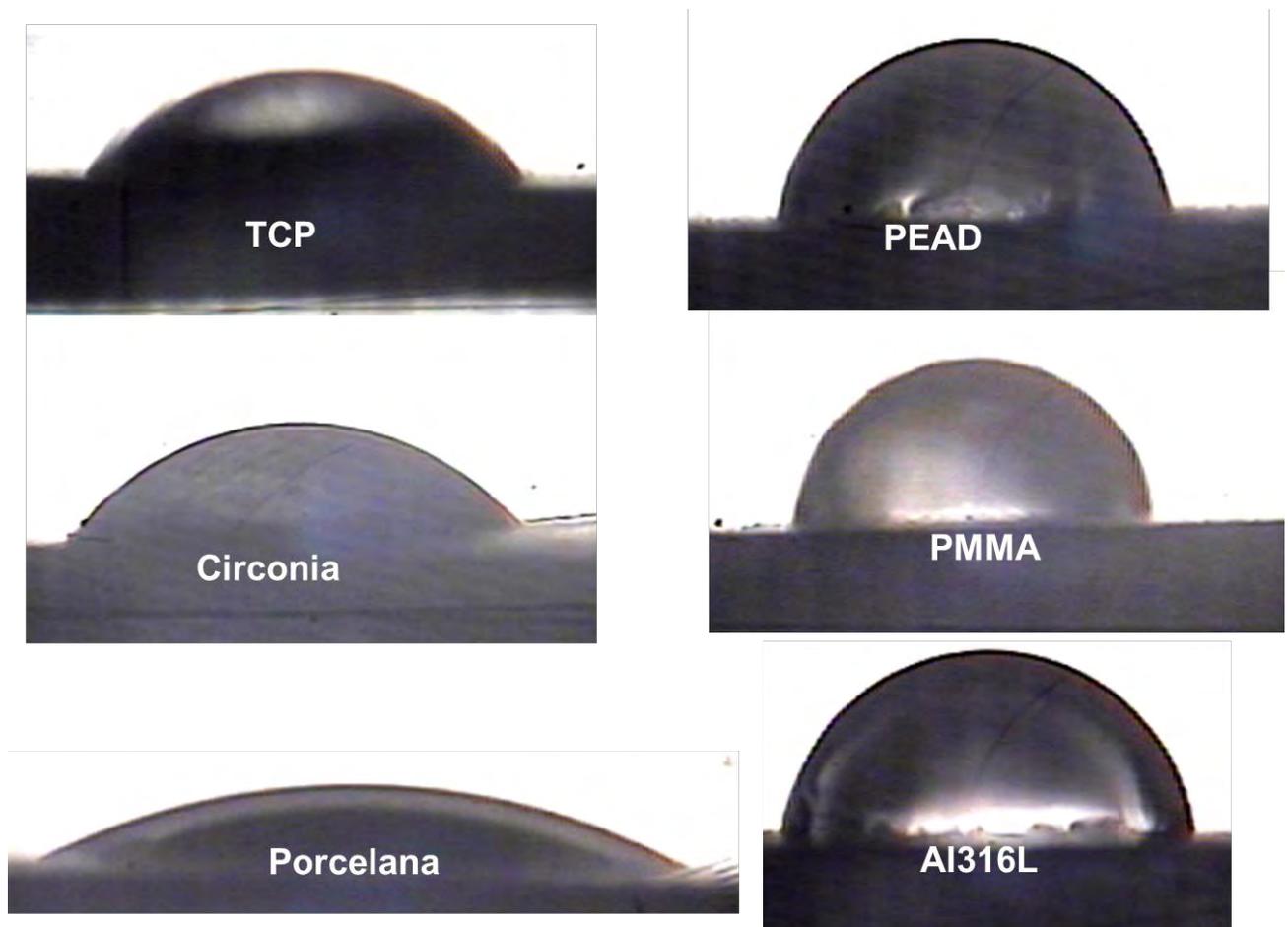


Figura 5. Se observa la imagen de la gota sobre las superficies de cada material. Del lado izquierdo el TCP, la Circonia y la Porcelana con fuerzas adhesivas y del lado derecho el PEAD, PMMA y Al316L con fuerzas cohesivas. Fuente directa.

El ángulo de contacto determinado se obtuvo con un goniómetro con agua desionizada y SFB al 10% (Gibco®) con una muestra total de N=210, dando un total de 1120 datos para poder realizar así la prueba estadística. En la Figura 6 se observa la comparación de ambos líquidos (agua desionizada y SFB10%) sobre las superficies, esto para establecer en el análisis estadístico, donde no existen diferencias significativas, al comparar la superficie con agua desionizada y con suero fetal bovino 10%. El TCP, la porcelana y circonia son las superficies más hidrofílicas ($<65^\circ$), mientras que el Al316L, PEAD y PMMA presentan un carácter más hidrofóbico ($>65^\circ$).

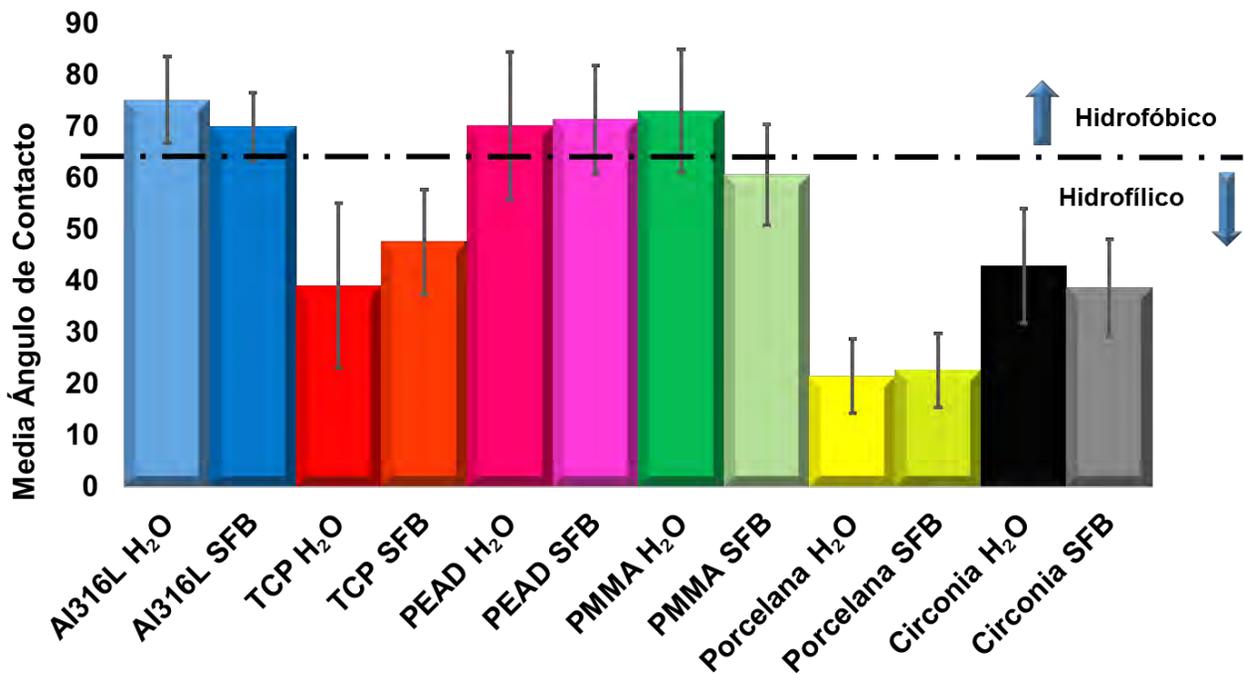


Figura 6. Prueba de mojabilidad donde se compara el comportamiento de los 2 líquidos (agua desionizada y suero fetal bovino 10%) sobre las superficies de los diferentes biomateriales y una línea punteada que divide, según Vogler (98, 117), los materiales de acuerdo a su hidrofobicidad ($>65^\circ$) e hidrofiliidad ($<65^\circ$). Fuente directa.

Se realizó una prueba múltiple de comparación para establecer diferencias entre cada líquido utilizado sobre las superficies y, en la Figura 7, se observa una gráfica de barras color azul de las superficies medidas con agua desionizada donde el Al316L, PEAD y PMMA no tuvieron diferencias estadísticamente significativas y en la gráfica de barras color rojo las superficies con SFB10% el Al316L y el PEAD no tuvieron diferencias estadísticamente significativas.

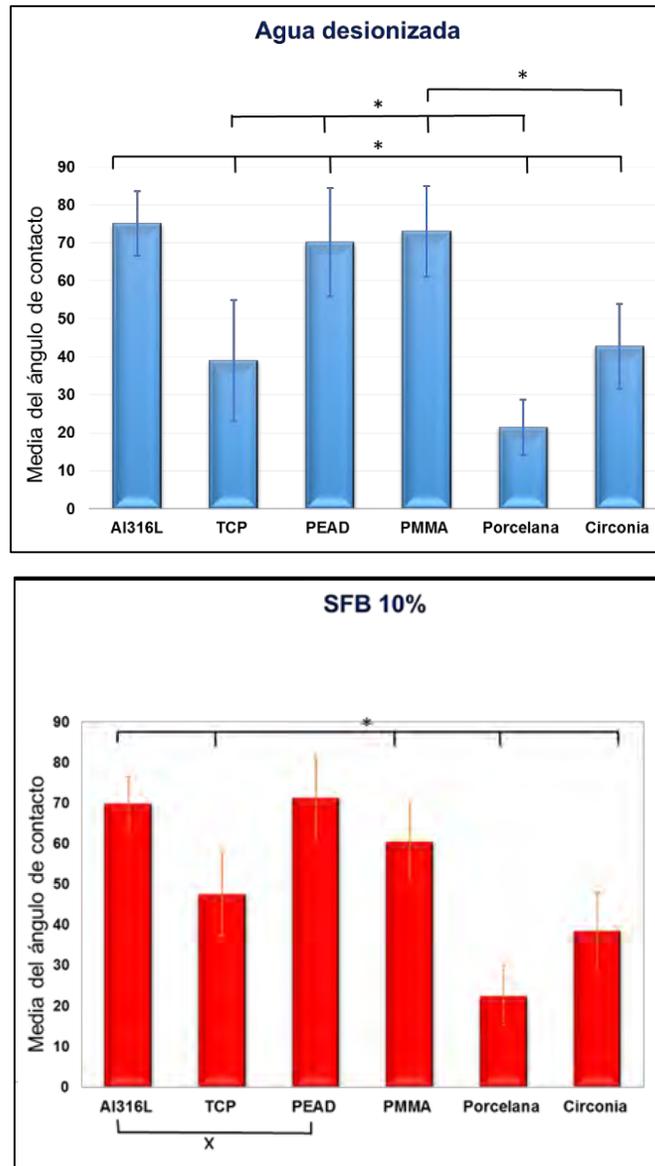


Figura 7. En la gráfica de agua desionizada se muestra el comportamiento de los diferentes materiales con su respectiva desviación estándar así como sus diferencias significativas y en la gráfica con SFB 10% se muestra el comportamiento de los diferentes materiales. Prueba de comparación múltiple de *Tukey* ($p \leq 0.05$ significancia). Fuente directa.

La composición química en la superficie de los diferentes materiales se obtuvo mediante XPS. En las figuras 8 y hasta la figura 13 se observa el espectro de baja resolución de cada una de las superficies de los diferentes materiales, donde pueden observarse los elementos que se encuentran a nivel superficial (10 nm de la superficie).

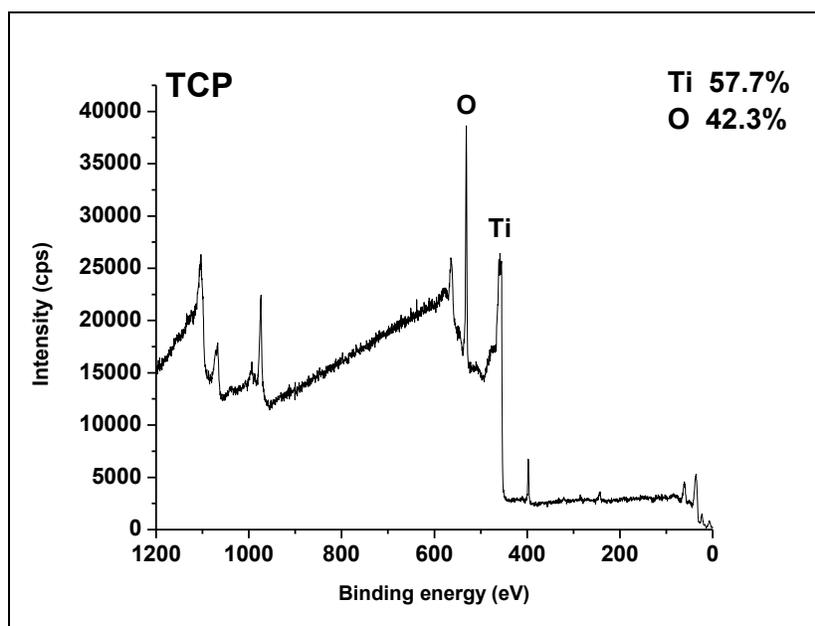


Figura 8. Espectro de baja resolución representativo del análisis por XPS para la superficie de TCP. Fuente directa.

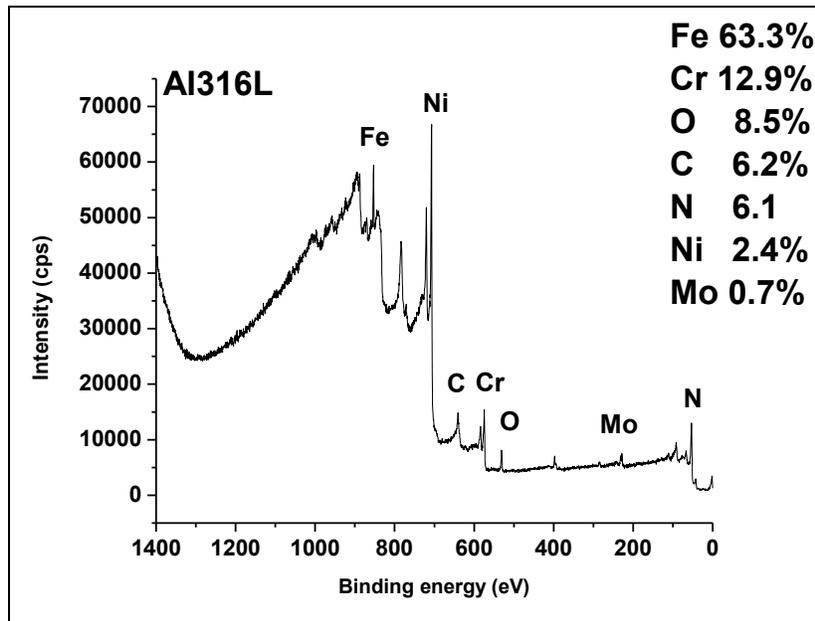


Figura 9. Espectro de baja resolución representativo del análisis por XPS para la superficie de Al316L. Fuente directa.

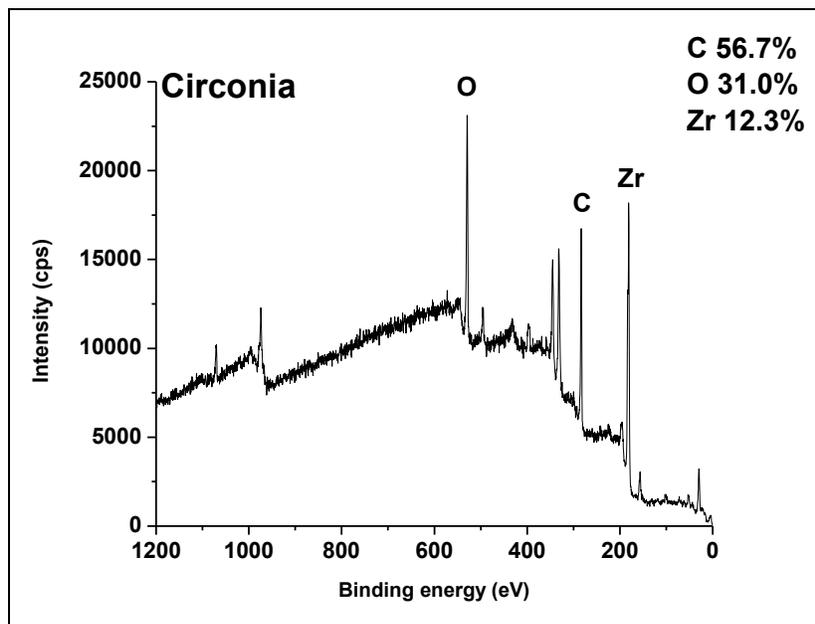


Figura 10. Espectro de baja resolución representativo del análisis por XPS para la superficie de Circonia. Fuente directa.

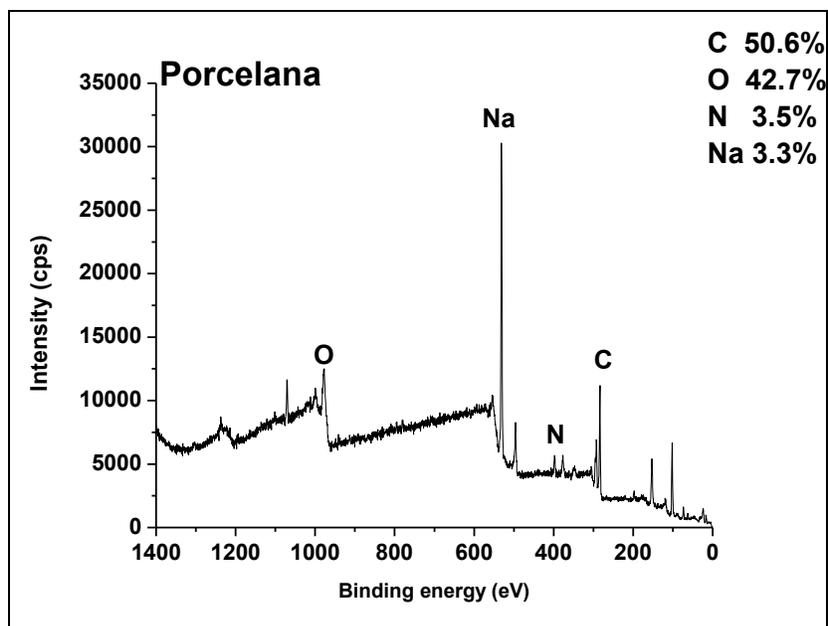


Figura 11. Espectro de baja resolución representativo del análisis por XPS para la superficie de Porcelana. Fuente directa.

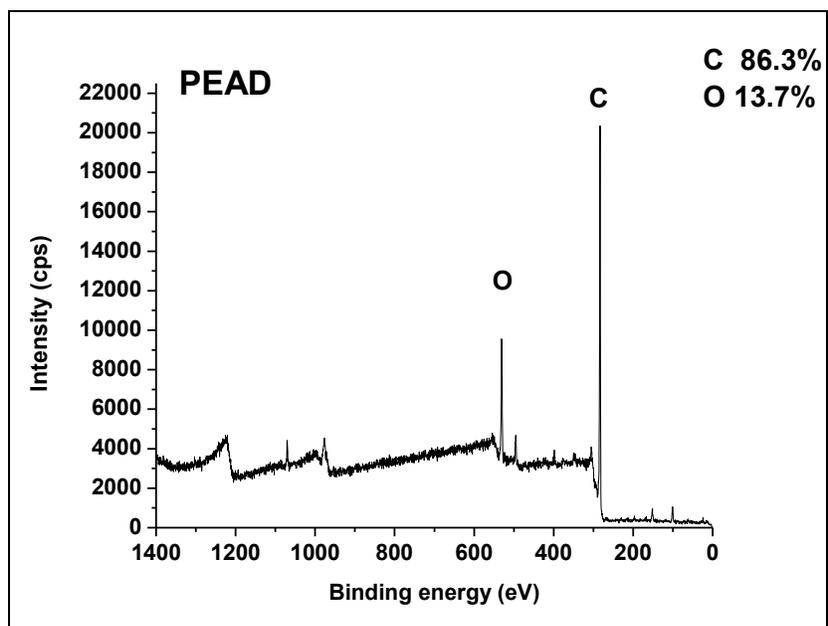


Figura 12. Espectro de baja resolución representativo del análisis por XPS para la superficie de PEAD. Fuente directa.

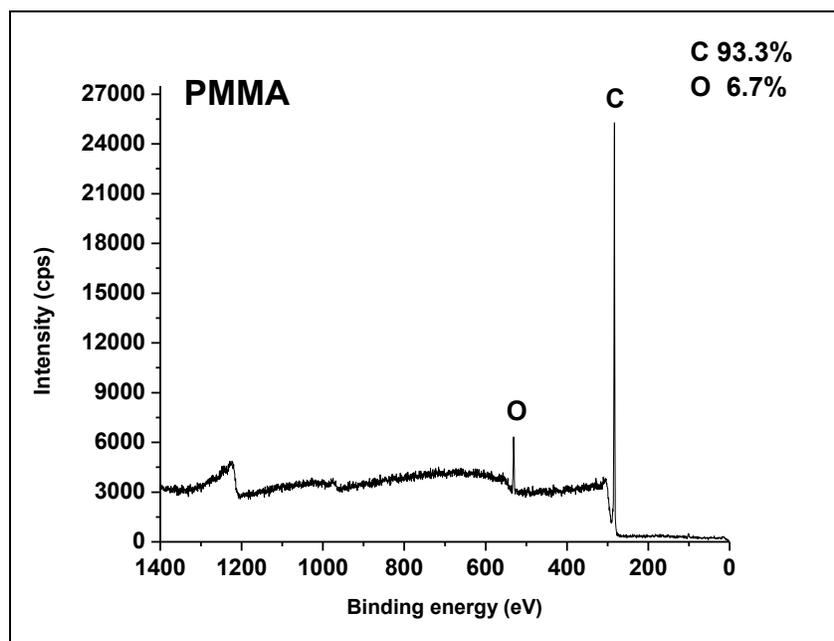


Figura 13. Espectro de baja resolución representativo del análisis por XPS para la superficie de PMMA. Fuente directa.

5.1.4 Punto de Carga Cero (PCC)

El punto de carga cero es el pH al cual se tiene una carga neta cero en la superficie. Conociendo el PCC es posible identificar la carga superficial que hay en un material a un pH dado, como lo es el pH fisiológico (106).

La importancia del análisis del PCC en biomateriales radica en saber que carga tiene el biomaterial en su superficie cuando es colocado de manera *in vitro*, donde generalmente el pH fisiológico es neutro (alrededor de 7.2).

En el Cuadro 2 se observa que el TCP y el PMMA tienen cargas negativas ($\text{pH} < 7$) y el Al316L, PEAD, porcelana y circonia presentan una carga levemente positiva ($\text{pH} > 7$) si se tiene en cuenta que los cultivos celulares se realizan a pHs alrededor de 7.

