



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DOCTORADO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE
LAS CÉLULAS MADRE AMNIÓTICAS
HUMANAS EN DISTINTOS
MATERIALES DENTALES**

Tesis Doctoral

LAURA CABO ZABALA

Sevilla, 2024

Sevilla, noviembre de 2024

EUGENIO VELASCO ORTEGA, Catedrático de Odontología Integrada de Adultos y Gerodontología de la Facultad de Odontología y Director del Máster de Implantología Oral de la Universidad de Sevilla.

ANTONIO PÉREZ PÉREZ, Profesor Titular de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICAN:

Que D^a. LAURA CABO ZABALA, Graduada en Biología por la Universidad de Sevilla e inscrita en el Programa de Doctorado de Ciencias de la Salud de la Universidad de Sevilla, ha realizado bajo su tutela y dirección el trabajo de investigación titulado **Evaluación de la viabilidad de las células madre amnióticas humanas en distintos materiales dentales** que consideramos satisfactorio para optar al título de Doctora en Biología.



Prof. Velasco Ortega



Prof. Pérez Pérez

DEDICATORIA

A mi familia más cercana. Todos piensan que no tengo límites y me proporcionan alas cuando me falla la confianza en mí.

A mis padres, las personas más trabajadoras que he conocido en mi vida y que me han transmitido todo el valor del esfuerzo y la constancia. Espero que estén orgullosos de mí.

A mi prima Luci, por creer y apostar en mí. Siempre has sido un ejemplo a seguir para tu prima pequeña.

A mis tías, mis mayores admiradoras.

A mi pareja, por estar. Por acompañarme. Por enseñarme a ver la vida con mucho más optimismo.

AGRADECIMIENTOS

A los Profesores EUGENIO VELASCO ORTEGA y ANTONIO PÉREZ PÉREZ por la supervisión, el compromiso y la dedicación en este trabajo. Tengo que agradecer la confianza depositada en mí, la constante ayuda y la motivación para terminar este proyecto. En un terreno nuevo, donde he tenido un aprendizaje constante, han conseguido hacerme el camino más fácil. Gracias por transmitirme vuestros conocimientos y por conseguir transmitirme vuestra pasión por la odontología y la investigación.

Al profesor RODRIGO RIEDEL del Instituto de Tecnología y Bioingeniería de la Universidad de Buenos Aires, por su colaboración en la realización del presente trabajo doctoral en relación a los estudios experimentales sobre la respuesta biológica de las células madre amnióticas.

Al profesor GIL MUR del Instituto de Biomateriales de la Universidad de Barcelona, por su colaboración en los estudios experimentales sobre la topografía y composición química de las superficies de los implantes.

A la empresa GALIMPLANT, que proporcionó todo el material de discos de titanio para realizar este estudio de investigación y poder valorar la respuesta biológica sobre las superficies de implantes.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. SUPERFICIE DE IMPLANTE Y OSEOINTEGRACION	2
2. FACTORES IMPLICADOS EN LA OSEOINTEGRACION	7
3. BIOLOGÍA DEL TEJIDO ÓSEO	10
3.1. Fenómenos de osificación	11
3.1.1. Osificación endocondral	11
3.1.2. Osificación aposicional	13
3.2. Factores reguladores implicados en la osteogénesis	15
3.3. Vías biológicas implicadas en la osteogénesis	19
3.3.1. Vía de señalización TGF- β /BMP	19
3.3.2. Vía de señalización de Wnt	22
3.3.3. Vía de señalización YAP/TAZ	23
3.4. Remodelado óseo	24
3.4.1. Linajes celulares del tejido óseo	25
4. LA UTILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE EN IMPLANTOLOGÍA ORAL	31
5. LAS CÉLULAS MADRE AMNIÓTICAS EPITELIALES Y MESENQUIMALES	32
6. SUPERFICIE DEL IMPLANTE	41
7. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS, MICROESTRUCTURALES Y MECÁNICAS DEL TITANIO.	43
7.1 Topografía de la superficie de implantes dentales	46
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	50
MATERIAL Y MÉTODOS	57