Cuadro 2. pH de cada material después de realizar el PCC

Material	Al316L	TCP	Circonia	Porcelana	PMMA	PEAD
pH	7.3 ± 0.1	4.6 ± 0.3	7.4 ± 0.1	6.7 ± 0.3	4.8 ± 0.2	7.2 ± 0

Fuente directa.

5.2 RESULTADOS BIOLÓGICOS

5.2.1 Ensayo de Adhesión Celular

En la Figura 14 se observan los resultados de la prueba de adhesión con células del ligamento periodontal después de 24 horas en cultivo. Inicialmente se sembraron 20,000 células en cada plato de cultivo. Los resultados mostraron que el grupo control tuvo una menor adhesión, comparado con el resto de los materiales mediante estadística de Dunnett, por tal motivo se repitió la prueba.

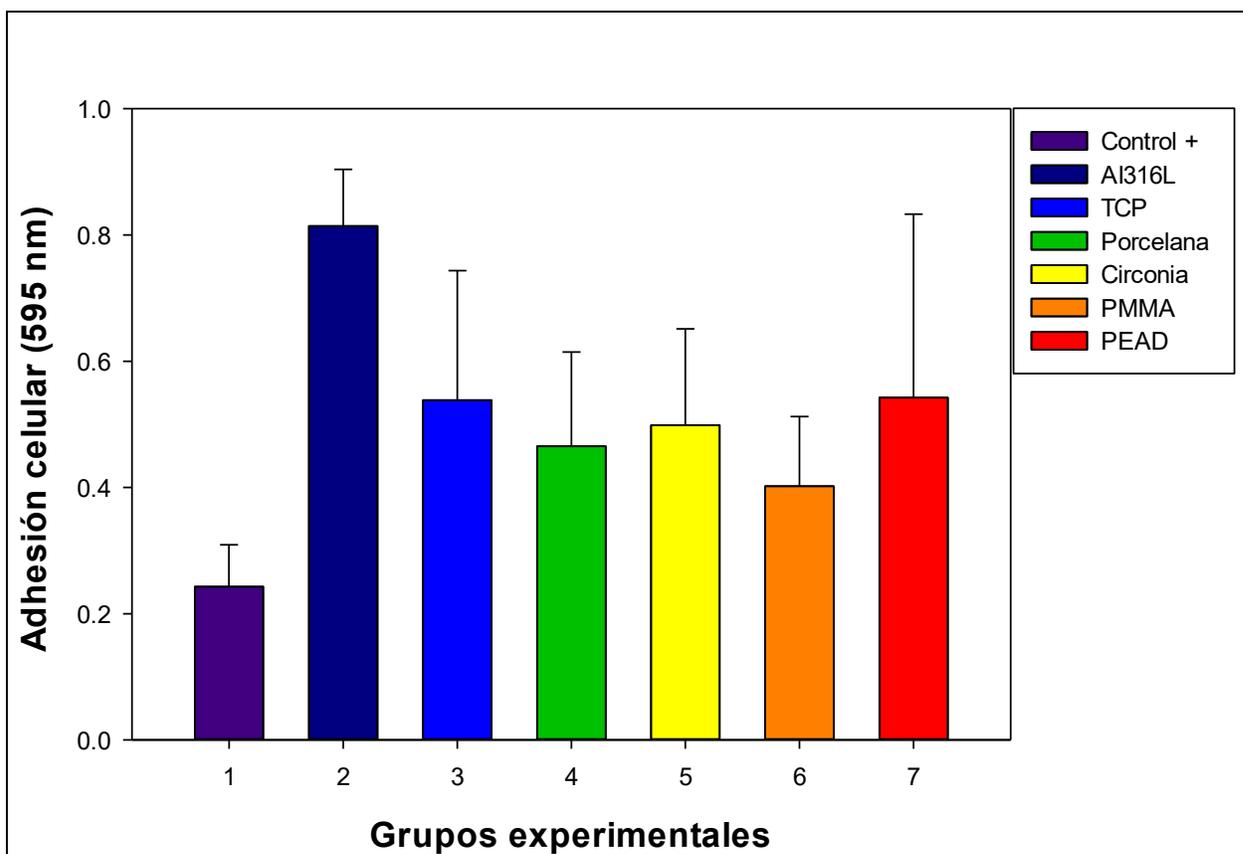


Figura 14. Ensayo de adhesión después de 24 horas de cultivo con células del ligamento periodontal. Fuente directa.

Se repitió la prueba de adhesión pero ahora a 4 horas y con 5,000 células sembradas en cada pozo. Como resultado en la Figura 15 se observa que el TCP fue similar al control. Sin embargo, para las otras superficies, el control obtuvo menor adhesión que el resto de las muestras y entre todos los grupos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, $p \leq 0.05$ después de 4 horas.

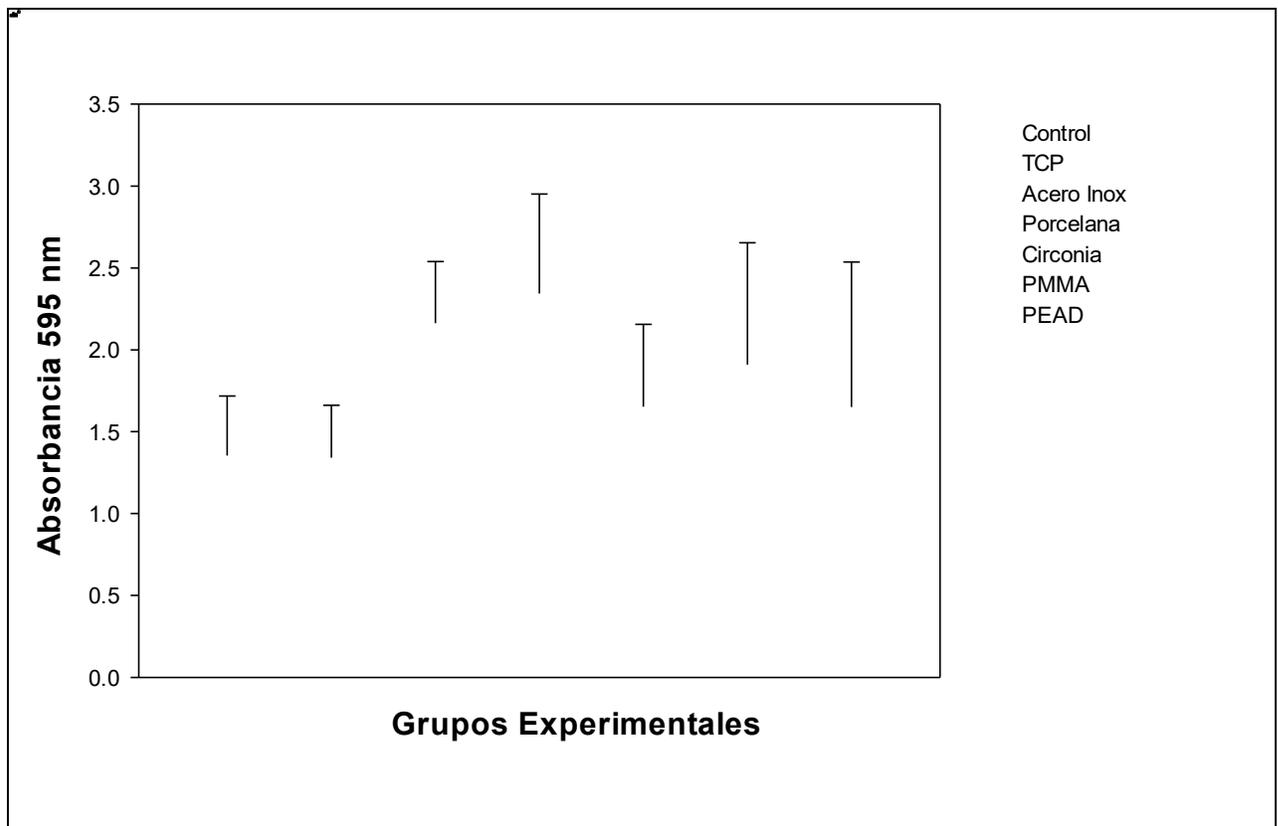


Figura 15. Ensayo de adhesión después de 4 horas de cultivo con células del ligamento periodontal, donde no se observan diferencias estadísticamente significativas en todos los materiales con respecto al control. Fuente directa

Se realizó una tercera prueba de adhesión ahora con fibroblastos gingivales humanos con la finalidad de comparar el comportamiento del grupo control con las anteriores pruebas de adhesión. Las células del ligamento periodontal se obtuvieron en su segundo pasaje y se colocaron sobre las superficies de los materiales después de 24 horas de cultivo. Los resultados se muestran en la Figura 16. Se observa el mismo comportamiento que con células del ligamento periodontal, donde el control es presenta menor adhesión cuando se compara con el resto de las superficies.

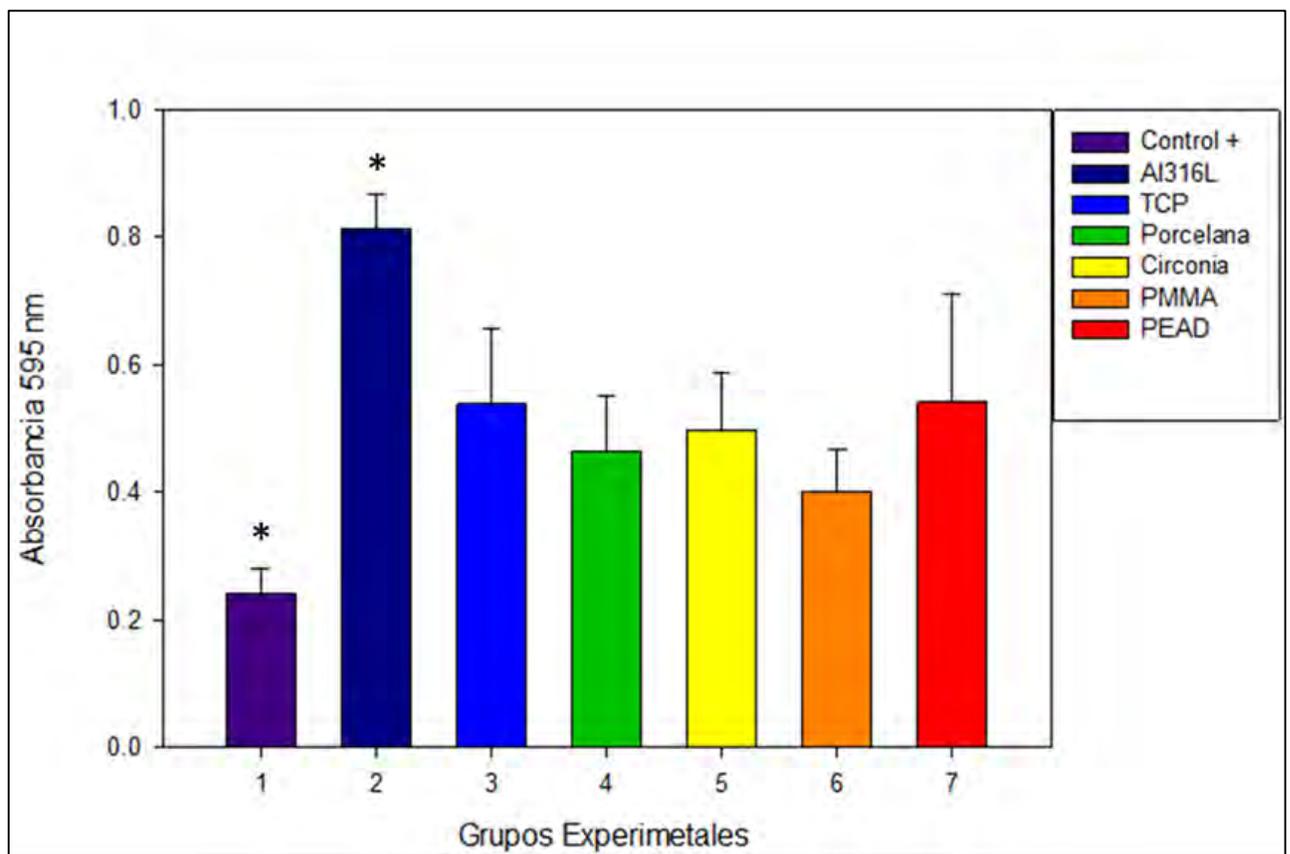


Figura 16. Ensayo de adhesión después de 24 horas de cultivo celular con fibroblastos gingivales humanos. Fuente directa

5.2.2 Ensayo de Proliferación Celular

El ensayo de proliferación se realizó con células del ligamento periodontal. Los resultados muestran que las seis superficies tienen altas tasas de proliferación después de 4 días en cultivo, con la excepción de la superficie de PMMA, presenta una disminución en la proliferación de aproximadamente el 50%, en comparación con el control. El TCP presentó el 85% de proliferación en comparación con el control a las 96 horas. La superficie de PEAD también presentó alta proliferación, ya que después de 96 horas había un incremento celular del 87%, en comparación con el control. La circonia, el Al316L y la porcelana mostraron un comportamiento por encima del 70% cuando se comparan con el control. Estos resultados confirman que los materiales no son citotóxicos como se puede apreciar en la Figura 17.

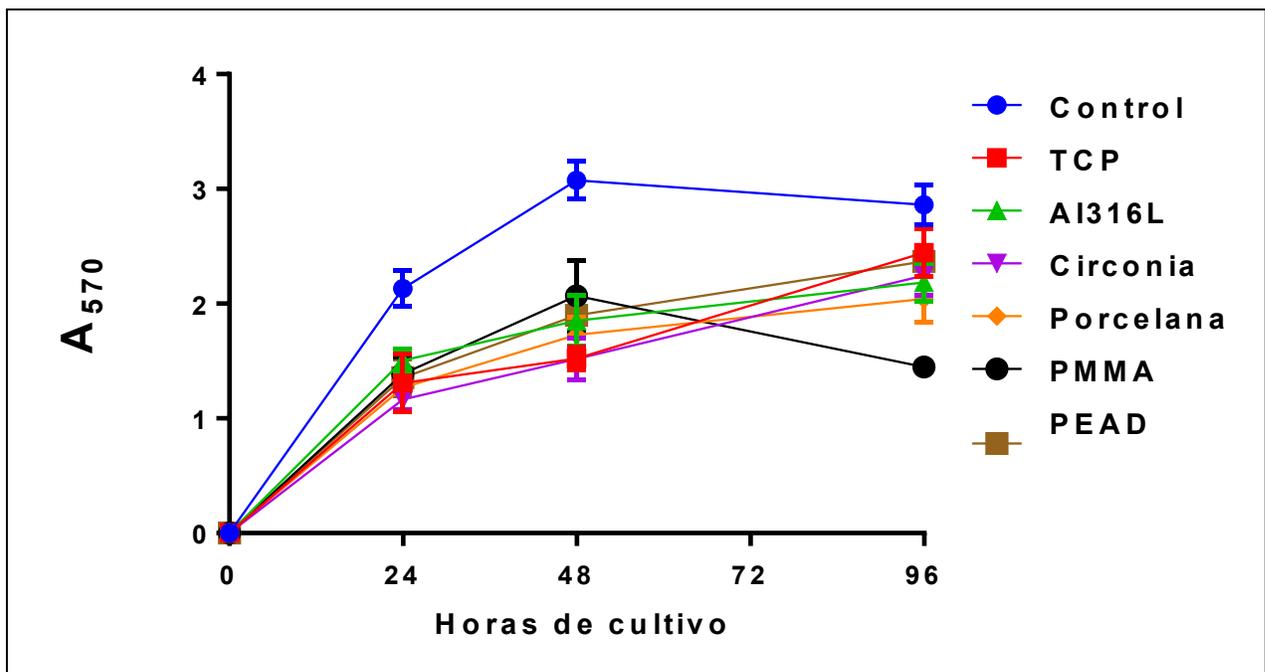


Figura 17. Ensayo de proliferación con células del ligamento periodontal después de 24, 48 y 96 horas con la prueba colorimétrica MTT. Fuente directa

5.2.3 Expresión génica

5.2.3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa con Transcriptasa Reversa (RT-qPCR)

La expresión del marcador osteoblástico BSP se observa en la Figura 18 después de 5, 10 y 15 días de cultivo celular, en la BPS cuando se compara con los diferentes materiales se concluye que hubo una expresión significativa sobre la superficie de TCP a los 10 y 15 días, seguido de PMMA a los 10 días.

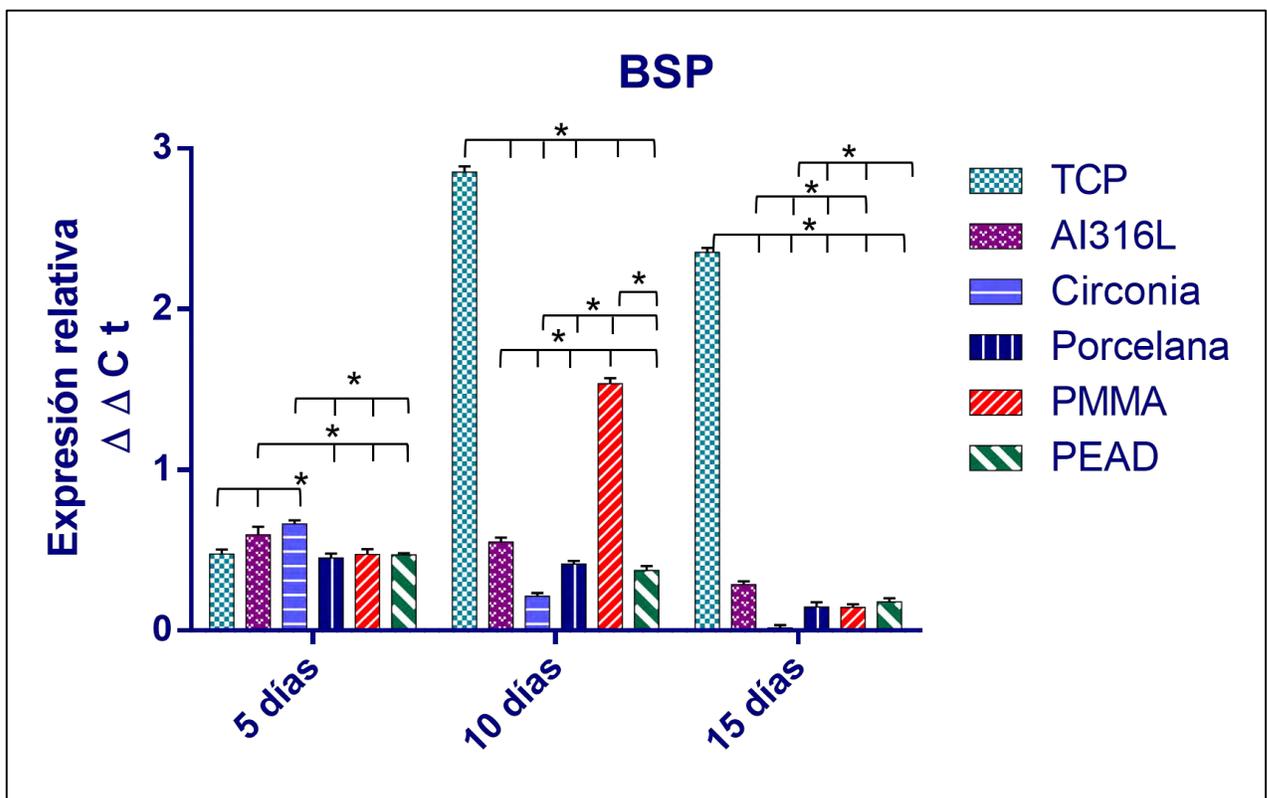


Figura 18. Expresión génica del marcador de osteoblastos BSP después de 5, 10 y 15 días de cultivo con HPLC sin medio de inducción. Prueba de comparación múltiple de *Tukey* con diferencias significativas (*) $p \leq 0.05$ ($n = 3$). Fuente directa.

Se observa la expresión del marcador osteoblástico ALP en la Figura 19 donde se compara la expresión entre las superficies y al día 15 días sobre el TCP se observa una diferencia significativa así como en el día 15 sobre la superficie de Al316L, Porcelana, PMMA y PEAD excepto en circonia.

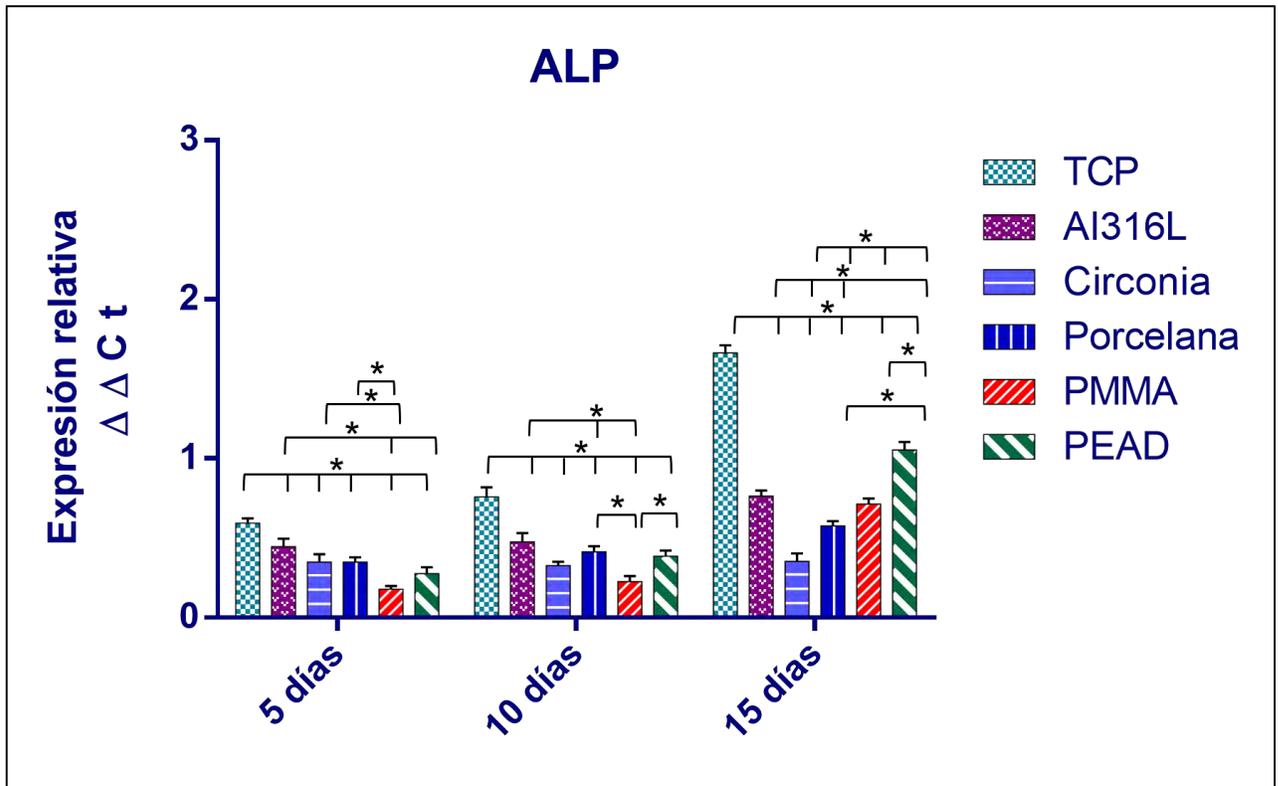


Figura 19. Expresión génica del marcador de osteoblastos ALP después de 5, 10 y 15 días de cultivo con HPLC sin medio de inducción. Prueba de comparación múltiple de *Tukey* con diferencias estadísticamente significativas (*) $p \leq 0.05$ ($n = 3$). Fuente directa.

Se observa la expresión del marcador osteoblástico OCN en la Figura 20 que al realizar la comparación entre las demás superficies mostró una actividad muy similar entre todos los materiales a los 5 días, sin embargo a los 10 días no hubo diferencias entre el TCP y la porcelana, y a los 15 días la superficie de TCP demostró diferencias con el resto de las superficies cuando se compararon estadísticamente.

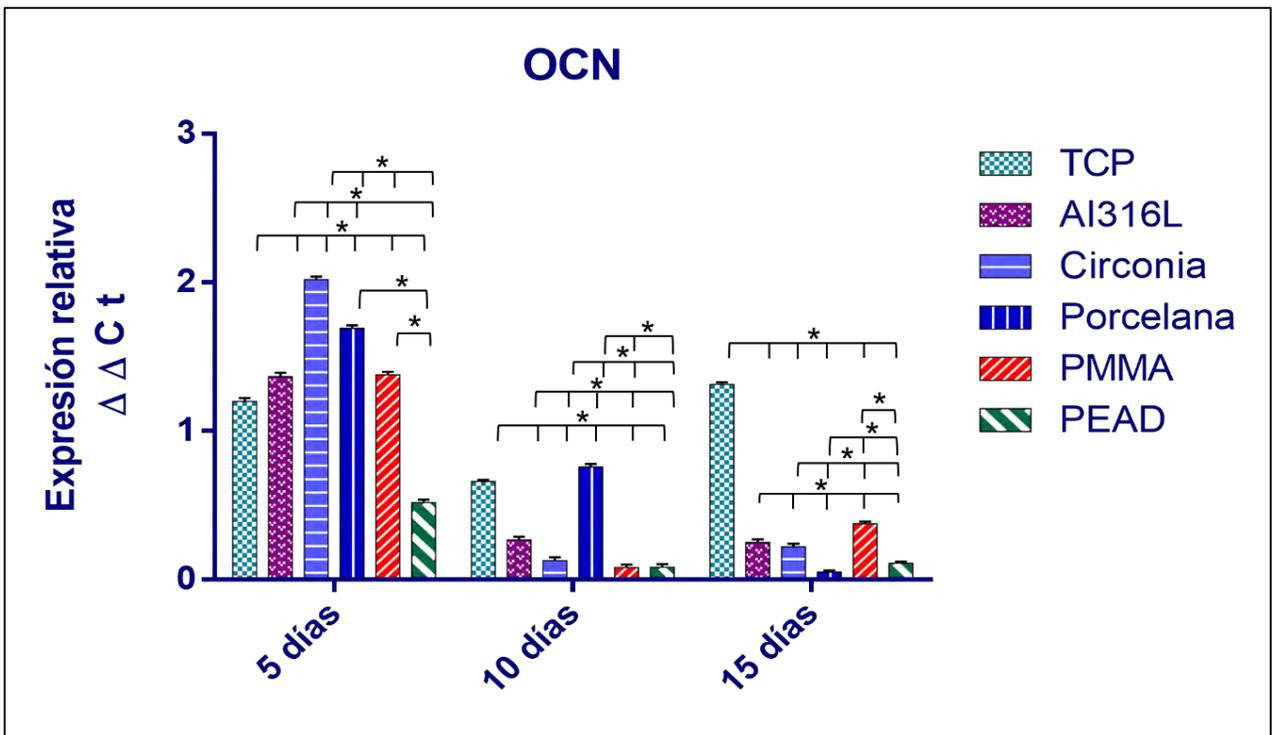


Figura 20. Expresión génica del marcador de osteoblastos OCN después de 5, 10 y 15 días de cultivo con HPLC sin medio de inducción. Prueba de comparación múltiple de *Tukey* con diferencias estadísticamente significativas (*) $p \leq 0.05$ ($n = 3$). Fuente directa.

La proteína de adhesión del cemento (HACD1/CAP) se conoce como proteína nucleadora de la hidroxiapatita debido que su expresión se ve marcada a los 5 días de cultivo. En la Figura 21 cuando se compara entre las diferentes superficies se observa que la expresión significativa es sobre el TCP, seguida de la porcelana y Al316.

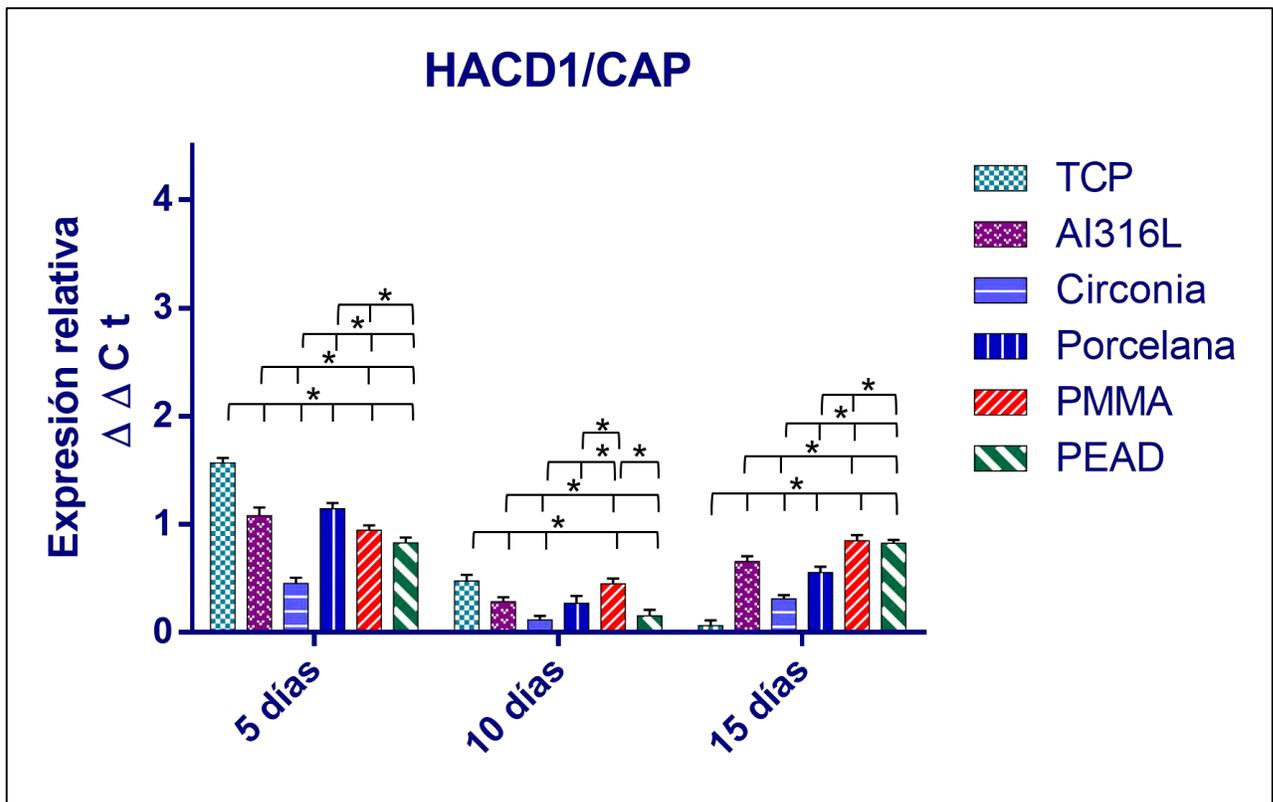


Figura 21. Expresión génica del marcador de cementoblastos HACD1/CAP después de 5, 10 y 15 días de cultivo con HPLC sin medio de inducción. Prueba de comparación múltiple de *Tukey* con diferencias estadísticamente significativas (*) $p \leq 0.05$ ($n = 3$). Fuente directa.

La CEMP1 se ha descrito que tiene función de lectina, es decir proteína con afinidad a carbohidratos por lo que explica cuando se compara entre las diferentes superficies la expresión significativa en el día 5 sobre el PEAD y al ser una molécula iniciadora del frente de mineralización se observa sobre el TCP a los 15 días de cultivo como se observa en la Figura 22.

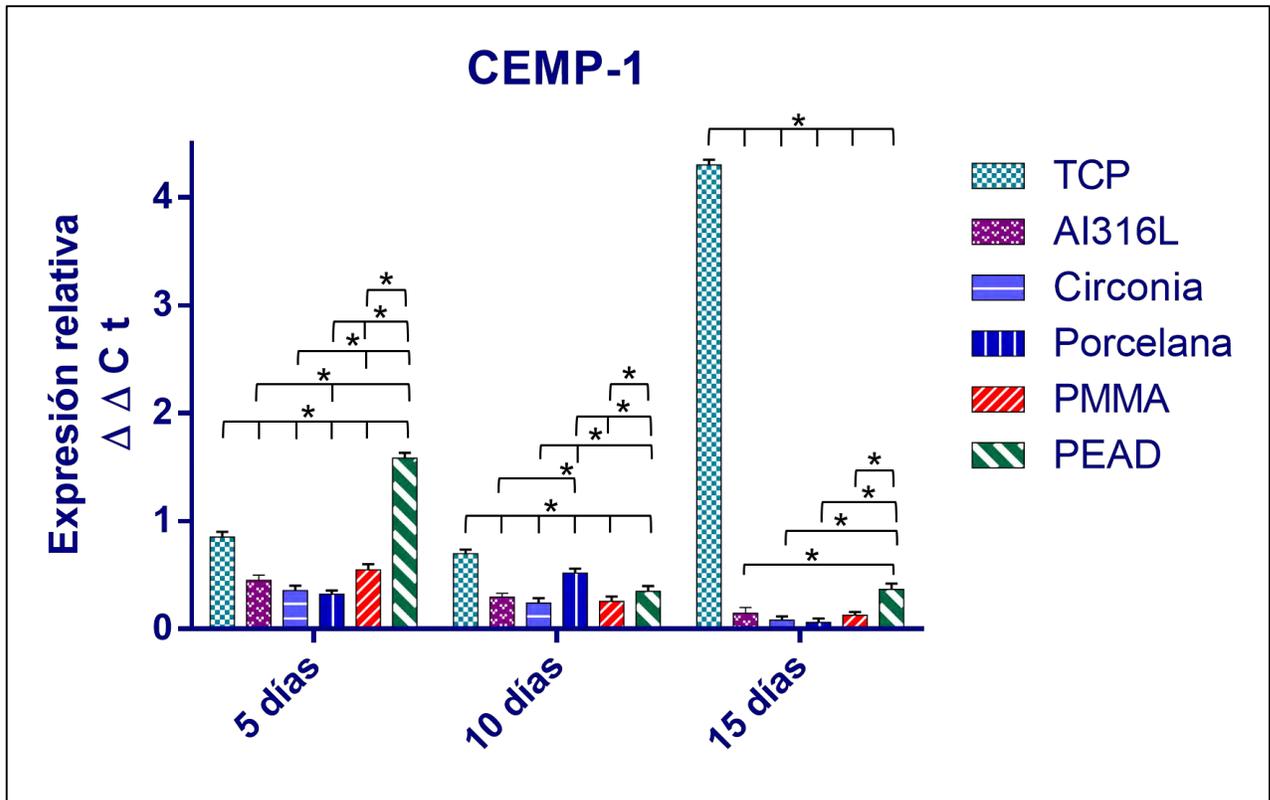


Figura 22. Expresión génica del marcador de cementoblastos CEMP1 después de 5, 10 y 15 días de cultivo con HPLC sin medio de inducción. Prueba de comparación múltiple de *Tukey* con diferencias estadísticamente significativas (*) $p \leq 0.05$ ($n = 3$). Fuente directa.

En la Figura 23, el factor de transcripción SOX9 se expresa a los 5, 10 y 15 días sobre TCP, y con respecto al Al316L y circonia solo se observa expresión a los 5 días, considerando que estos materiales promueven el fenotipo condrogénico.

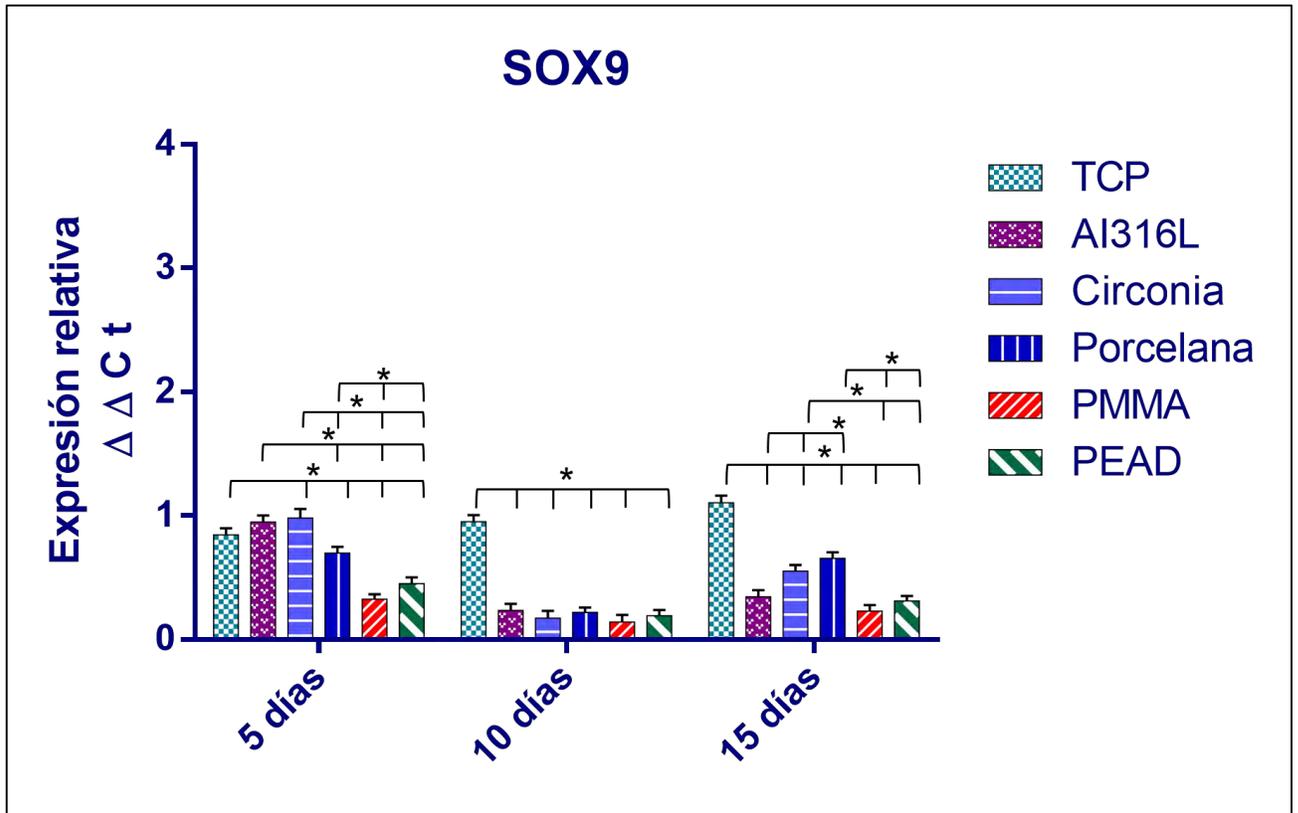


Figura 23. Expresión génica del marcador de condroblastos SOX9 después de 5, 10 y 15 días de cultivo con HPLC sin medio de inducción. Prueba de comparación múltiple de *Tukey* con diferencias estadísticamente significativas (*) $p \leq 0.05$ ($n = 3$). Fuente directa.

Se sabe que el aggrecan es un proteoglicano y que es un marcador de la diferenciación de los condrocitos en la que tuvo mayor expresión sobre la porcelana a los 5 días seguido de la circonia. Sin embargo, el TCP tuvo una mayor expresión a los 10 días como se observa en la Figura 24.

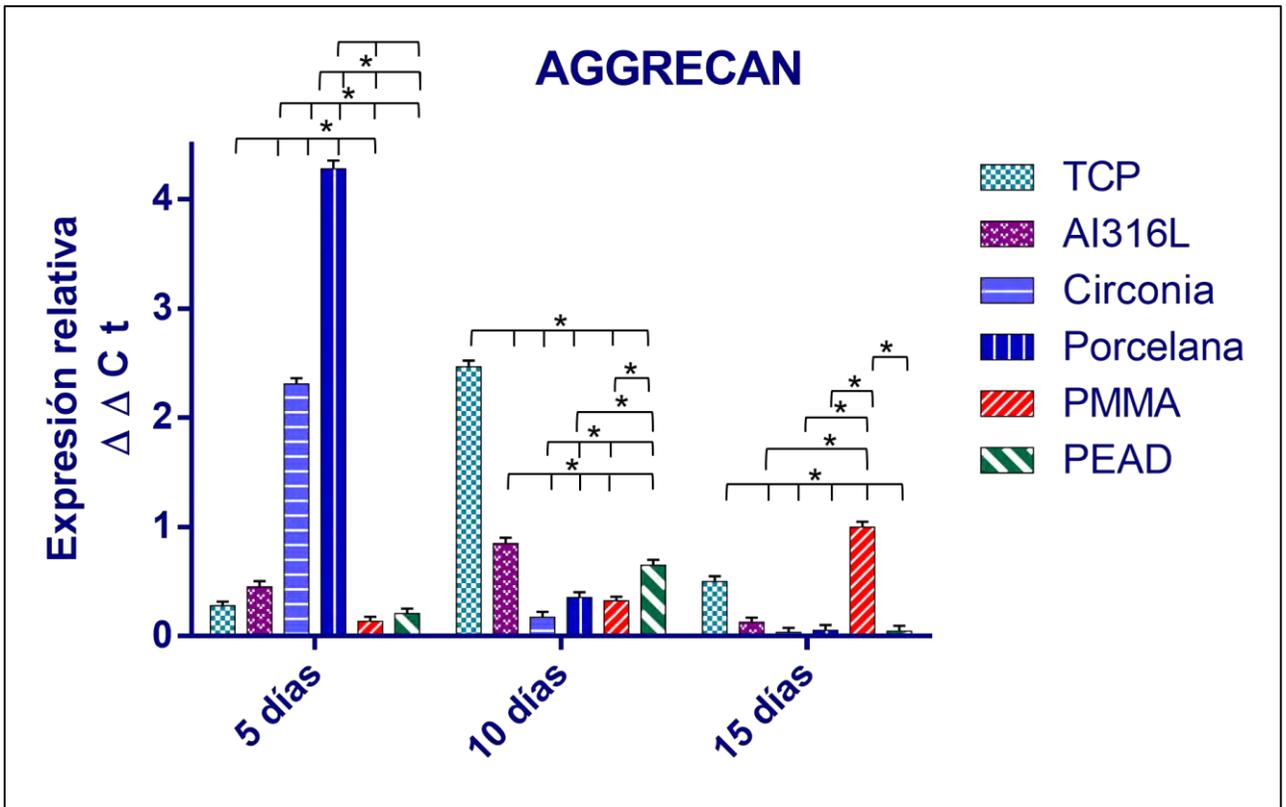


Figura 24. Expresión génica del marcador de condroblastos Aggrecan después de 5, 10 y 15 días de cultivo con HPLC sin medio de inducción. Prueba de comparación múltiple de *Tukey* con diferencias significativas (*) $p \leq 0.05$ ($n = 3$). Fuente directa.

Se observa la expresión de colágena tipo II en la Figura 25 que es igual que el agregan, un marcador de la diferenciación de los condrocitos en PMMA seguido de PEAD y porcelana al día 5, a los 15 días se observa una expresión en TCP, AI316L, porcelana, PMMA y PEAD.

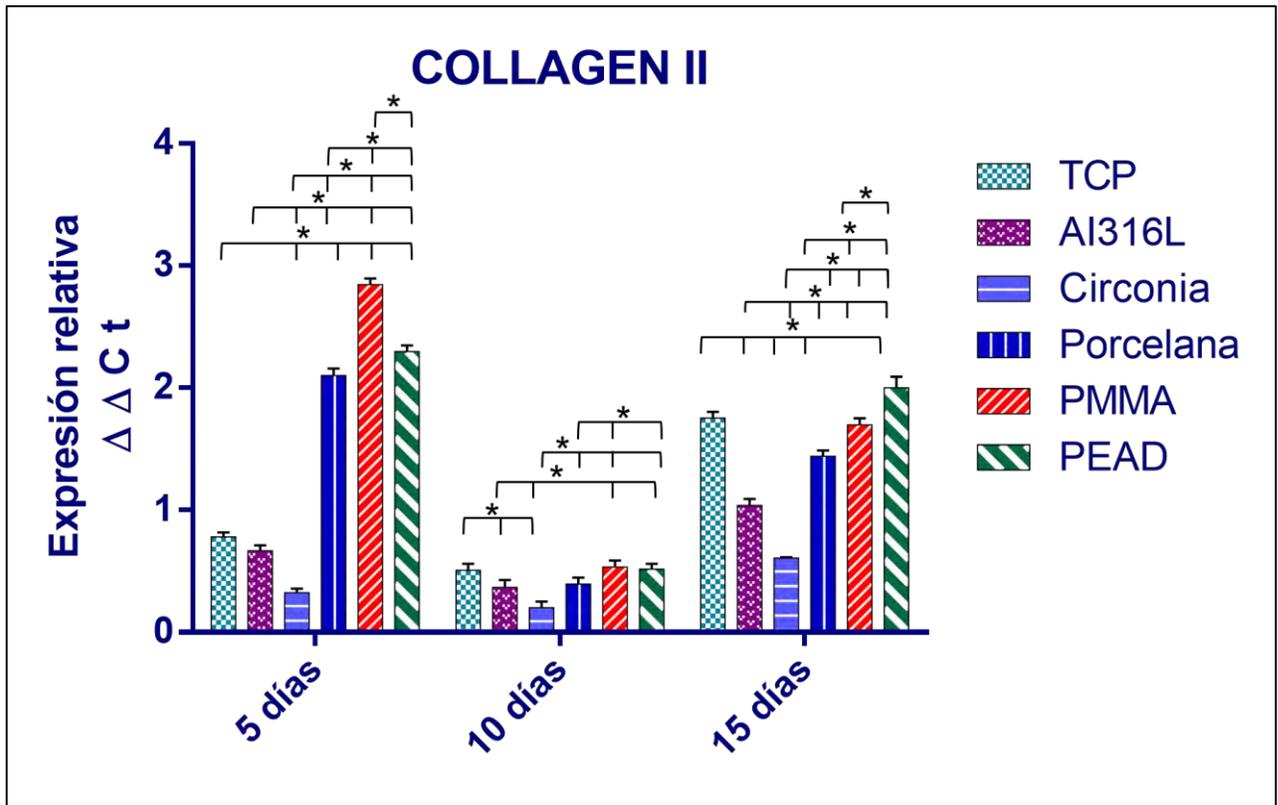


Figura 25. Expresión génica del marcador de condroblastos Col tipo II después de 5, 10 y 15 días de cultivo con HPLC sin medio de inducción. Prueba de comparación múltiple de *Tukey* entre superficies con diferencias significativas (*) $p \leq 0.05$ ($n = 3$). Fuente directa.