1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE TITANIO	58
2. CARACTERIZACIÓN DE SUPERFICIES DE DISCOS DE TITANIO	60
3. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS MADRE AMNIÓTICAS EPITELIALES Y MESENQUIMALES HUMANAS	62
4. ENSAYO DE VIABILIDAD DE MTT	63
5. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ALCALINA	64
6. CONSUMO DE CALCIO	64
7. ENSAYO CUANTITATIVO DE PCR EN TIEMPO REAL (QRT-PCR)	65
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	67
RESULTADOS	68
1. MICROSCOPIA Y TOPOGRAFÍA DE LAS SUPERFICIES DE TITANIO	69
2. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LA SUPERFICIE DE LOS DISCOS DE TITANIO	72
2.1. Viabilidad celular	72
2.2. Actividad de la fosfatasa alcalina	73
2.3. Consumo de calcio	74
3. EXPRESIÓN GÉNICA OSTEOGÉNICA	75
4. EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS SUBUNIDADES DE INTEGRINA α Y β	76
DISCUSIÓN	78

CONCLUSIONES	94
BIBLIOGRAFÍA	96
DOCUMENTACION ADJUNTA	112

INTRODUCCIÓN

1. SUPERFICIE DEL IMPLANTE Y OSTEOINTEGRACIÓN

Los avances en el campo de la implantología oral reflejan un notable interés en el estudio y comprensión de la interacción de los implantes con los tejidos circundantes y los métodos para favorecer el fenómeno de osteointegración ¹. La osteointegración es el proceso de creación de un fuerte vínculo entre el hueso vivo y la superficie de un implante. Durante el desarrollo de estos fenómenos, se produce nuevo tejido óseo que rodea y se adhiere al implante, proporcionando la estabilidad mecánica necesaria. El éxito de la osteointegración depende de varios factores, como el diseño del implante, las características de la superficie, las técnicas quirúrgicas empleadas y los factores relacionados con el receptor. La estabilidad de los implantes dentales y su éxito a largo plazo están directamente relacionados con el grado de osteointegración logrado. Para garantizar resultados favorables y duraderos en implantología dental, es esencial lograr una osteointegración óptima ²⁻³.

Cuando se coloca un implante dental, se daña el hueso circundante y se requiere una cascada de eventos para completar la regeneración ósea. Los estudios sobre la fase temprana de cicatrización muestran que el diseño de la superficie del implante puede contribuir al éxito o al fracaso de la osteointegración de los implantes dentales. Durante la cicatrización temprana, las proteínas, la sangre, las células inmunitarias y las células osteoprogenitoras interactúan con el biomaterial. Estas interacciones afectan en última instancia a la osteointegración del implante ⁴.

En los fenómenos de la osteointegración pueden diferenciarse cuatro etapas. La primera etapa se denomina etapa de cicatrización inicial, que transcurre inmediatamente tras la colocación del implante. El implante entra

INTRODUCCIÓN

en contacto con el hueso circundante y se forma un coágulo de sangre alrededor de la superficie del implante. El contacto de los implantes con la sangre y el líquido tisular dará como resultado la adsorción de proteínas en la superficie de los implantes. Esta capa de proteínas determina la activación de la cascada de coagulación, el sistema del complemento, y la migración de plaquetas y las células inmunitarias. En pocas horas, estas células orquestan una respuesta inflamatoria (Figura 1) ⁵⁻⁶.

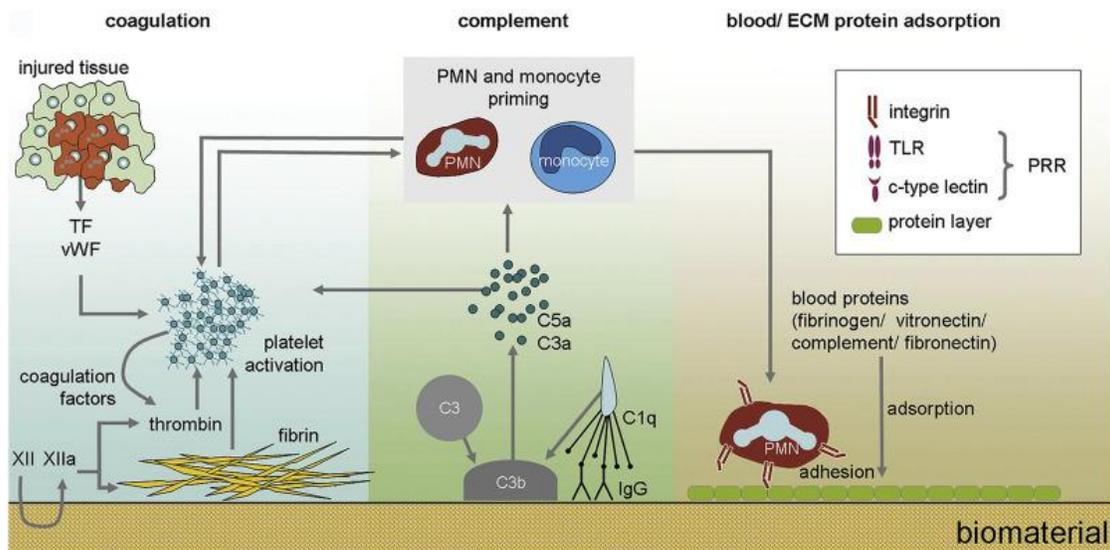


Figura 1.

Procesos biológicos inmediatos tras la implantación de biomateriales.

(Wang et al. ⁶).

La segunda etapa, llamada etapa inflamatoria, desencadena el reclutamiento de varias células fagocíticas al sitio del implante, incluidos neutrófilos y macrófagos (Figura 2) ⁷. Estas células eliminan desechos, bacterias y tejido dañado. La inflamación también estimula la liberación de factores de crecimiento y citoquinas, que son cruciales en los procesos de

INTRODUCCIÓN

cicatrización posteriores. Los factores de crecimiento son fundamentales para que los preosteoblastos reclutados puedan diferenciarse en osteoblastos ⁵.

La tercera etapa es la etapa proliferativa. Durante esta etapa, los osteoblastos, células formadoras de hueso, comienzan a migrar y proliferar en el hueso circundante. Generan y depositan nueva matriz ósea alrededor de la superficie del implante. Los osteoblastos forman gradualmente una matriz mineralizada, que une el implante y el hueso ⁵. Cuando los osteoblastos están rodeados por sus productos o matriz, se diferencian en osteocitos para promover una mayor formación ósea, lo que significa que el hueso se forma en la superficie de los implantes dentales. La reacción continuará hasta que la superficie de los implantes esté cubierta de hueso ⁸.

La última etapa es la de remodelación. En esta etapa final, el hueso recién formado sufre una remodelación, que implica eliminación de hueso viejo y dañado y su reemplazo por hueso nuevo y maduro. El proceso de remodelación ayuda a fortalecer aún más la interfase hueso-implante y a optimizar las propiedades mecánicas del implante integrado ⁵.

Un implante dental ideal debe tener un gran potencial para lograr la osteointegración. El mecanismo de osteointegración está estrechamente relacionado con el diseño de los biomateriales utilizados en implantología ⁹.

El titanio sigue siendo el metal más utilizado por sus características únicas: biocompatibilidad, inactividad biológica, capacidad de osteointegración y propiedades mecánicas. Esto implica que la tasa de supervivencia de implantes de titanio (totales y parciales) son cercanas al cien por ciento. Los avances significativos realizados en las superficies de titanio son responsables de gran parte del progreso en la implantología dental moderna ¹⁰.

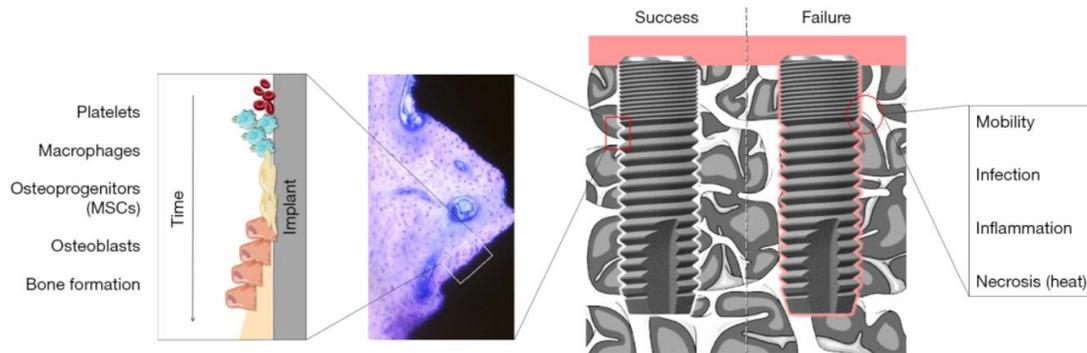


Figura 2

Fenómeno de osteointegración. (Cooper et al., ⁷).

Sin embargo, existe la complicación de que los biomateriales más comúnmente utilizados, el titanio (Ti) y sus aleaciones, son bioinertes y tienen una actividad biológica limitada. Desde el punto de vista biológico, la pérdida temprana y tardía del implante se considera un fracaso para lograr o mantener la osteointegración, respectivamente ¹¹. Por lo tanto, la mejora de la bioactividad de los implantes dentales es una cuestión vital que debe abordarse.