Se observa la expresión de colágena tipo X en la Figura 26 que es cuando ya están los primeros condrocitos hipertróficos y se expresaron sobre TCP, circonia y porcelana a los 10 días y a los 14 días solo en TCP.

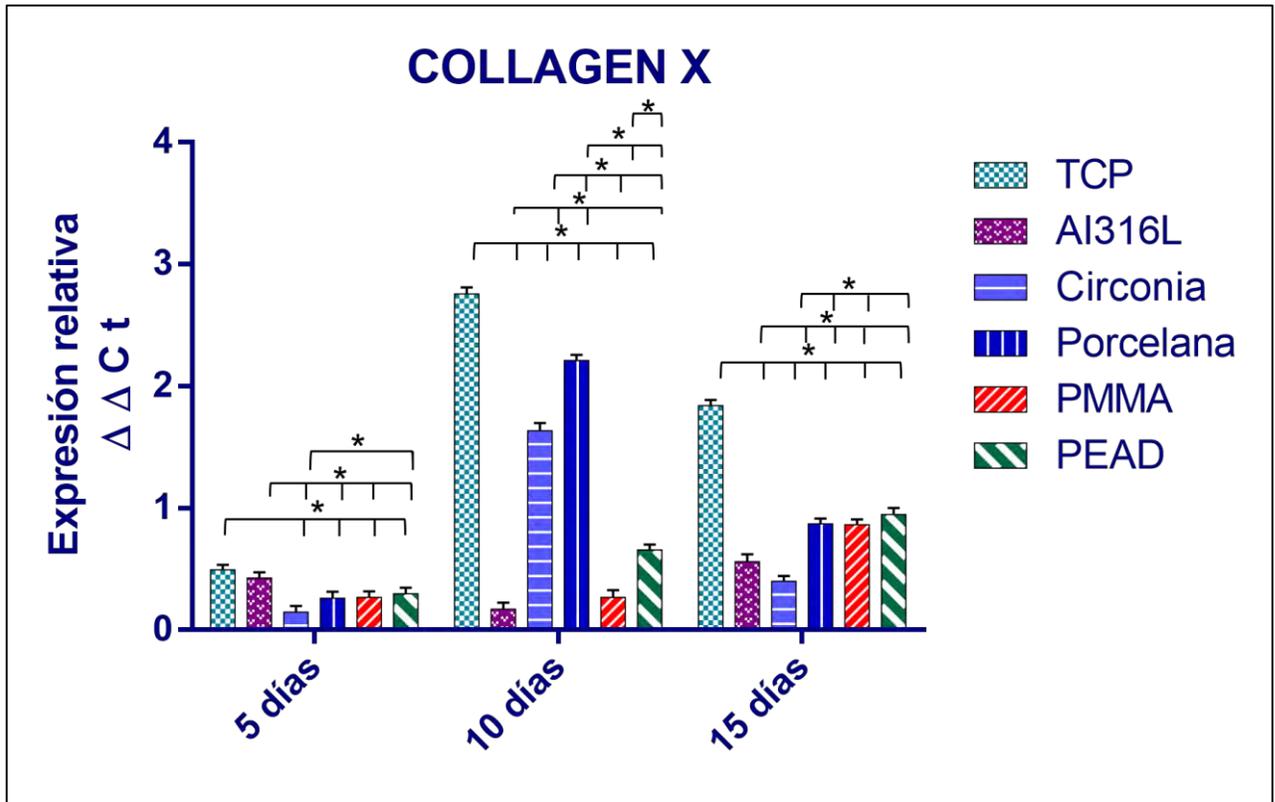


Figura 26. Expresión génica del marcador de condroblastos Col tipo X después de 5, 10 y 15 días de cultivo con HPLC sin medio de inducción. Prueba de comparación múltiple de *Tukey* entre superficies con diferencias significativas (*) $p \leq 0.05$ ($n = 3$). Fuente directa.

La expresión de colágena tipo XI se observa en la Figura 27 se expresa en el TCP siempre, sin embargo no es significativa sobre los diferentes materiales a los diferentes días de cultivo celular.

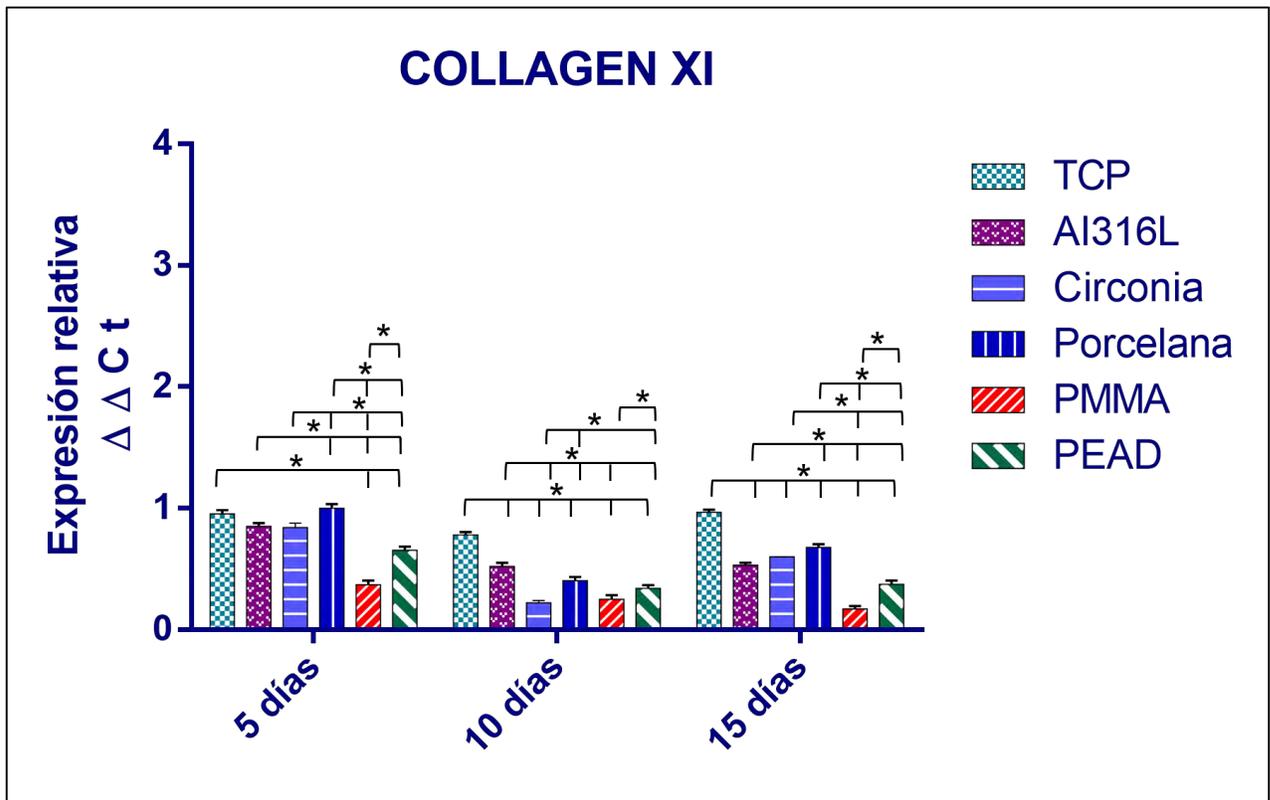


Figura 27. Expresión génica del marcador de condroblastos COL tipo X después de 5, 10 y 15 días de cultivo con HPLC sin medio de inducción. Prueba de comparación múltiple de *Tukey* con diferencias significativas (*) $p \leq 0.05$ ($n = 3$). Fuente directa.

Con respecto a la expresión de marcadores de la adipogénesis, en la Figura 28 se observa la expresión del factor de transcripción PPAR γ que fue significativa sobre el TCP a los 5, 10 y 15 días, de la misma manera que en el AI316L a los 5 días y el PEAD a los 10 días cuando se compara con las demás superficies.

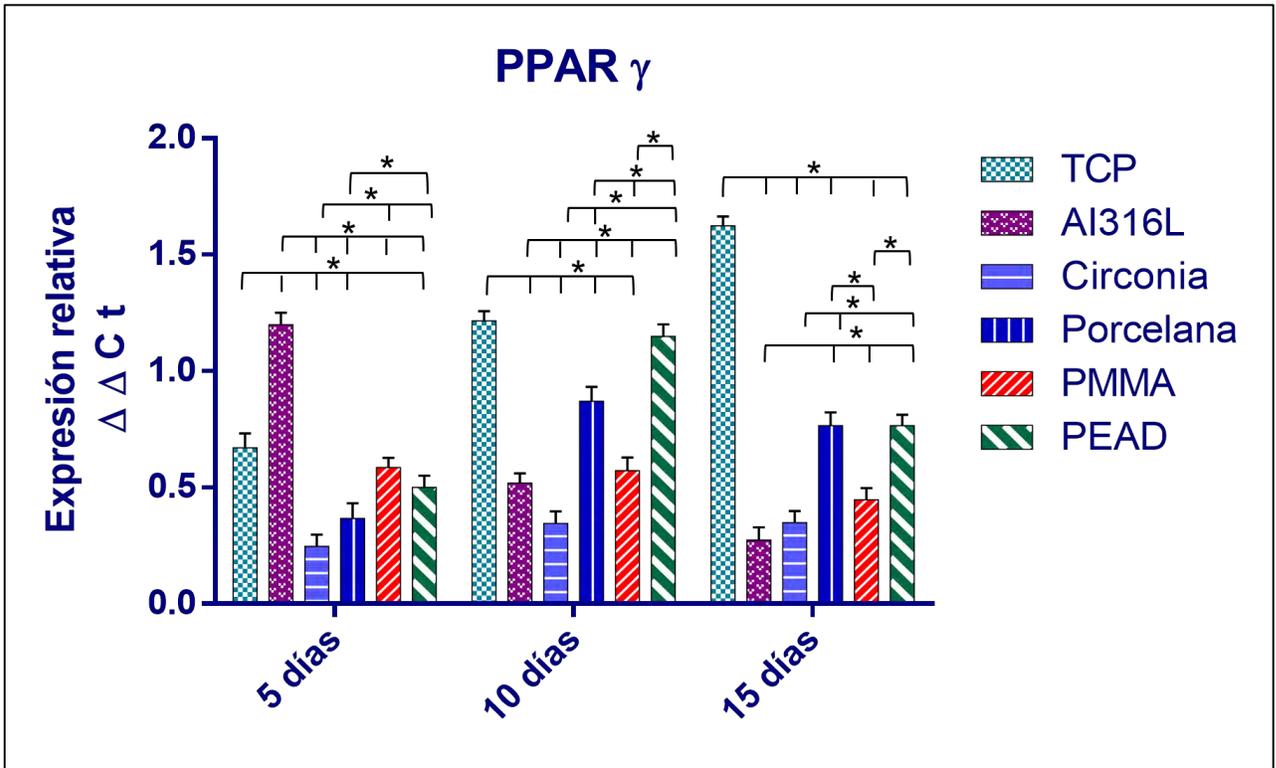


Figura 28. Expresión génica del marcador de adipogénesis PPAR γ después de 5, 10 y 15 días de cultivo con HPLC sin medio de inducción. Prueba de comparación múltiple de *Tukey* con diferencias significativas (*) $p \leq 0.05$ ($n = 3$). Fuente directa.

La lipoproteína lipasa es un marcador temprano del proceso de diferenciación adipogénica. En la Figura 29 se observa la no expresión de este marcador sobre los diferentes materiales.

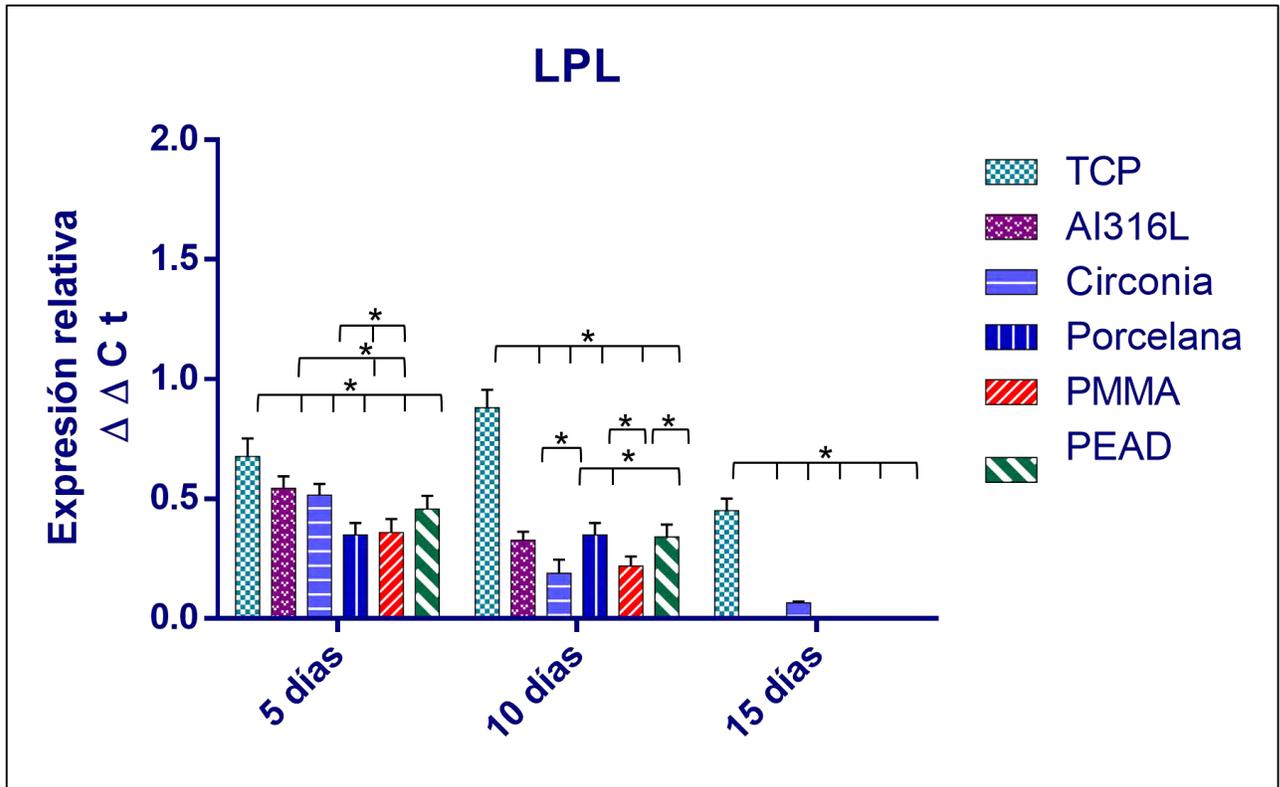


Figura 29. Expresión génica del marcador adipogénico LPL después de 5, 10 y 15 días de cultivo con HPLC sin medio de inducción. Prueba de comparación múltiple de Tukey con diferencias significativas (*) $p \leq 0.05$ ($n = 3$). Fuente directa.

En los resultados de RT-qPCR, se observó que en los marcadores óseos, es decir, en BSP hubo una gran expresión del TCP en a los 10 y 15 días; y en PMMA a los 10 días; en la ALP hubo una expresión ascendente en el TCP y en la OCN por ser nucleador de la hidroxiapatita se expresó a los 5 días en todas las superficies, por lo tanto, con estos resultados se propone realizar un ensayo de biom mineralización, para determinar el patrón de la formación mineral entre los diferentes tipos de materiales con medio de inducción específico únicamente para osteoblastos.

5.3 BIOMINERALIZACIÓN.

El proceso inicial de la mineralización biológica de los tejidos duros derivados del mesodermo, tales como el hueso, la dentina, el cemento radicular, el cartílago calcificado o bien el cartílago hipertrófico. Este proceso es conocido por su papel inductor de nuevo mineral. Inicia con la formación de vesículas en la matriz. Este término se utiliza debido a que son pequeños cuerpo esféricos (20 – 200 nm) observados en la matriz pre-mineralizada antes de la subsecuente mineralización de la matriz. El proceso de biom mineralización ocurre en los diversos sistemas biológicos, en donde la formación y organización está altamente regulada. En los vertebrados, los cristales de hidroxiapatita constituyen la fase mineral, la cual se deposita en la matriz orgánica (118). Para que ocurra la nucleación de los cristales de hidroxiapatita es necesario que haya una fuente de iones de calcio y fosfatos, y la participación de una o varias biomoléculas (99, 119, 120).

La biom mineralización es un proceso regulado por interacciones de minerales y moléculas orgánicas extracelulares. Es decir, donde se efectúa una estrecha relación entre las proteínas colágenas y las proteínas no colágenas. El paso inicial es la formación de los cristales de hidroxiapatita dentro de las vesículas de la matriz extracelular. En la fase orgánica de la mineralización es predominante la presencia de fibras de colágena, ya que actúan como andamio para la interacción con proteínas, las cuales, preferentemente, nuclean a los minerales y controlan su crecimiento (119). Por medio de tinción con alizarina roja después de 7 días en cultivo celular se determinó que existe la presencia de manera cualitativa de mineralización de las células del ligamento periodontal humano sobre las diferentes superficies, indicando que sólo en la superficie de Al316L, seguida de circonia y PMMA existe la formación de nódulos de calcio como se observa en la Figura 30. En todos los materiales se colocó medio mineralizante y estos resultados concuerdan con los de la técnica de RT-qPCR, es decir, con el comportamiento sobre los diferentes materiales utilizando los marcadores de BSP y ALP. En el caso del PEAD absorbió el colorante, toda su estructura se tiñó de color rojo y no se observaron como tal nódulos de mineralización.

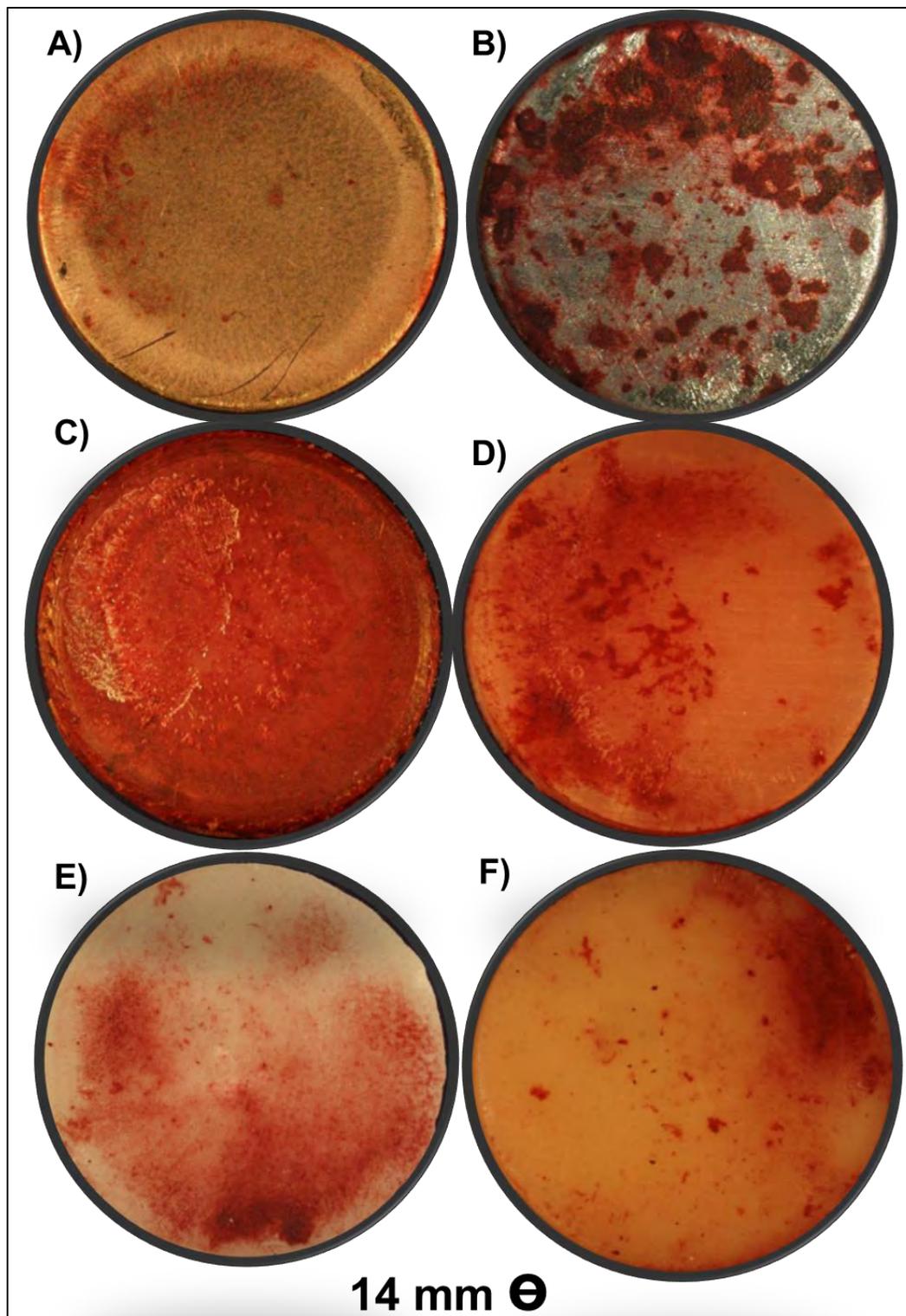


Figura 30. Ensayo de mineralización realizado con alizarina roja al 2% en cultivos de HPLC con medio mineralizante después de 7 días de cultivo sobre los diferentes materiales A) TCP, B) Al316l, C) PEAD, D) PMMA, E) Circonia F) Porcelana. Fuente directa.

Se realizó un acercamiento en las superficies después de 7 días visto con microscopio estereoscópico Olympus donde en la Figura 31 se observan los nódulos de mineralización en sobre todos los materiales.

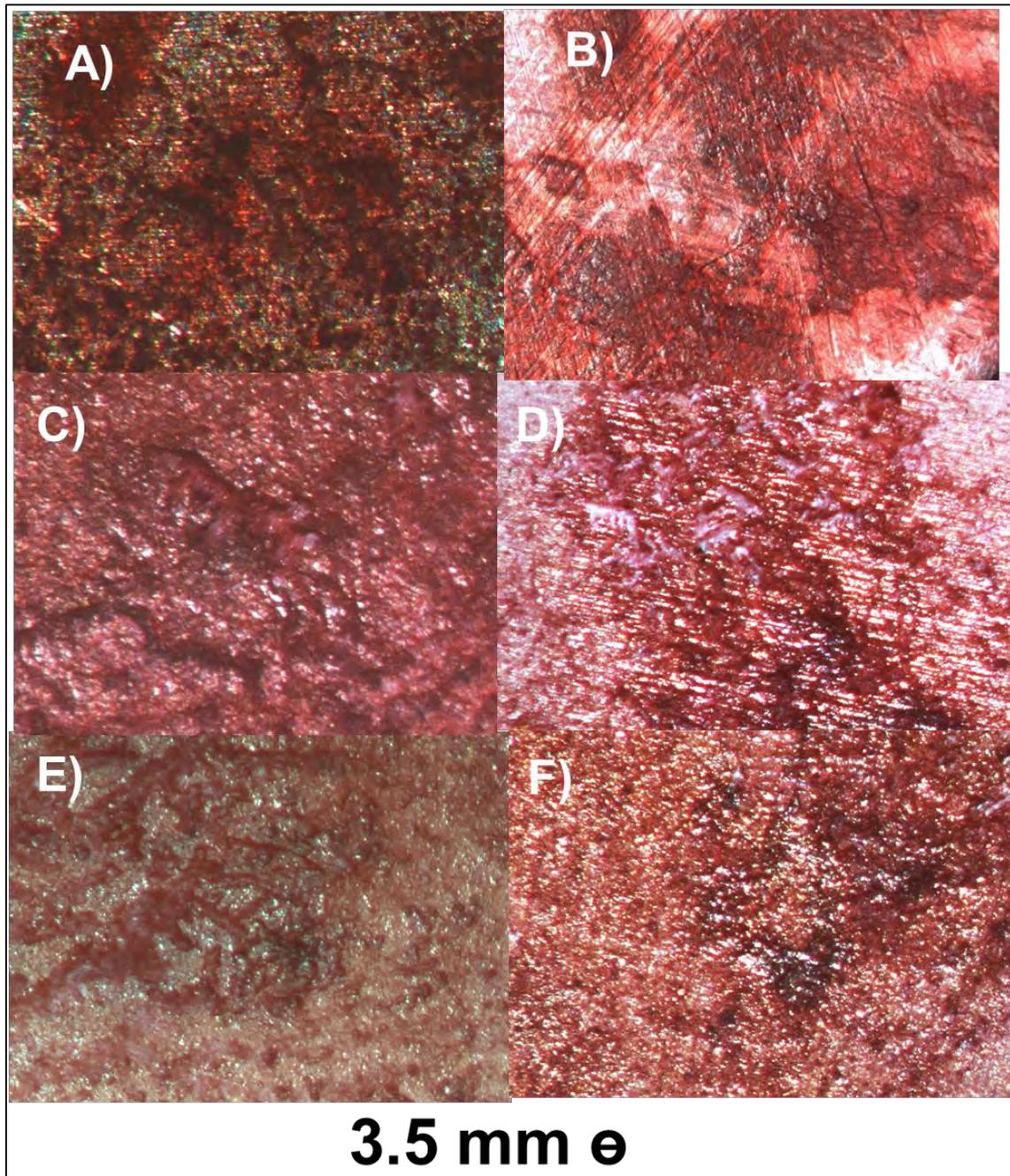


Figura 31. Ensayo de mineralización con alizarina roja al 2%, después de 7 días de cultivo sobre los diferentes materiales A) TCP, B) Al316l, C) PEAD, D) PMMA, E) Circonia F) Porcelana. Fuente directa.

Se realizó otro ensayo de biom mineralización después de 14 días de haber estado en cultivo celular y con cambio de medio mineralizante cada tercer día. De manera cualitativa existe la presencia la mineralización de las células del ligamento periodontal humano con alizarina roja al 2%. Esto indica que en la superficie de TCP, circonia y PMMA existe la formación de nódulos de calcio, como se observa en la Figura 32. Estos resultados confirman que el TCP, la circonia y el PMMA son potencializadores de la diferenciación hacia fenotipo osteoblástico, ya que en todas las superficies hubo las mismas condiciones biológicas y esto coincide con los resultados que se obtuvieron con la técnica de RT-qPCR de las superficies de los materiales TCP, PMMA con BSP a 10 y 15 días; el TCP con la OCN a los 15 días y también el TCP y la circonia con la ALP a 5, 10 y 15 días.

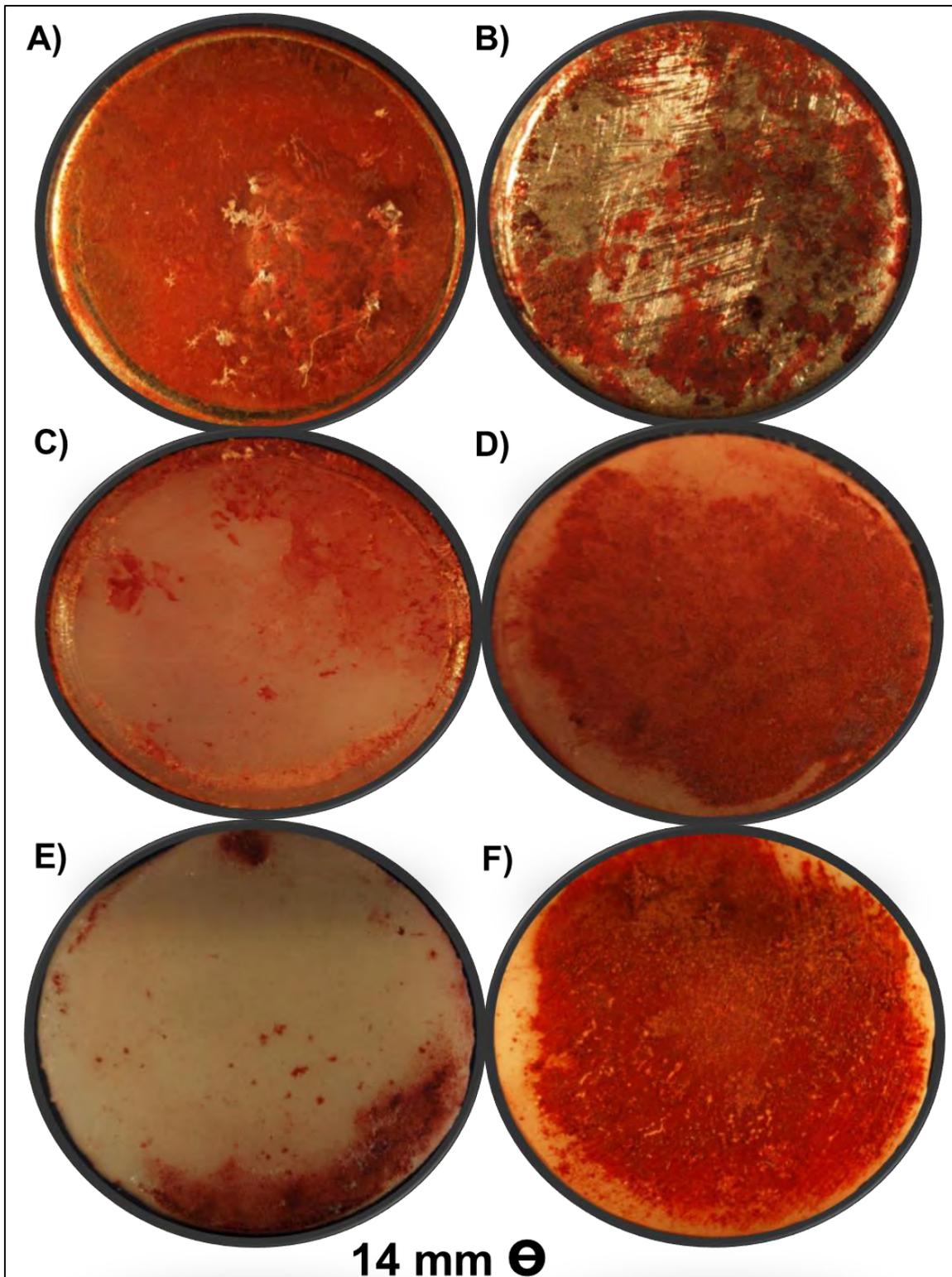


Figura 32. Ensayo de mineralización realizado con alizarina roja al 2% en cultivos de HPLC con medio mineralizante después de 14 días de cultivo celular sobre las superficies A) TCP, B) Al316l, C) PEAD, D) PMMA, E) Circonia F) Porcelana. Fuente directa.

Se observa un acercamiento de las superficies en la Figura 33 después de 14 días, donde se observa a detalle los nódulos de calcio sobre las diferentes superficies.

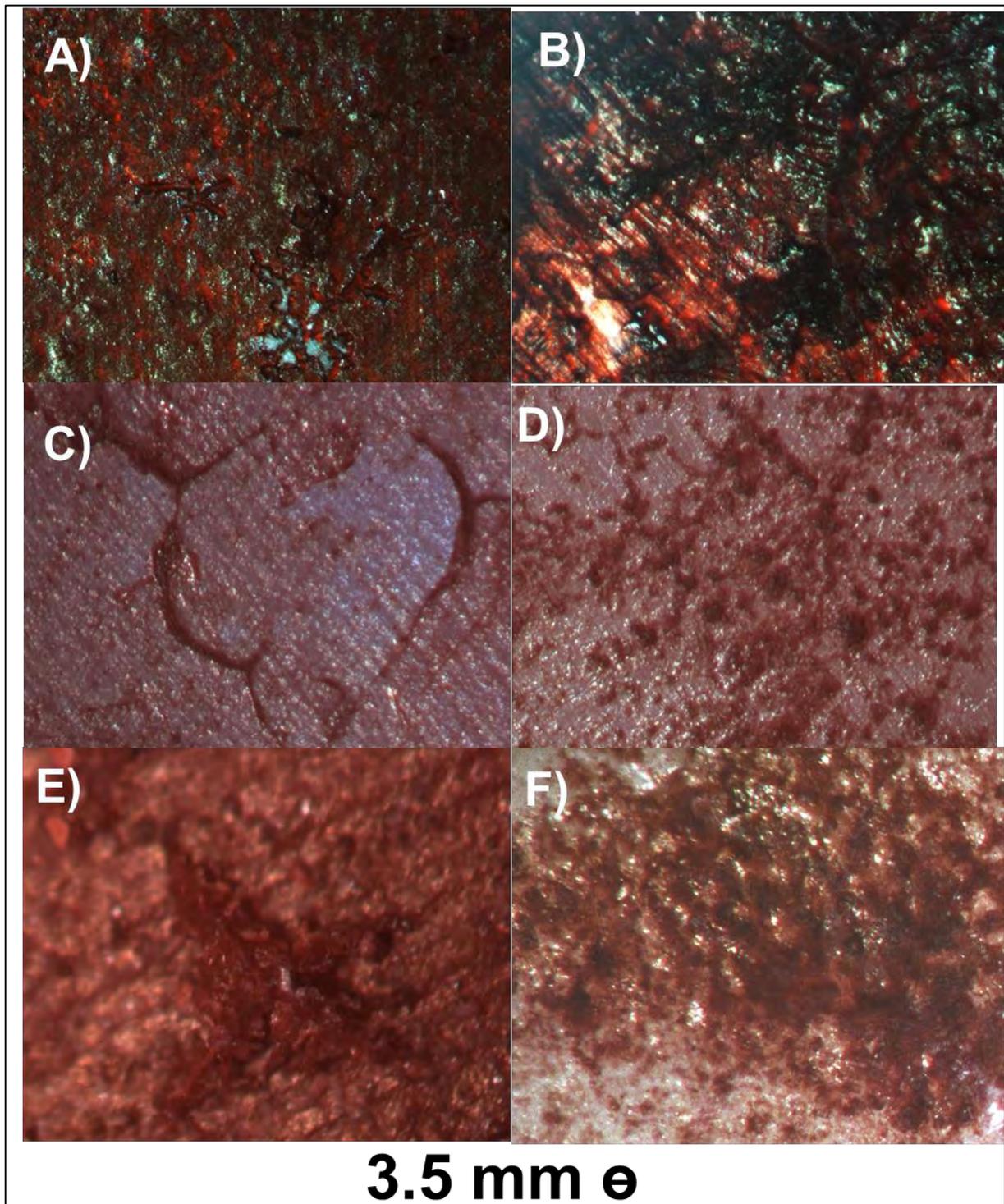


Figura 33. Ensayo de mineralización con alizarina roja al 2%, después de 14 días de cultivo celular con medio mineralizante. A) TCP, B) Al316l, C) PEAD, D) PMMA, E) Circonia F) Porcelana Fuente directa.

En la prueba de mineralización también se observó por microscopía electrónica de barrido (Figura 34) el EDS puntual para determinar de manera semicuantitativa la relación calcio/fósforo, después de 14 días de haberse sembrado 5,000 células por pozo con medio mineralizante como se muestra en el Cuadro 3.

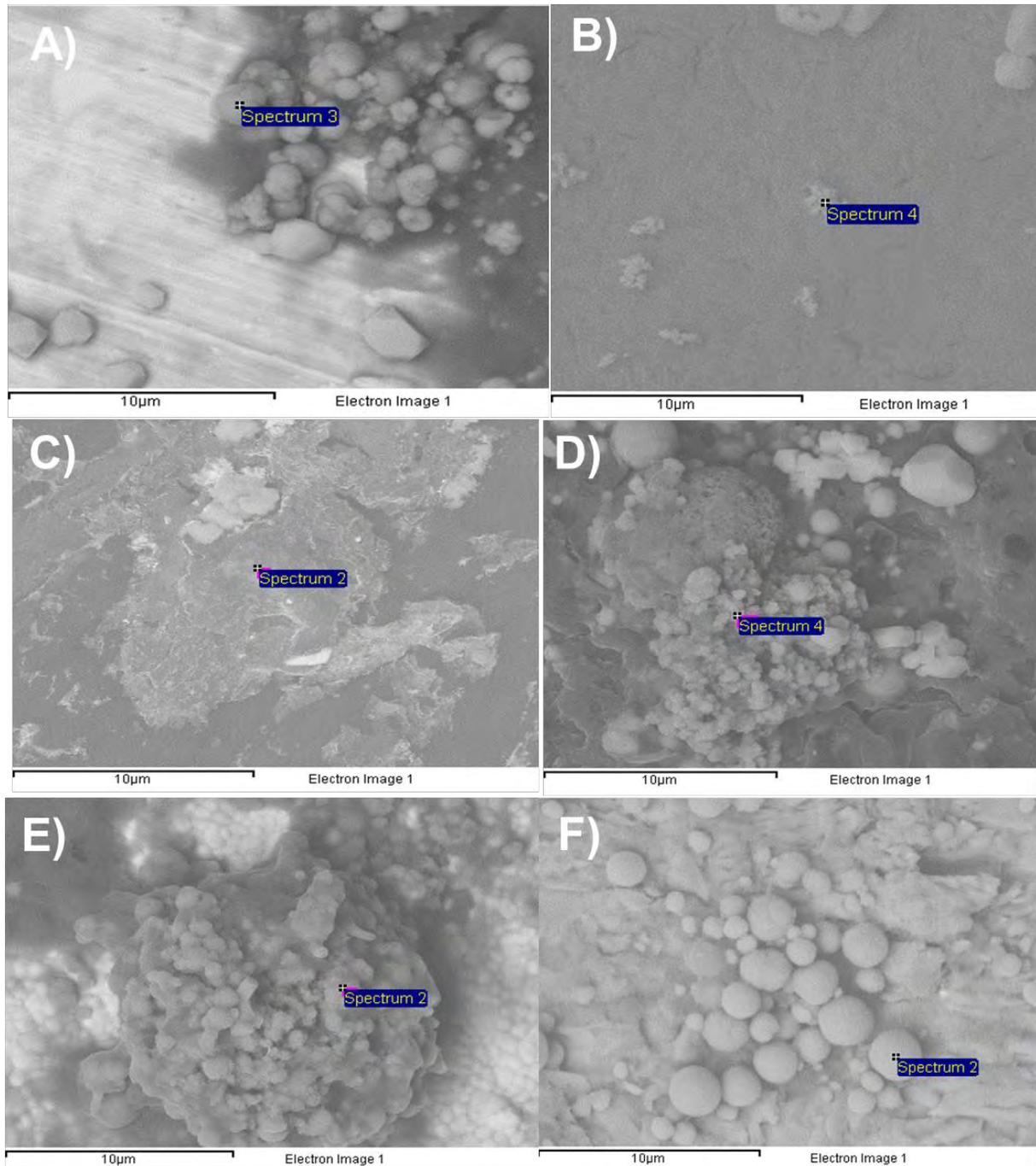


Figura 34. Microfotografías por microscopía electrónica de barrido con cultivo celular, después de 14 días con medio mineralizante sobre las superficies de los materiales A) TCP, B) Al316l, C) PEAD, D) PMMA, E) Circonia F) Porcelana. Fuente directa

Cuadro 3. Relaciones de Ca/P y fase cristalina de los materiales obtenidos después de 14 días en cultivo celular con medio mineralizante obtenida por EDS.

BIOMATERIAL	Ca % ATÓMICO	P % ATÓMICO	RELACIÓN Ca/P	FASE CRISTALINA *
Al316L	8.81	16.27	0.54	Fosfato monocálcico*
TCP	96.73	68.16	1.42	Fosfato tricálcico*
PMMA	187.42	121.47	1.54	Hidroxiapatita deficiente de Ca*
PEAD	99.92	76.80	1.30	Fosfato octacálcico*
Circonia	213.20	133.98	1.59	Hidroxiapatita deficiente de Ca*
Porcelana	107.98	81.94	1.32	Fosfato octacálcico*

Fuente directa.

*Lin, Kaili (121) .

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo es evaluar las posibles correlaciones entre propiedades físicas y químicas, incluyendo la composición, de diferentes biomateriales de uso común en odontología sobre la proliferación y el potencial de diferenciación de células del ligamento periodontal humanas. Se seleccionaron seis materiales diferentes: dos metales, dos cerámicos y dos polímeros con un acabado superficial y dado que hay muy poca información sobre la correlación entre topografía y comportamiento celular para polímeros y cerámicos, se utilizaron los extensos datos relativos a la diferenciación osteoblástica sobre superficies metálicas, los cuales definen la rugosidad ideal entre 2-3 μm . Los valores de rugosidad se seleccionaron según información sobre el efecto de la topografía para mejorar la osteointegración (122, 123), debido a que es el fenómeno del cual existe mayor información sobre el efecto del terminado superficial en la respuesta. Las diferencias en los patrones de diferenciación podrían verse afectadas también por la diversa morfología de las muestras, que fueron observadas cualitativamente por las imágenes del SEM.

Como se ha discutido en la mayoría de los artículos relacionados con biomateriales y diferenciación celular casi siempre utilizan materiales de la misma naturaleza y los comparan entre sí con ciertas modificaciones en su superficie (11, 26, 32, 94, 124). En el presente trabajo de tesis se evaluaron 3 diferentes tipos de materiales: 2 metales, 2 polímeros y 2 cerámicos con rugosidades promedio similares para determinar, con células del ligamento periodontal, el potencial de diferenciación celular sin medio de inducción y con base a los resultados, se decidió realizar un ensayo de biomineralización con medio de inducción osteogénica únicamente para comparar éste resultado con el del comportamiento de las superficies con medio mineralizante. Se comparó con ambas pruebas que aún en materiales de la misma naturaleza, la diferenciación celular es diferente.

En esta investigación se utilizaron células del ligamento periodontal ya que ha sido demostrado por diferentes autores (46, 48, 94, 125, 126) su potencial para diferenciarse en una amplia gama de linajes. Además, las HPLC son una fuente

potencial para la regeneración periodontal, tema de interés para aplicaciones dentales. Sin embargo, poco se conoce sobre la interacción entre estas células y los biomateriales (94, 108). En particular no se sabe si el linaje de las células de cultivo puede ser preservado y/o si las superficies inducen la diferenciación en algún fenotipo específico. En este estudio, se cultivaron HPLCs en seis diferentes superficies por períodos de hasta 15 días, para evaluar el perfil de expresión de marcadores osteoblastos, adipocitos, condroblastos y genes relacionados con cemento. Se evaluaron los genes específicos del linaje después de cultivar las células (5, 10 y 15 días) sin añadir ningún medio de diferenciación mediante la técnica RT-qPCR. Las características de superficie de los seis materiales se caracterizaron con el objetivo de identificar posibles correlaciones entre el perfil de expresión génica de las células de HPLC y las propiedades del material, tales como composición superficial, mojabilidad y carga superficial.

Los resultados de proliferación indicaron que las células del ligamento periodontal humano eran capaces de unirse y crecer en todas las superficies a una velocidad ligeramente menor que en el plato de cultivo. También se ha observado una proliferación menor o similar en muestras rugosas para superficies de titanio. Desde 2002, Boyan (127) y cols. demostraron que el número de células (osteoblastos, en calvaria de rata fetal) disminuyó a medida que la rugosidad de la superficie aumentó de 0,6 a 3,97 y 5,21 μm en comparación con el plato de cultivo (grupo control). Este comportamiento también se ha confirmado cuando se utilizan osteoblastos humanos o células troncales mesenquimales humanas sobre aleaciones de Ti con una rugosidad de similar escala (128). Boyan sólo investigó la diferenciación sobre el linaje de osteoblastos y la reducción del número de células se asoció con la maduración de los osteoblastos que dejan de dividirse produciendo las proteínas asociadas al crecimiento óseo (128). Esta producción se ve reforzada por la rugosidad. Se observó una reducción similar en la tasa de proliferación en comparación con el control de todas las superficies, que en realidad tienen valores de rugosidad similares, lo que sugiere que la reducción inducida por la rugosidad en el número de células no es única para las superficies con base en Ti, aunque nada

se puede decir sobre el efecto de las características topográficas específicas (picos, valles, distorsión, etc.).

El comportamiento de las células depende de las interacciones con el medio ambiente. En consecuencia, el contacto entre las células y los materiales implantables determinará el éxito o el fracaso de un material implantable o un dispositivo médico. Es bien sabido que la respuesta celular está afectada por los parámetros físicos y químicos de la superficie del biomaterial, tales como la energía superficial, las cargas superficiales o la composición química. Engel (12) menciona que la topografía es una de las señales físicas más importantes para las células, que la microtopografía influye en la adhesión, proliferación y diferenciación celular. En su investigación utilizó PMMA con diferentes rugosidades y confirmó la relevancia de la topografía de superficie y concluyó que ésta es uno de los principales parámetros utilizados para controlar el diseño de dispositivos médicos e implantes. Por esta razón se hace énfasis en que la rugosidad de alrededor de 2 a 3 micras mejora la diferenciación en el hueso. Además, comenta también que la microtextura es importante en el diseño de matrices de ingeniería tisular para tejidos específicos y puede usarse para facilitar experimentos con células cultivadas *in vitro*.

La hipótesis propuesta para esta investigación fue que las propiedades físicas y químicas de los materiales serían capaces de inducir diferentes microambientes que a su vez regulan la señalización celular y la expresión de diferentes genes o proteínas relacionadas con diferentes linajes celulares. De acuerdo con esto, esperábamos que el producto químico composición y propiedades intrínsecas de la familia de materiales (metales, cerámicas o polímeros) presentaran patrones que pudiesen estar asociados a cada familia. Sin embargo, después de analizar los resultados del RT-qPCR llegamos a la conclusión de que la expresión y/o la regulación positiva de ciertos marcadores no están asociada a ningún tipo de material, pero tal como se discute a continuación puede estar asociado a propiedades superficiales específicas. Un resultado general fue que observamos marcadores de los cuatro linajes (osteogénico, condrogénico, adipogénico y cementogénico) expresados en todas las superficies. Una posible explicación

podría estar relacionada con la heterogeneidad de las HPLC, que contienen células troncales mesenquimales con el potencial de diferenciarse a linajes celulares osteogénicos, adipogénicos, cementogénicos y condrogénicos (43, 44). De manera paralela puede considerarse que los diferentes linajes celulares fueron capaces de adherirse y proliferar en las superficies preservando sus linajes, lo cual es de hecho, un buen resultado para el tratamiento de la enfermedad periodontal usando terapias celulares. Alternativamente, el resultado también podría indicar que la metodología propuesta, en la que usaron células heterogéneas, y no medios de inducción no es suficientemente sensible para evaluar el efecto de las propiedades superficiales sobre el potencial de diferenciación.

Si nos concentramos en los marcadores que fueron regulados por encima de las otras superficies y durante más de un período de evaluación, se pueden observar algunas relaciones interesantes. Los marcadores de osteoblastos se expresaron en mayor medida en la superficie de TCP; la expresión de BSP fue mayor que en todas las otras superficies a los 10 y 15 días, mientras que en la OCN a los 15 días y el ALP fue mayor para los tres períodos de evaluación y, en realidad, aumentó con el tiempo de incubación. Tales resultados están claramente de acuerdo con el conocimiento actual sobre las extraordinarias propiedades del titanio para inducir la diferenciación de los osteoblastos *in vitro*. A su vez, el TCP también mostró la regulación de los marcadores SOX-9, Col X, Aggrecan, PPAR γ y LPL; estos asociados a la condrogénesis y adipogénesis (51, 52) Curiosamente, el marcador de cemento (HACD1 / CAP) es regulado en las etapas iniciales de mineralización (5 días), y la proteína del cemento 1 (CEMP1) en las últimas etapas de la mineralización (15 días), lo que indica que la superficie de TCP sí promueve la diferenciación de HPLC hacia un fenotipo cementoblástico. Por lo tanto, podríamos decir que TCP tiene mayor capacidad de preservar los linajes celulares en comparación con las otras superficies. El siguiente material que presenta una regulación positiva de más de un marcador de osteoblastos fue el PMMA: BSP (10 días) y OCN (5 días). El PMMA también mostró una regulación positiva de Col II y Aggrecan (15 días). Estas dos superficies; TCP y PMMA tienen en común un menor valor de PCC (4.6 y 4.8, respectivamente) en comparación con las otras 4

superficies que mostraron valores de PCC cercanos al pH neutro. Los valores de PCC inferiores a 7 indican que, bajo las condiciones de cultivo, estas superficies se cargarán negativamente mientras que las restantes permanecerán neutras. Por otra parte, el TCP mostró un comportamiento hidrofóbico mientras PMMA fue más hidrofílico. La combinación de hidrofobicidad y bajos valores de PCC hace que el TCP sea completamente diferente a las otras superficies. Las interacciones hidrofóbicas entre las superficies y las biomoléculas en los medios, incluidas las células, son atractivas y de mayor alcance que en las superficies hidrofílicas (129). Y, además, la presencia de una carga electrostática puede aumentar significativamente la configuración de las proteínas adheridas a la superficie y al tipo de interacciones.

Las otras dos superficies que presentaban carácter hidrofóbico pero no valores bajos de PCC eran los cerámicos. Sin embargo, no había un patrón claro de expresión de los marcadores; sólo Aggrecan (5 días) y Col X (10 días) fueron reguladas en ambas superficies y Col I en la porcelana a los 5 y 15 días. Estos marcadores son todos asociados a los linajes condrogénicos, donde también TCP mostró-regulación. ¿Podría esto ser indicativo de que las superficies hidrofóbicas favorecen de alguna manera la diferenciación o preservación condrogénica? En este punto, no hay suficiente evidencia para apoyar esto como una conclusión, pero sin duda es una hipótesis interesante para explorar si se considera las dificultades actuales en el tratamiento de las enfermedades degenerativas del cartílago, incluida la osteoartritis [57].

En el ensayo de biomineralización se tuvo que realizar por los resultados obtenidos en la expresión de marcadores óseos, prueba realizada con RT-qPCR. En este ensayo de biomineralización se esperaba que por tener todos los materiales las mismas condiciones incluidas en medio mineralizante, es decir, después de 7 y 14 días con cultivo celular y, con el cambio del medio de cultivo cada tercer día el resultado esperado era que hubiera nódulos de calcio en todas las superficies. Sin embargo, no ocurrió así, lo que explica, que la carga superficial y la topografía sí influyeron sobre la superficie durante dichos ensayos.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

El objetivo del trabajo era evaluar el efecto de las propiedades físicas y químicas de diferentes materiales (metales, cerámicos y polímeros) en el potencial de diferenciación celular; en este sentido la conclusión general del trabajo es que sí se observaron diferencias importantes en dicho potencial de diferenciación entre los seis materiales evaluados. Sin embargo, no fue posible establecer correlaciones específicas entre el tipo de material (cerámico, polímero o metálico) y la diferenciación o entre el tipo de material y sus propiedades de superficie.

A continuación se describen las conclusiones específicas a cada uno de los objetivos propuestos, explicando su influencia en los resultados finales.

La rugosidad promedio (R_a) determinada a escala micro y nanométrica fue similar entre las superficies de los 6 materiales. Sin embargo, cada material presentó una topografía diferente en respuesta a su propia naturaleza y método de síntesis. Por lo tanto, es posible que el resultado de la diferenciación celular hubiese sido influenciado por las diferencias topográficas de las muestras, pero dado que el valor de R_a medido no representa a las diferentes topografías, no se logró explicar su efecto en la diferenciación celular. Una de las razones por las que consideramos que ocurrió esta falla en la determinación adecuada de la rugosidad, es debido a las limitantes en las técnicas utilizadas. Tanto el perfilómetro mecánico como el AFM en modo contacto, utilizan como sonda de análisis una punta con dimensiones finitas. En la Figura 35 puede observarse como las dimensiones de la punta limitan el valor en profundidad medido dependiendo de su tamaño relativo con respecto a las homogeneidades de las superficies. En el apéndice se presentan nuevas mediciones realizadas con una técnica óptica de nuevo desarrollo, en donde se puede ver que las rugosidades en efecto eran diferentes.

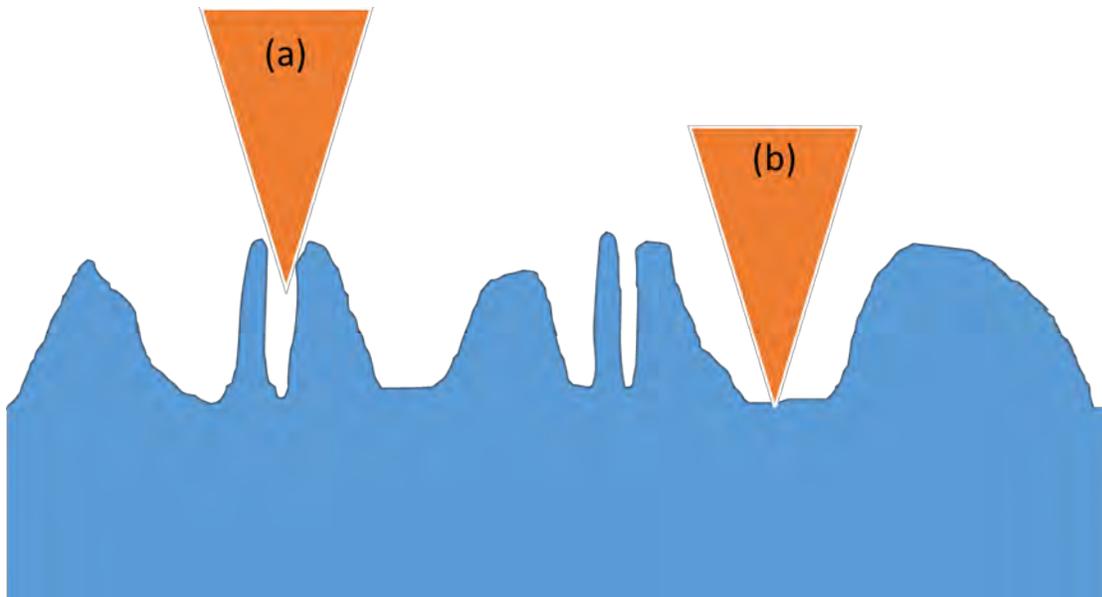


Figura 35. Esquema que explica las limitaciones de las técnicas utilizadas para determinar los parámetros que describan la topografía de las superficies

En la prueba de mojabilidad no se observó una correlación de acuerdo al tipo de materiales, es decir, metales, polímeros y cerámicos. El TCP (metal) y las cerámicas (circonia y porcelana) mostraron un comportamiento hidrofílico y el resto de los materiales (Al316L, PMMA, PEAD) fueron hidrofóbicos. De manera similar, considerando que la mojabilidad es resultado de la acción conjunta de la energía de superficie y de la rugosidad-topografía, es probable que este resultado fuese influenciado por las diferentes topografías.

De manera similar, no puede decirse que el punto de carga cero (pH) de los materiales dependa de su tipo específico. Observamos que un metal (TCP) y un polímero (PMMA) presentaron puntos de carga cero menores a 7; el pH al cual la carga neta es cero fue al pH 4.6 y 4.9, respectivamente. Mientras que los otros materiales en general presentaron un PCC cercano al pH neutro. En este sentido, no se tiene mucha información sobre el efecto de la rugosidad o topografía en las cargas acumuladas a nivel superficial, Sin embargo, si se conoce que dicha carga sería influenciada por especies químicas adsorbidas que podrían variar de material en material.

En la prueba de adhesión celular no hubo diferencias significativas sobre las 6 superficies, incluso comparadas con el control. Este resultado en conjunto con la proliferación celular, indican que ningún material es tóxico a nivel celular. Sin embargo, se observó que la proliferación fue ligeramente superior en el control que en las diferentes muestras, efecto que asociamos a la rugosidad superficial. Esta asociación está basada en los resultados de la literatura que demuestran que, en general, hay menor proliferación en las muestras con rugosidades moderadas (>1 micra) comparadas con muestras lisas.

Todos los materiales; metales, polímeros y cerámicos presentaron una expresión relativa con respecto al control (GADPH) positiva de todos los marcadores de hueso, cartílago, cemento radicular y marcadores adipogénicos. Aunque si había diferencias en la cantidad relativa de cada marcador expresado, pero no se observaron tendencias claras.

Respecto a las sobre-expresiones de algunos genes, se hace evidente que el TCP fue el que obtuvo mayor expresión en todos los marcadores génicos.

En el caso particular de marcadores hacia hueso, el TCP (10 y 15 días), el PMMA (5 y 10 días) y la circonia (5 días) fueron los que presentaron mayor sobre-expresión de BSP y OCN, resultado que concuerda con lo observado en el ensayo de biomineralización. Justamente, dicho ensayo demostró que el TCP (metal), el PMMA (polímero) y la circonia (cerámica) promueven la formación de nódulos de calcio después de 14 días en cultivo celular; es decir promueven la diferenciación hacia osteoblastos, mientras que en las otras superficies la formación de nódulos fue mínima o nula, a pesar de que para todas las muestras se utilizaron las mismas condiciones de inducción química de la mineralización.

CAPÍTULO 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anselme K, Ponche A, Bigerelle M. Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 2: biological aspects. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers Part H, Journal of engineering in medicine. 2010;224(12):1487-507.
2. Ponsonnet L, Reybier K, Jaffrezic N, Comte V, Lagneau C, Lissac M, et al. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. Mat Sci Eng C-Bio S. 2003;23(4):551-60.
3. Olivares-Navarrete R, Hyzy SL, Boyan BD, Schwartz Z. Regulation of Osteoblast Differentiation by Acid-Etched and/or Grit-Blasted Titanium Substrate Topography Is Enhanced by 1,25(OH)(2)D(3) in a Sex-Dependent Manner. BioMed Research International. 2015;2015:365014.
4. Olivares-Navarrete R, Rodil SE, Hyzy SL, Dunn GR, Almaguer-Flores A, Schwartz Z, et al. Role of Integrin Subunits in Mesenchymal Stem Cell Differentiation and Osteoblast Maturation on Graphitic Carbon-coated Microstructured Surfaces. Biomaterials. 2015;51:69-79.
5. Olivares-Navarrete R, Hyzy SL, Haithcock DA, Cundiff CA, Schwartz Z, Boyan BD. Coordinated Regulation of Mesenchymal Stem Cell Differentiation on Microstructured Titanium Surfaces by Endogenous Bone Morphogenetic Proteins. Bone. 2015;0:208-16.
6. Ahmed M. Ballo OO, Wei Xia and Anders Palmquist. Dental Implant Surfaces - Physicochemical Properties, Biological Performance, and Trends. Implant Dentistry - A Rapidly Evolving Practice. 2011:19-56.
7. Almaguer-Flores A, Silva-Bermudez P, Galicia R, Rodil SE. Bacterial adhesion on amorphous and crystalline metal oxide coatings. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2015;57:88-99.
8. Karim Bordji, Jean-Yves Jouzeau, Didier Mainard, Elisabeth Payan, and J-PD, Netter P. Evaluation of the effect of three surface treatments on the biocompatibility of 316L stainless steel using human differentiated cells Biomaterials. 1996;17:491-500.
9. Niinomi M. Mechanical properties of biomedical titanium alloys. Materials Science and Engineering A243. 1998:231 – 6.
10. David M. Dohan Ehrenfest PGC, Byung-Soo Kang, Young-Taeg Sul, Tomas Albrektsson, 1. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography Trends in Biotechnology 2009;28(4):198-206.
11. M. JAGER TF, H.DENCK, R. KRAUSPE. Proliferation and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Cultured onto Three Different Polymers In Vitro 2005;33(10):1319-32.
12. Elisabeth Engel EM, Chris A. Mills, Miriam Funes, Josep A. Planell, Josep Samitier. Mesenchymal stem cell differentiation on microstructured poly (methyl methacrylate) substrates Annals of Anatomy. 2009;191:136-44.
13. Paolo Francesco Manicone PRI, Luca Raffaelli. An overview of zirconia ceramics: Basic properties and clinical applications. Journal of Dentistry. 2007;35: 819–26.
14. BHolt WM-J, RPrioli , J Thompson , M Oda. Surface Roughness in Ceramics with Different Finishing Techniques Using Atomic Force Microscope and Profilometer. Operative Dentistry. 2006;31(4):442-9.
15. Pegueroles M AC, Gil J. Interacciones entre las superficies de implantes dentales de titanio y los componentes biológicos. Gaceta Dental. 2010.
16. Liu H YR, Savion N, Narayanan A, Pitaru S. A Collagenous Cementum-Derived Attachment Protein Is a Marker for Progenitors of the Mineralized Tissue-Forming Cell Lineage of the Periodontal Ligament. J Bone and Mineral Research. 1997:1691-9.

17. Rocha S AG, Henriques G, Nobilo M. Vickers Hardness of Cast Commercially Pure Titanium and Ti-6Al-4V Alloy Submitted to Heat Treatments. *J Dent Braz.* 2006;126-9.
18. Williams DF. On the nature of biomaterials. *Biomaterials.* 2009;30(30):5897-909.
19. Hotchkiss KM, Reddy GB, Hyzy SL, Schwartz Z, Boyan BD, Olivares-Navarrete R. Titanium surface characteristics, including topography and wettability, alter macrophage activation. *Acta Biomaterialia.* 2016;31:425-34.
20. Askeland DR, Phulé PP. *The science and engineering of materials.* 4rd ed. Boston: PWS Pub.; 2003. xx, 1004 p., [8] p. of plates p.
21. Saini M, Singh Y, Arora P, Arora V, Jain K. Implant biomaterials: A comprehensive review. *World Journal of Clinical Cases : WJCC.* 2015;3(1):52-7.
22. Niinomi M. Mechanical properties of biomedical titanium alloys. *Mat Sci Eng a-Struct.* 1998;243(1-2):231-6.
23. Costa Cde A, Sena LA, Pinto M, Muller CA, Cavalcanti JH, Soares Gde A. In vivo characterization of titanium implants coated with synthetic hydroxyapatite by electrophoresis. *Brazilian dental journal.* 2005;16(1):75-81.
24. Keating. F. *Chromium-Nickel Austenitic Steels.* London: Butterworths; 1956.
25. Hodosh M, Shklar G, Povar M. Studies on the Porosity and Surface Texture of Polymer Implant Materials. *Journal of Dental Research.* 1971;50(6):1631-4.
26. Frazer RQ BR, Osborne PB, West KP. PMMA: an essential material in medicine and dentistry. *J Long Term Eff Med Implants.* 2005:629-39.
27. Maden E AC. Use of Polyethylene Fiber (Ribbond) in Pediatric Dentistry. *Archives of Clinical Experimental Surgery.* 2012:110-5.
28. Aschheim KW. *Esthetic dentistry a clinical approach to techniques and materials.* St. Louis, Missouri: Elsevier/Mosby; 2015. Available from: <http://myaccess.library.utoronto.ca/login?url=http://www.sciencedirect.com/science/book/9780323091763>.
29. Anusavice KJ, Shen C, Rawls HR, Phillips RW. *Phillips' science of dental materials.* St. Louis, Mo.: Elsevier/Saunders; 2013. Available from: <http://www.clinicalkey.com/dura/browse/bookChapter/3-s2.0-C20090424255>.
30. Cranin AN, Schnitman PA, Rabkin M, Dennison T, Onesto EJ. Alumina and zirconia coated vitallium oral endosteal implants in beagles. *Journal of Biomedical Materials Research.* 1975;9(4):257-62.
31. Manicone PF, Rossi Iommetti P, Raffaelli L. An overview of zirconia ceramics: Basic properties and clinical applications. *Journal of Dentistry.* 2007;35(11):819-26.
32. De Moraes M EC, Filho J, Oliveira L. Mechanical Properties of Alumina-Zirconia Composites for Ceramic Abutments. *Materials Research.* 2004:643-9.
33. Sáenz A, Rivera E, Brostow W, Castaño VM. Ceramic biomaterials: an introductory overview. *Journal of Materials Education.* 1999;21(5/6):267-76.
34. Ten Cate AR. The development of the periodontium — a largely ectomesenchymally derived unit. *Periodontology 2000.* 1997;13(1):9-19.
35. Bartold PM, Narayanan AS. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontology 2000.* 2006;40(1):29-49.
36. Iwata T, Yamato M, Ishikawa I, Ando T, Okano T. Tissue Engineering in Periodontal Tissue. *The Anatomical Record.* 2014;297(1):16-25.
37. McCulloch CA. Proteomics for the periodontium: current strategies and future promise. *Periodontology 2000.* 2006;40(1):173-83.
38. Lindhe JAN. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry.* 06 ed. Chichester: WILEY-BLACKWELL (AN IMPRI); 2013.

39. Seo B-M, Miura M, Gronthos S, Mark Bartold P, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *The Lancet*. 2004;364(9429):149-55.
40. Lin NH, Gronthos S, Bartold PM. Stem cells and periodontal regeneration. *Australian Dental Journal*. 2008;53(2):108-21.
41. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease*. *Periodontology* 2000. 2006;40(1):11-28.
42. Reddy S. *Periodontics*. Tunbridge Wells, UK
New Delhi: Anshan ;
Jaypee Brothers Medical Publishers; 2009. viii, 171 p. p.
43. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry – Part II: Clinical applications. *Journal of Prosthodontic Research*. 2012;56(4):229-48.
44. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry – Part I: Stem cell sources. *Journal of Prosthodontic Research*. 2012;56(3):151-65.
45. Arzate Higinio A-PMA. Human cementum tumor cells have different features from human osteoblastic cells in vitro. *Journal of Periodontal Research*. 1998;33:249-58.
46. Byoung-Moo Seo MM, Stan Gronthos, Peter Mark Bartold, Sara Batouli, Jaime Brahim, Marian Young, Pamela Gehron Robey, Cun-Yu Wang, Songtao Shi. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament www.thelancet.com. 2004;364.
47. Huang GT GS, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009;88(9):792-806.
48. Nagatomo K KM, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, Muneta T, Ishikawa I. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *Journal of Periodontal Research*. 2006;41:303-10.
49. Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontology* 2000. 2000;24(1):99-126.
50. Cho M-I, Garant PR. Development and general structure of the periodontium. *Periodontology* 2000. 2000;24(1):9-27.
51. Bateman ME, Strong AL, McLachlan JA, Burow ME, Bunnell BA. The Effects of Endocrine Disruptors on Adipogenesis and Osteogenesis in Mesenchymal Stem Cells: A Review. *Frontiers in Endocrinology*. 2017;7:171.
52. Driessen BJH, Logie C, Vonk LA. Cellular reprogramming for clinical cartilage repair. *Cell Biology and Toxicology*. 2017:1-21.
53. Li J, Dong S. The Signaling Pathways Involved in Chondrocyte Differentiation and Hypertrophic Differentiation. *Stem Cells International*. 2016;2016:2470351.
54. Yu D-A, Han J, Kim B-S. Stimulation of Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *International Journal of Stem Cells*. 2012;5(1):16-22.
55. Kolettas E, Buluwela L, Bayliss MT, Muir HI. Expression of cartilage-specific molecules is retained on long-term culture of human articular chondrocytes. *Journal of Cell Science*. 1995;108(5):1991-9.
56. Bosshardt DD. Are Cementoblasts a Subpopulation of Osteoblasts or a Unique Phenotype? *Journal of Dental Research*. 2005;84(5):390-406.
57. Gomez de Ferraris, A. CM. *Histología y embriología bucodental*. 3a, editor. Madrid: Medica panamericana; 2004. x, 468 p. p.
58. Warnes TW. Alkaline phosphatase. *Gut*. 1972;13(11):926-37.
59. Orimo H. The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in Health and Disease. *Journal of Nippon Medical School*. 2010;77(1):4-12.

60. Whyte MP. Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1192(1):190-200.
61. Handa K, Saito M, Yamauchi M, Kiyono T, Sato S, Teranaka T, et al. Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells. *Bone*.31(5):606-11.
62. Harris NL, Rattray KR, Tye CE, Underhill TM, Somerman MJ, D'Errico JA, et al. Functional analysis of bone sialoprotein: identification of the hydroxyapatite-nucleating and cell-binding domains by recombinant peptide expression and site-directed mutagenesis. *Bone*.27(6):795-802.
63. Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone Sialoprotein. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1999;10(1):79-98.
64. Proudfoot D, Shanahan CM. Molecular mechanisms mediating vascular calcification: Role of matrix Gla protein (Review Article). *Nephrology*. 2006;11(5):455-61.
65. Mariotti A. The extracellular matrix of the periodontium: dynamic and interactive tissues. *Periodontology 2000*. 1993;3(1):39-63.
66. Pérez MAA, Pitaru S, Fregoso OA, Gasga JR, Arzate H. Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line. *Journal of Structural Biology*. 2003;143(1):1-13.
67. Arzate H, Jiménez-García LF, Álvarez-Pérez MA, Landa A, Bar-Kana I, Pitaru S. Immunolocalization of a Human Cementoblastoma-conditioned Medium-derived Protein. *Journal of Dental Research*. 2002;81(8):541-6.
68. Kémoun P, Laurencin-Dalicieux S, Rue J, Farges J-C, Gennero I, Conte-Auriol F, et al. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell and Tissue Research*. 2007;329(2):283-94.
69. Hoz L, Romo E, Zeichner-David M, Sanz M, Nunez J, Gaitan L, et al. Cementum protein 1 (CEMP1) induces differentiation by human periodontal ligament cells under three-dimensional culture conditions. *Cell Biol Int*. 2012;36(2):129-36.
70. Arzate H, Chimal-Monroy J, Hernández-Lagunas L, de León LD. Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells. *Journal of Periodontal Research*. 1996;31(2):144-8.
71. Carmona-Rodríguez B, Álvarez-Pérez MA, Narayanan AS, Zeichner-David M, Reyes-Gasga J, Molina-Guarneros J, et al. Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;358(3):763-9.
72. Serrano J, Romo E, Bermúdez M, Narayanan AS, Zeichner-David M, Santos L, et al. Bone Regeneration in Rat Cranium Critical-Size Defects Induced by Cementum Protein 1 (CEMP1). *PLoS ONE*. 2013;8(11):e78807.
73. Romo-Arévalo E, Arzate H, Montoya-Ayala G, Rodríguez-Romero A. High-level expression and characterization of a glycosylated human cementum protein 1 with lectin activity. *FEBS Letters*. 2016;590(1):129-38.
74. Saito M, Iwase M, Maslan S, Nozaki N, Yamauchi M, Handa K, et al. Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone*.29(3):242-8.
75. Wu D, Ikezawa K, Parker T, Saito M, Narayanan AS. Characterization of a collagenous cementum-derived attachment protein. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1996;11(5):686-92.
76. BarKana I, Narayanan AS, Grosskop A, Savion N, Pitaru S. Cementum Attachment Protein Enriches Putative Cementoblastic Populations on Root Surfaces in vitro. *Journal of Dental Research*. 2000;79(7):1482-8.

77. Komaki M, Kang M, Narayanan AS. Role of MAP Kinases p42erk-2/p44erk-1 in Cementum-derived Attachment-protein-mediated Cell Attachment. *Journal of Dental Research*. 2000;79(10):1789-93.
78. Metzger Z, Weinstock B, Dotan M, Narayanan AS, Pitaru S. Differential chemotactic effect of cementum attachment protein on periodontal cells. *Journal of Periodontal Research*. 1998;33(2):126-9.
79. Pitaru S, Narayanan SA, Olson S, Savion N, Hekmati H, Alt I, et al. Specific cementum attachment protein enhances selectively the attachment and migration of periodontal cells to root surfaces. *Journal of Periodontal Research*. 1995;30(5):360-8.
80. Saito M, Narayanan S. Signaling Reactions Induced in Human Fibroblasts During Adhesion to Cementum-Derived Attachment Protein. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1999;14(1):65-72.
81. Zeichner-David M. Regeneration of periodontal tissues: cementogenesis revisited. *Periodontology 2000*. 2006;41(1):196-217.
82. Montoya G, Arenas J, Romo E, Zeichner-David M, Alvarez M, Narayanan AS, et al. Human recombinant cementum attachment protein (hrPTPLa/CAP) promotes hydroxyapatite crystal formation *in vitro* and bone healing *in vivo*. *Bone*. 69:154-64.
83. Dudhia J. Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2005;62(19):2241-56.
84. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. *Essential cell biology*. Fourth edition. ed. New York: Garland Science; 2014. xxiii, 726 pages, 112 pages diversement numérotées p.
85. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. *Molecular biology of the cell*. Sixth edition. ed. New York, New York: Garland Science, Taylor and Francis Group; 2015. xxxiv, 1342 pages, 88 pages diversement numérotées p.
86. Alberts B. *Biologie moléculaire de la cellule*. 5e éd. ed. Paris: Médecine Sciences Publications; 2011. xxiii, 1601, 90 p. p.
87. Mallein-Gerin F, Kosher RA, Upholt WB, Tanzer ML. Temporal and spatial analysis of cartilage proteoglycan core protein gene expression during limb development by *in situ* hybridization. *Developmental Biology*. 1988;126(2):337-45.
88. Danforth E. Failure of adipocyte differentiation causes type II diabetes mellitus? *Nat Genet*. 2000;26(1):13-.
89. MacDougald OA, M. DL. Transcriptional Regulation of Gene Expression During Adipocyte Differentiation. *Annual Review of Biochemistry*. 1995;64(1):345-73.
90. Rodríguez A, Ezquerro S, Méndez-Giménez L, Becerril S, Frühbeck G. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*. 2015;309(8):E691-E714.
91. Ponche A, Bigerelle M, Anselme K. Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 1: Physico-chemical effects. *P I Mech Eng H*. 2010;224(H12):1471-86.
92. Wang H, Chu PK. Chapter 4 - Surface Characterization of Biomaterials A2 - Bandyopadhyay, Amit. In: Bose S, editor. *Characterization of Biomaterials*. Oxford: Academic Press; 2013. p. 105-74.
93. Vahabi S, Nazemi Salman B, Javanmard A. Atomic Force Microscopy Application in Biological Research: A Review Study. *Iranian Journal of Medical Sciences*. 2013;38(2):76-83.
94. So Yeon Kim, Ji-Yeon Yoo, Joo-Young Ohe, Jung-Woo Lee, Ji-Hoi Moon, Yong-Dae Kwon, et al. Differential Expression of Osteo-Modulatory Molecules in Periodontal Ligament Stem Cells in Response to Modified Titanium Surfaces. *BioMed Research International*. 2014.

95. Packham DE. Surface energy, surface topography and adhesion. *International Journal of Adhesion and Adhesives*. 2003;23(6):437-48.
96. Rupp F, Gittens RA, Scheideler L, Marmur A, Boyan BD, Schwartz Z, et al. A Review on the Wettability of Dental Implant Surfaces: Theoretical and Experimental Aspects. *Acta biomaterialia*. 2014;10(7):2894-906.
97. Saghiri M-A, Asatourian A, Garcia-Godoy F, Sheibani N. The role of angiogenesis in implant dentistry part I: Review of titanium alloys, surface characteristics and treatments. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*. 2016;21(4):e514-e25.
98. Vogler EA. Protein adsorption in three dimensions. *Biomaterials*. 2012;33(5):1201-37.
99. Wang L, Nancollas GH. Pathways to biomineralization and biodemineralization of calcium phosphates: the thermodynamic and kinetic controls. *Dalton Transactions*. 2009(15):2665-72.
100. Berg JM, Eriksson LG, Claesson PM, Borve KG. 3-Component Langmuir-Blodgett-Films with a Controllable Degree of Polarity. *Langmuir*. 1994;10(4):1225-34.
101. van der Heide P. XPS Instrumentation. *X-Ray Photoelectron Spectroscopy: John Wiley & Sons, Inc.*; 2011. p. 27-60.
102. Franks GV, Meagher L. The isoelectric points of sapphire crystals and alpha-alumina powder. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2003;214(1-3):99-110.
103. Hanawa T. A comprehensive review of techniques for biofunctionalization of titanium. *Journal of Periodontal & Implant Science*. 2011;41(6):263-72.
104. Babic BM. Point of zero charge and intrinsic equilibrium constants of activated carbon cloth. *Carbon* 1999.
105. Kulkarni M, Mazare A, Gongadze E, Š P, Kralj-Iglič V, Milošev I, et al. Titanium nanostructures for biomedical applications. *Nanotechnology*. 2015;26(6):062002.
106. Kosmulski M. pH-dependent surface charging and points of zero charge. IV. Update and new approach. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2009;337(2):439-48.
107. Medina JC, Bizarro M, Gomez CL, Depablos-Rivera O, Mirabal-Rojas R, Monroy BM, et al. Sputtered bismuth oxide thin films as a potential photocatalytic material. *Catalysis Today*. 2016;266:144-52.
108. Xiaojie L, Dapeng L, Ping G, Yan D, Gang S. Biological behavior of neurally differentiated periodontal ligament stem cells on different titanium implant surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2014;102(8):2805-12.
109. Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*. 1996;4(1):14-9.
110. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983;65(1-2):55-63.
111. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*. 1987;162(1):156-9.
112. Trizol Reagent. Invitrogen.
113. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
114. Zhang C, Li J, Zhang L, Zhou Y, Hou W, Quan H, et al. Effects of mechanical vibration on proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Archives of oral biology*. 2012;57(10):1395-407.
115. Tang L, Li N, Xie H, Jin Y. Characterization of mesenchymal stem cells from human normal and hyperplastic gingiva. *Journal of cellular physiology*. 2011;226(3):832-42.
116. Feller L, Jadwat Y, Khammissa RAG, Meyerov R, Schechter I, Lemmer J. Cellular Responses Evoked by Different Surface Characteristics of Intraosseous Titanium Implants. *BioMed Research International*. 2015;2015:171945.

117. Vogler EA. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Adv Colloid Interfac.* 1998;74:69-117.
118. Ivanovski S. Periodontal regeneration. *Australian Dental Journal.* 2009;54:S118-S28.
119. Golub EE. Role of matrix vesicles in biomineralization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 2009;1790(12):1592-8.
120. Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochemical Journal.* 1996;317(Pt 1):59-64.
121. Lin K, Wu C, Chang J. Advances in synthesis of calcium phosphate crystals with controlled size and shape. *Acta Biomaterialia.* 2014;10(10):4071-102.
122. Velasco-Ortega E, Alfonso-Rodríguez CA, Monsalve-Guil L, España-López A, Jiménez-Guerra A, Garzón I, et al. Relevant aspects in the surface properties in titanium dental implants for the cellular viability. *Materials Science and Engineering: C.* 2016;64:1-10.
123. Mendonça G, Mendonça DBS, Aragão FJL, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology – From micron- to nanotopography. *Biomaterials.* 2008;29(28):3822-35.
124. Zinger O, Anselme K, Denzer A, Habersetzer P, Wieland M, Jeanfils J, et al. Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. *Biomaterials.* 2004;25(14):2695-711.
125. Wenjun Zhu aML. Periodontal Ligament Stem Cells: Current Status, Concerns, and Future Prospects. *Hindawi Publishing Corporation Stem Cells International.* 2015;2105:1-11.
126. Miletic M, Mojsilovic S, Okic-Dordevic I, Kukolj T, Jaukovic A, Santibanez JF, et al. Mesenchymal Stem Cells Isolated from Human Periodontal Ligament. *Arch Biol Sci.* 2014;66(1):261-71.
127. Boyan BD, Bonewald LF, Paschalis EP, Lohmann CH, Rosser J, Cochran DL, et al. Osteoblast-Mediated Mineral Deposition in Culture is Dependent on Surface Microtopography. *Calcified Tissue International.* 2002;71(6):519-29.
128. Gittens RA, Olivares-Navarrete R, McLachlan T, Cai Y, Hyzy SL, Schneider JM, et al. Differential Responses of Osteoblast Lineage Cells to Nanotopographically-Modified, Microroughened Titanium-Aluminum-Vanadium Alloy Surfaces. *Biomaterials.* 2012;33(35):8986-94.
129. Israelachvili JN. 6 - Van der Waals Forces. *Intermolecular and Surface Forces (Third Edition).* San Diego: Academic Press; 2011. p. 107-32.

CAPÍTULO 9. ANEXOS**9.1 DIFUSIÓN DE INVESTIGACIÓN****10th World Biomaterial Congress**

Can surface roughness induce osteoblasts differentiation independently of the type of material? Comparison between metals, ceramics and polymers

Modo: cartel

Mayo 18-22, 2016

Montreal, Canadá.

XXIV International Materials Research Congress 2015

“Comparison of the differentiation of periodontal ligament stem cells on metals, ceramics and polymers”

Modo: Oral

Agosto 14-19, 2015.

Cancún, Quintana Roo.

Congreso Nacional e Internacional de Posgrado e Investigación

Sesión Anual de la División Mexicana de la IADR

“Comparación del potencial de diferenciación celular in vitro de diversos materiales”

Mayo 31 - Junio 4, 2015.

Cancún, Quintana Roo.

3er. Simposio de Estudiantes del IIM

“Influencia de las propiedades físicas y químicas superficiales de 3 tipos de biomateriales en el potencial de diferenciación celular in vitro”

Instituto de Investigaciones en Materiales UNAM

Julio 29-31, 2015

Encuentro Académico de la División Mexicana de la International Association for Dental Research (IADR)

“Comparación del potencial de diferenciación celular in vitro de diversos materiales”

Modo: Oral

Mayo 31- Junio 2, 2015

Cancún, Quintana Roo.

4to. Congreso de Biomateriales Dentales de la Ciencia a la Clínica.

Influencia de las propiedades físicas y químicas superficiales de metales, polímeros y cerámicos en las interacciones celulares “*in vivo*”

Modo: Poster

Auditorio Alfonso Caso, UNAM, México D.F

Diciembre 4-5, 2014

Primer Congreso de la Red de Biomateriales e Ingeniería de Tejidos.

Influencia de las propiedades físicas y químicas superficiales de diferentes biomateriales en las interacciones celulares “*in vitro*”

Modo: Poster.

Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM

Diciembre 1-2, 2014.

XXIII International Materials Research Congress.**The Biomaterials for Medical Applications Symposium.**

“Surface Properties of Materials of Biological Interest”

Modo: Poster

Cancún Quintana Roo., México.

Agosto 17-21, 2014.

9.2 ARTÍCULOS REALIZADOS DURANTE EL DOCTORADO



Materials Science and Engineering: C

Volume 76, 1 July 2017, Pages 1075–1084



Comparison of the osteogenic, adipogenic, chondrogenic and cementogenic differentiation potential of periodontal ligament cells cultured on different biomaterials

C.C. Barrera-Ortega^{a, b}, L. Hoz-Rodriguez^a, H. Arzate^a, A. Fonseca-Garcia^{c, d}, J. Pérez-Alvarez^c, S.E. Rodil^c  

[Show more](#)

<http://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.213> [Get rights and content](#)

Hindawi
International Journal of Optics
Volume 2017, Article ID 7634739, 8 pages
<https://doi.org/10.1155/2017/7634739>



Research Article

Microhardness, Structure, and Morphology of Primary Enamel after Phosphoric Acid, Self-Etching Adhesive, and Er:YAG Laser Etching

**María del Carmen Zolla Alcantara-Galeana,¹ Rosalia Contreras-Bulnes,¹
Laura Emma Rodríguez-Vilchis,¹ Manuel Eduardo Espinosa-Pesqueira,²
Cecilia Carlota Barrera-Ortega,³ Itzel Monserrat López-Hurtado,¹
and Adriana Fernández-Bobadilla¹**

¹Facultad de Odontología, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología, Universidad Autónoma del Estado de México, Jesús Carranza Esquina Paseo Toluca, Colonia Universidad, 50130 Toluca, MEX, Mexico
²Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), SENER, Laboratorios de Microscopía Electrónica, Departamento de Tecnología de Materiales, Carretera México-Toluca S/N, Km 36.5, La Marquesa, 52750 Ocoyoacac, MEX, Mexico
³Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Escolar s/n Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, 04510 Ciudad de México, Mexico

Materials Science and Engineering C 66 (2016) 119–129

Contents lists available at ScienceDirect

Materials Science and Engineering C

journal homepage: www.elsevier.com/locate/msec




The effect of simulated inflammatory conditions on the surface properties of titanium and stainless steel and their importance as biomaterials

Abril Fonseca-García^{a,b}, J. Pérez-Alvarez^{a,*}, C.C. Barrera^c, J.C. Medina^{a,b}, A. Almaguer-Flores^d, R. Basurto Sánchez^e, Sandra E. Rodil^a

^a Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, México
^b Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, México
^c Posgrado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, Universidad Nacional Autónoma de México, México
^d Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, México
^e Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, México



Vacuum 125 (2016) 146–151

Contents lists available at ScienceDirect

Vacuum

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vacuum




Reduction of the coefficient of friction of niobium nitride coatings by the addition of bismuth

Roberto Mirabal-Rojas^{a,b,*}, Osmar Depablos-Rivera^{a,b}, Celia L. Gómez^{a,b}, Abril Fonseca-García^{a,b}, Juan C. Medina^{a,b}, Cecilia C. Barrera-Ortega^a, Jonatan Pérez-Alvarez^a, Stephen Muhl^a, Enrique Camps^c, Sandra E. Rodil^a

^a Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM, Circuito Exterior s/n CU, México D.F. 04510, Mexico
^b Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales, UNAM, Unidad de Posgrado, Edificio C, Piso 1, Zona Cultural de CU, México D.F. 04510, Mexico
^c Instituto de Nacional de Investigaciones Nucleares, Carretera México-Toluca S/N, kilómetro 36.5, La Marquesa, Municipio de Ocoyoacac, CP 52750, Estado de México, Mexico



CAPÍTULO 10. APÉNDICE

10.1 RUGOSIDAD CON PERFILOMETRÍA ÓPTICA

Como complemento de la investigación se utilizó un perfilómetro óptico (ZYGO Modelo NEXVIEW®) de reciente adquisición (Instituto de Investigación en Materiales).

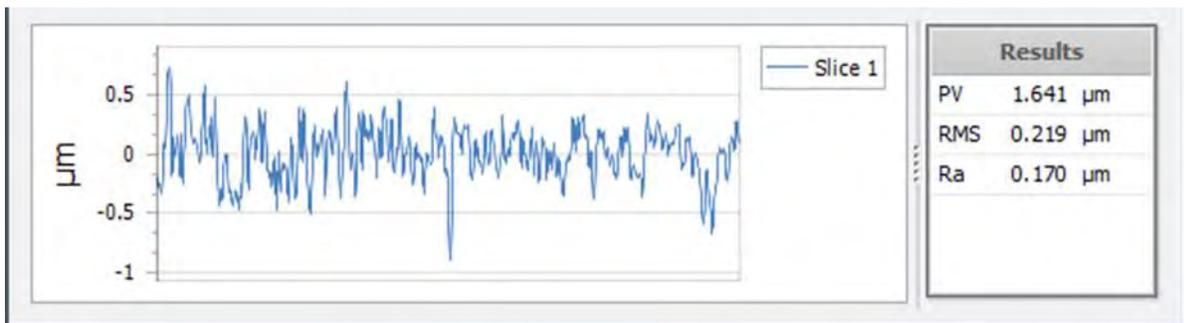
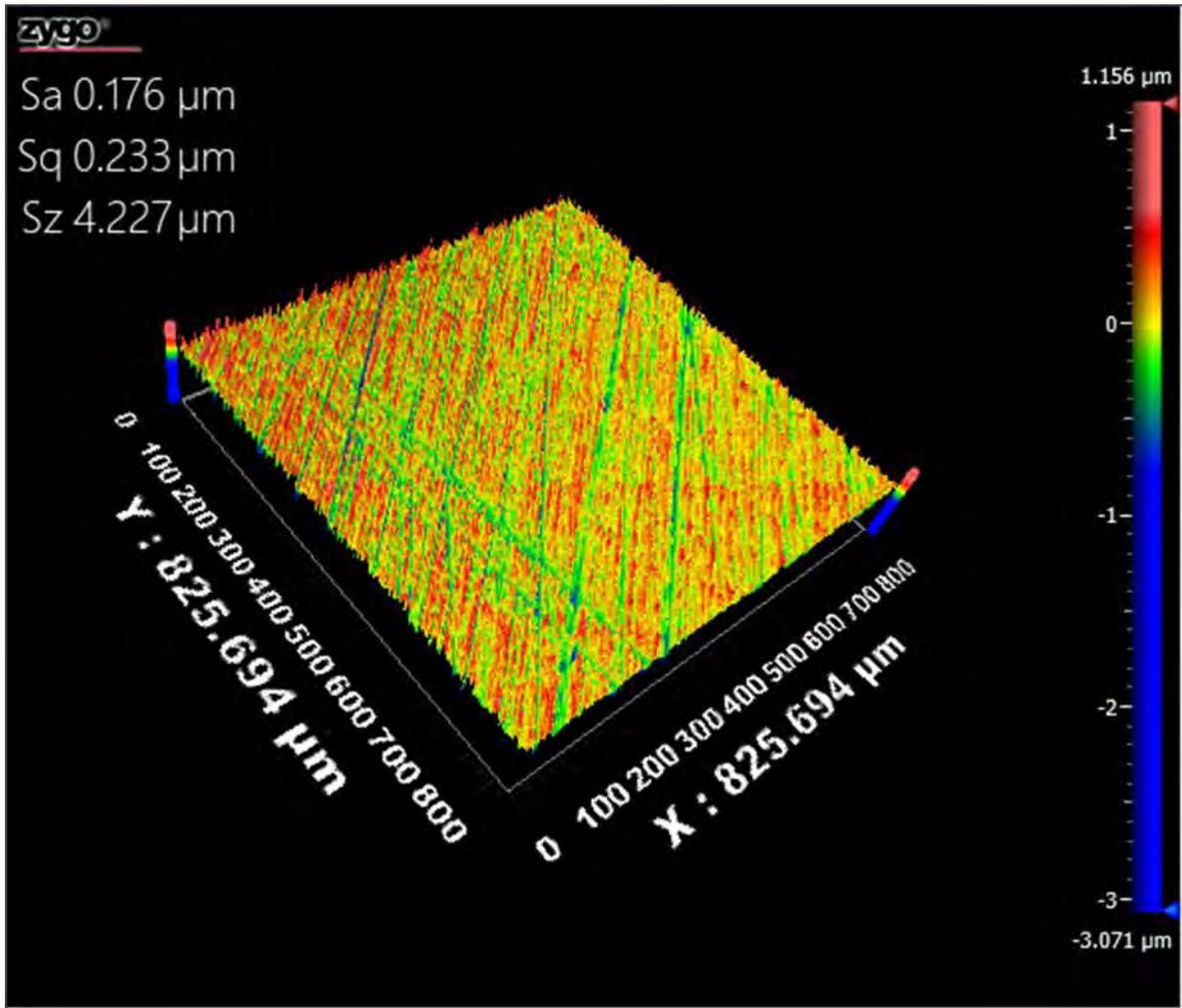
Los perfilómetros ópticos tienen sistemas de interferómetro de luz blanca, que ofrecen una perfilometría 3D rápida, sin contacto y de alta precisión de las características de la superficie. Los perfilómetros Zygo incluyen un software de análisis y control de datos para cada muestra. La elección del sistema de perfilómetro va a depender de los requisitos de su aplicación, incluyendo precisión, velocidad, automatización, flexibilidad de configuración y rango vertical.

El perfilómetro óptico proporciona un mapeo en 3D de superficies, sin contacto, de forma superficial, la topografía y metrología con el uso de lentes esféricas o asféricas y moldes, la precisión de la altura del nanómetro y millones de puntos de datos.

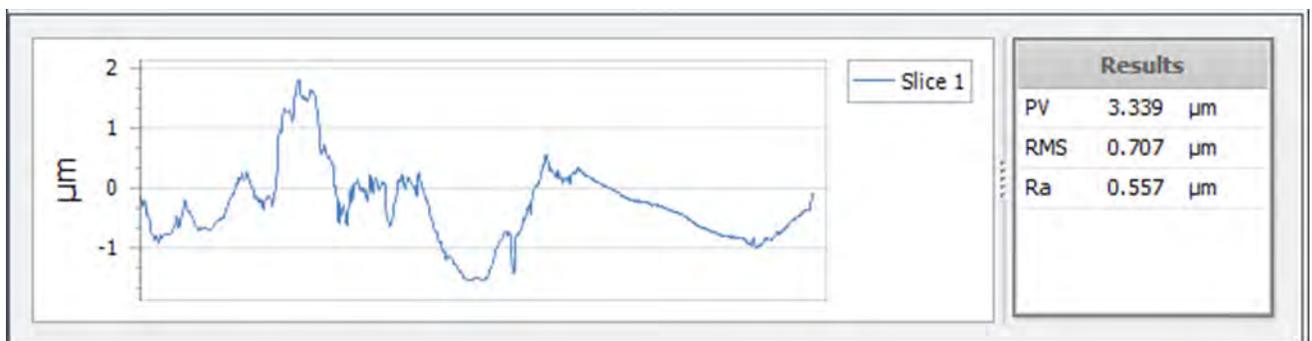
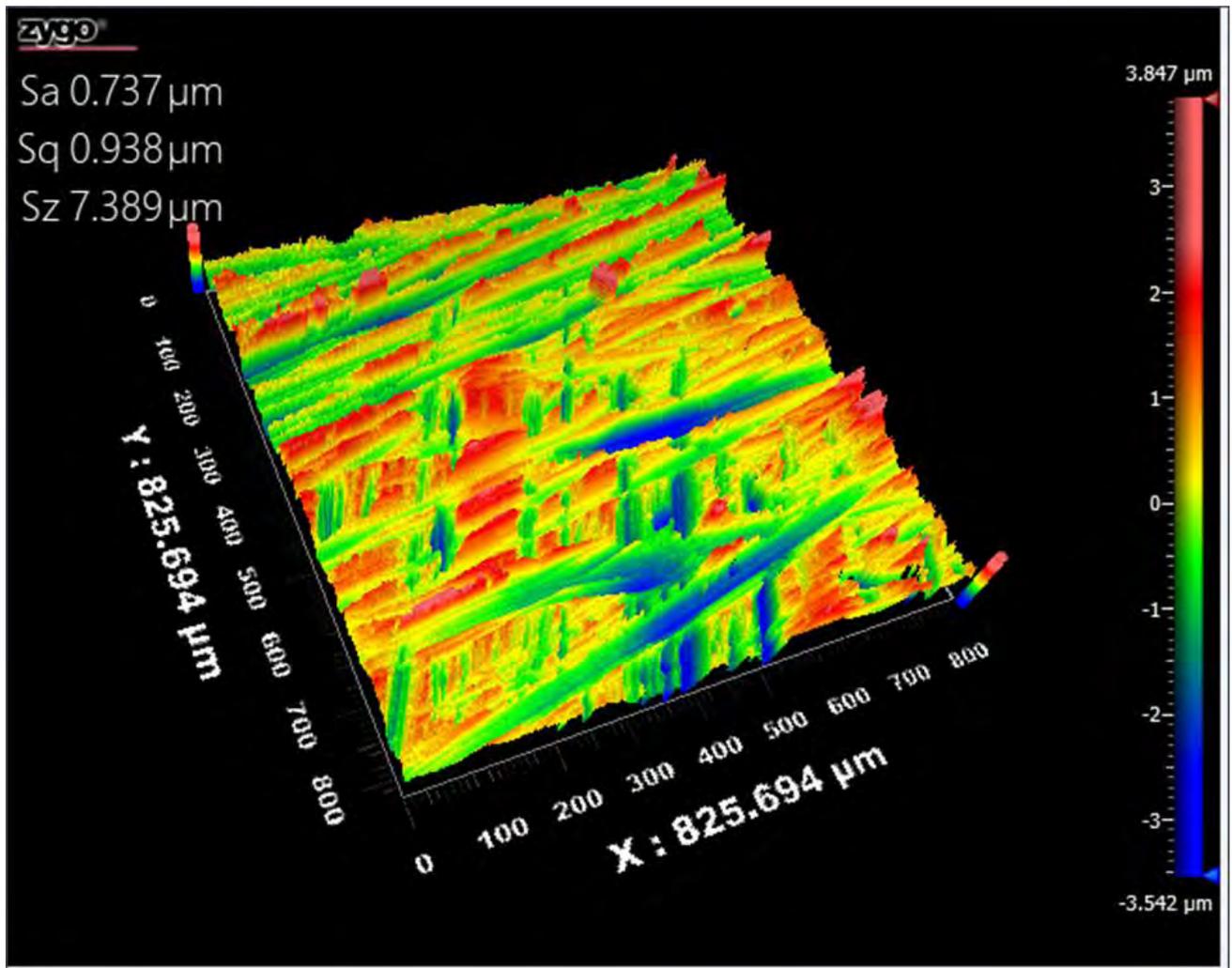
El rendimiento y la capacidad de cualquier perfilómetro óptico depende en gran medida de los objetivos de lente que utiliza. Los objetivos determinan la magnificación, la distancia de trabajo, la capacidad de pendiente y el campo de visión del generador de perfiles, por lo que la elección de los objetivos adecuados es muy importante para alcanzar sus metas de metrología. La amplia gama de objetivos que maneja la marca Zygo ofrece para sus perfiladores ópticos es inigualable en la industria y está creciendo continuamente. Ofrece objetivos especiales para largas distancias de trabajo, amplio campo de visión y la capacidad de medir películas finas y superficies que están bajo una superficie transparente.

Se realizó la perfilometría sobre las superficies de los diferentes materiales y enseguida se observan las imágenes, y sus respectivas rugosidades.

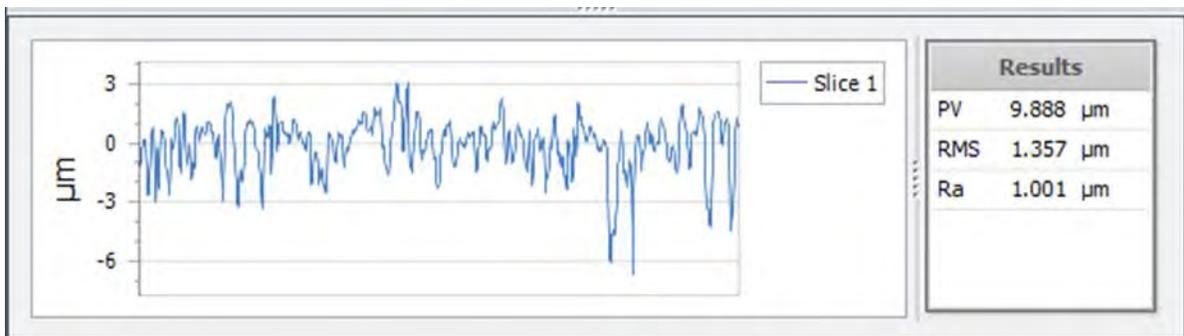
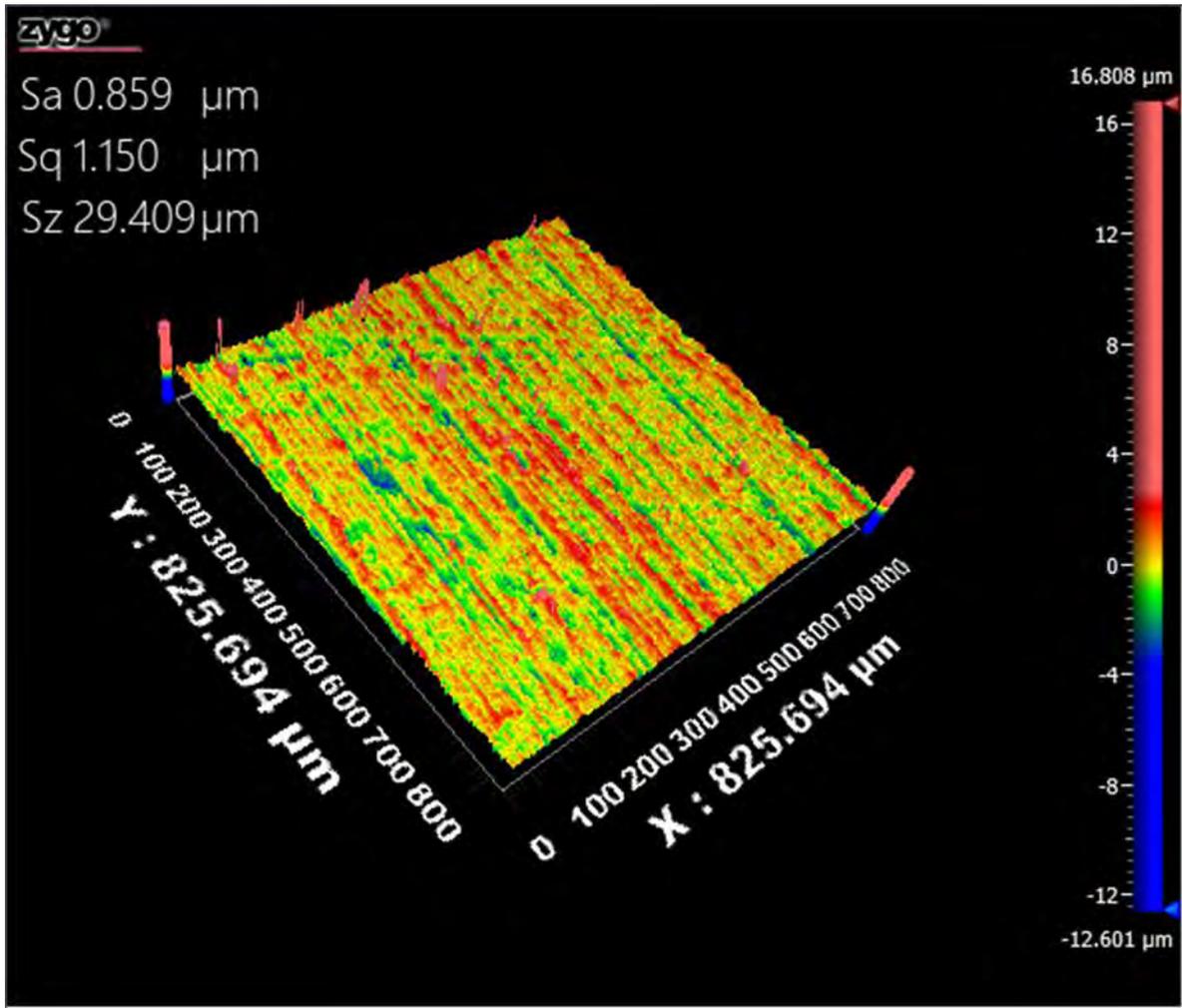
10.1.1 Titanio comercialmente puro



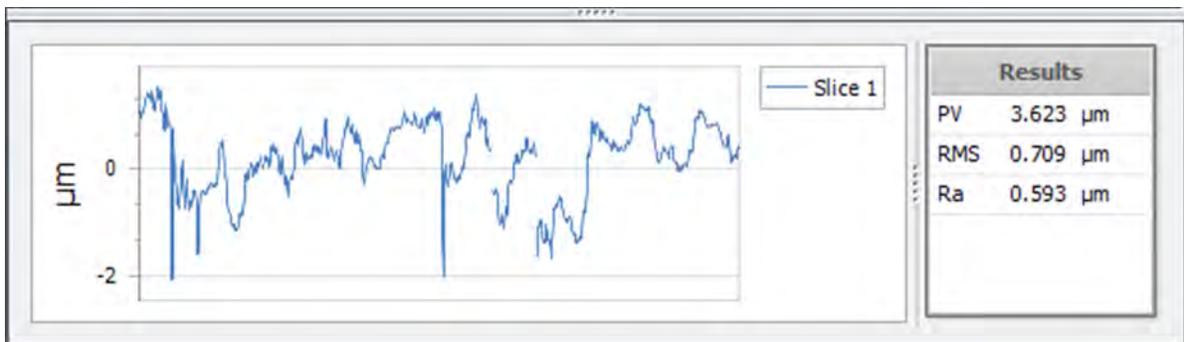
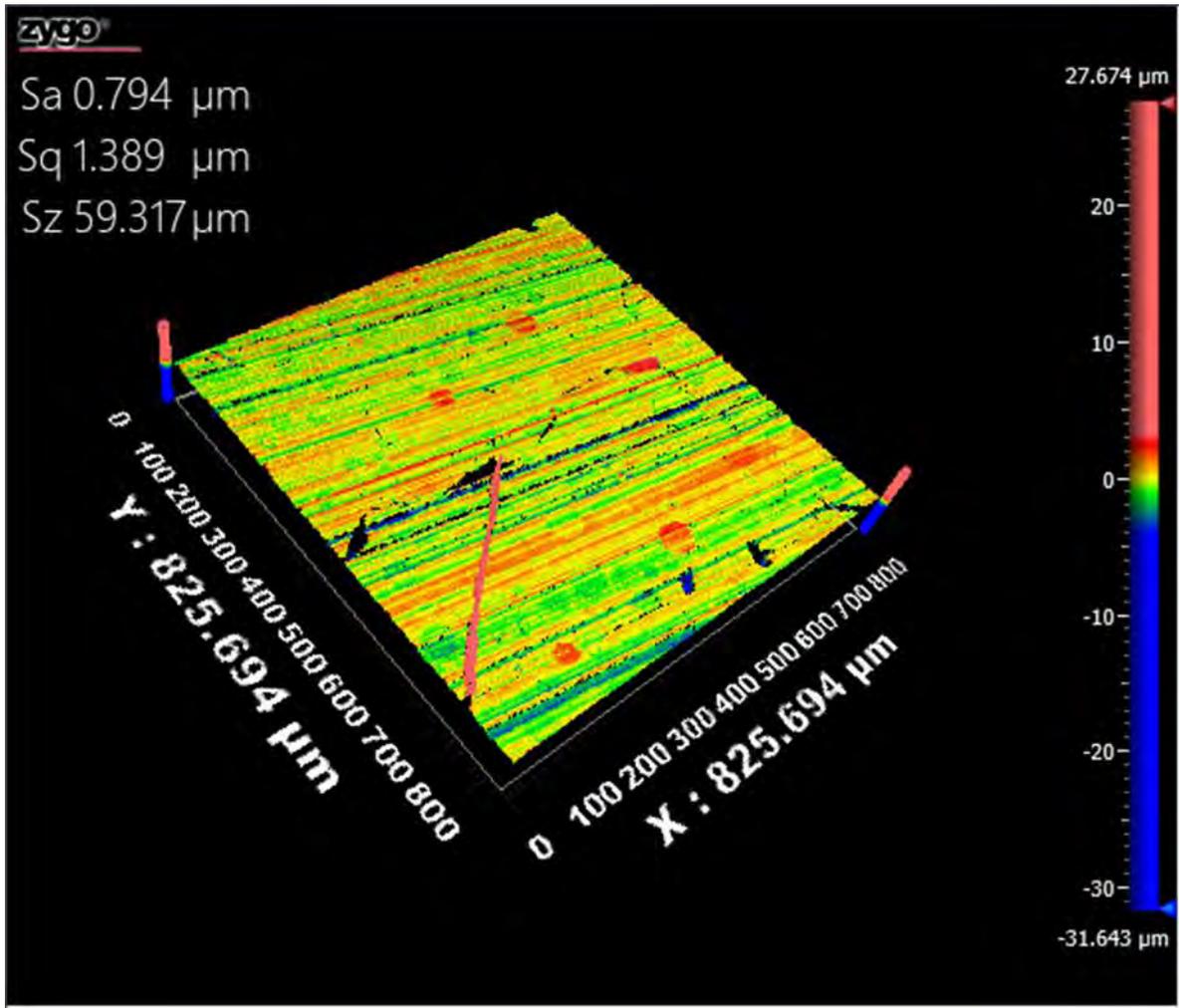
10.1.2 Acero inoxidable 316L



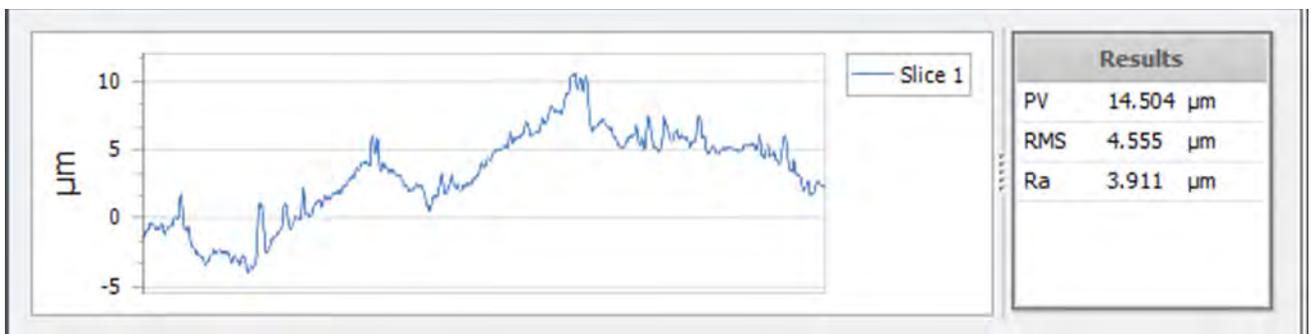
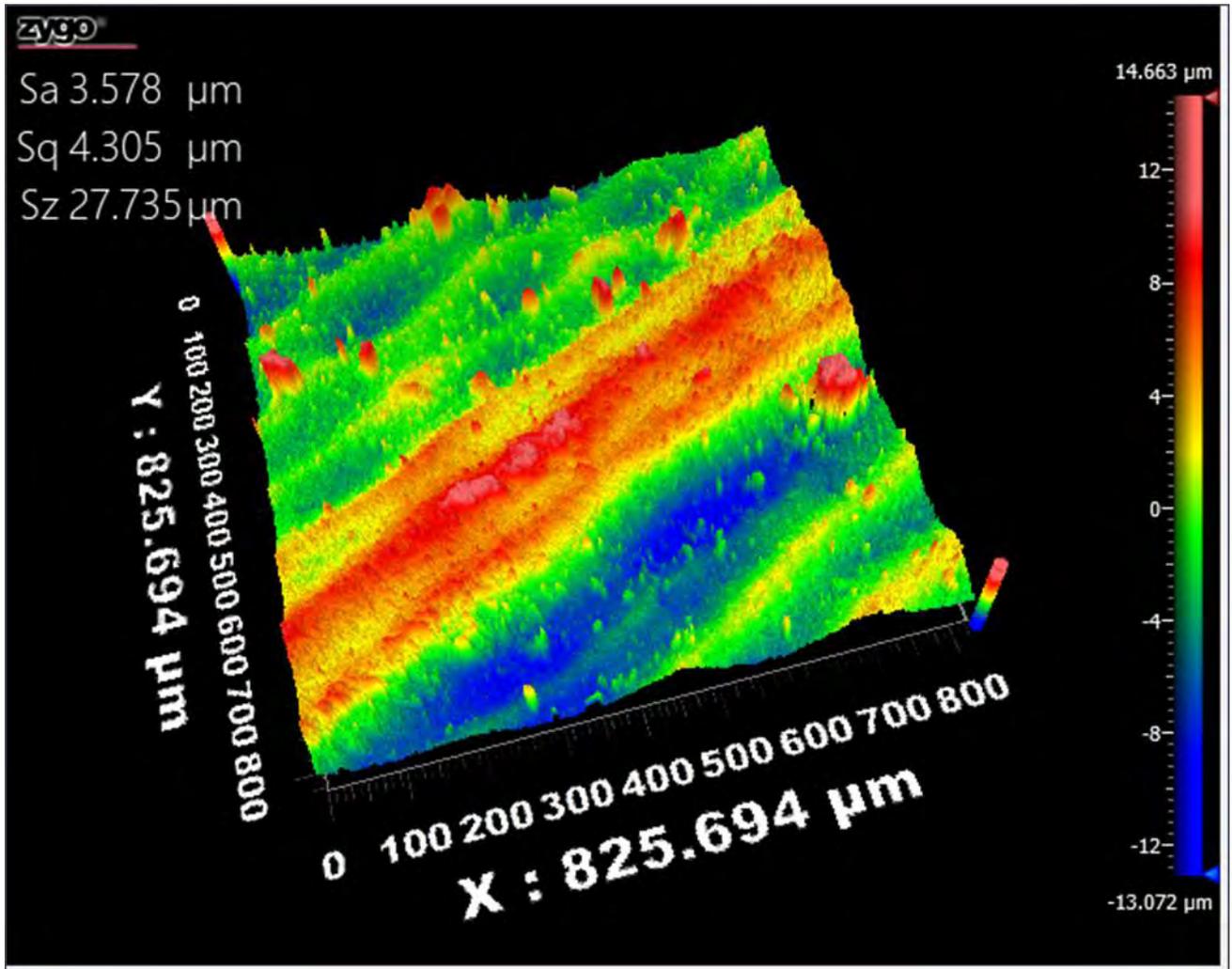
10.1.3 Polietileno de alta densidad



10.1.4 Polimetacrilato de metilo



10.1.5 Circonia



10.1.6 Porcelana dental