El esfuerzo por lograr una osteointegración mejorada se refleja en muchos trabajos de revisión sobre la modificación de la superficie de los implantes dentales, donde se ha demostrado repetidamente que los marcadores moleculares de osteoinducción y osteogénesis aumentan en superficies de implantes de titanio mejoradas topográficamente ¹²⁻¹³.

Si bien los implantes dentales se obtienen de diversas formas, casi todos tienen rugosidad a escala micro y nanométrica en la superficie. La modificación adicional mediante la superposición de características a

INTRODUCCIÓN

nanoescala sobre la superficie moderadamente rugosa o mediante la alteración de la energía de la superficie se utiliza para acelerar o aumentar aún más el contacto hueso-implante ¹⁴⁻¹⁵. Por lo tanto, las superficies tratadas para conseguir una rugosidad a nivel de micro/nanoescala permiten la adhesión, propagación, proliferación y diferenciación osteogénica de células madre y tienen un efecto potencial beneficioso en la osteogénesis y en la tasa de éxito de los implantes ¹⁶⁻¹⁸.

Existen diversos tratamientos sobre la superficie de titanio que permiten modificar la rugosidad de su topografía. Los tratamientos de arenado producen una macrorrugosidad, que se ha combinado con grabado ácido para conseguir una microestructura en la rugosidad del titanio. Todos estos tratamientos se han realizado con el objetivo de promover una buena adhesión, proliferación y diferenciación de las células osteoblásticas para lograr una buena osteointegración ¹⁹.

Adicionalmente, estudios recientes han demostrado que las células madres utilizadas en las superficies de implantes mejoran claramente su capacidad osteogénica, observándose una mayor formación de hueso nuevo, especialmente en la fase temprana de la regeneración ósea. Además, las células madre pueden diferenciarse directamente en osteoblastos y, en las primeras etapas de la osteointegración, contribuir directamente a la nueva formación ósea ¹⁶.

Las primeras células madre que colonizan la superficie del implante tras su inserción, las células madre mesenquimales óseas, tienen la capacidad de mejorar la regeneración ósea mediante su diferenciación en células parenquimales y la producción de factores de crecimiento. El control de la diferenciación de las células madre mesenquimales hacia el linaje osteogénico puede resultar beneficioso, permitiendo una osteointegración más rápida y

efectiva ¹⁶. Por lo tanto, el diseño *in vitro* de los micro y nanoambientes de las superficies de los implantes afecta directamente a los estímulos mecánicos que influyen en la diferenciación de células madre y el uso combinado de células madre sobre las superficies podría potenciar el fenómeno de osteointegración.

2. FACTORES IMPLICADOS EN LA OSTEOINTEGRACIÓN

La osteointegración ocurre en sentido físico cuando el hueso crece desde el lecho óseo nativo fijando mecánicamente el implante y se producen distintas uniones mecánicas y bioquímicas. En este momento es donde las diferentes superficies juegan un papel fundamental en la estimulación de las células implicadas y la aceleración de los tiempos de cicatrización ²⁰.

En la unión mecánica, el crecimiento del hueso hacia las irregularidades de la superficie produce la fijación del implante. Mientras mayor sean las irregularidades, mayor será el crecimiento óseo y mayor contacto habrá de la superficie con el hueso. Antes de la carga protésica del implante se deberá esperar el tiempo reglamentario para que se produzca este crecimiento y remodelado óseo. En la inserción del implante en el lecho óseo éste queda fijado al hueso mediante su macrodiseño, permitiendo una correcta estabilidad para que se produzca la osteointegración ²⁰. Es lo que se denomina estabilidad primaria, la cual se verá aumentada o disminuida en función del tipo de hueso en el que coloquemos el implante y el diseño macroscópico del implante ²¹.

La unión bioquímica es la propiedad que tiene el material del implante para unirse al tejido circundante. El titanio es un material bioinerte, por lo que su recubrimiento con materiales bioactivos como el fosfato cálcico o la albúmina facilitan la unión bioquímica al tejido óseo. Esta unión bioquímica es la encargada de producir la estabilidad secundaria. Tras la colocación del

INTRODUCCIÓN

implante comienza a disminuir la estabilidad primaria, debido a los procesos curativos celulares y extracelulares que se dan en la interfase implante-hueso²⁰.

Las células madre mesenquimales son células osteoprogenitoras que se encuentran en múltiples tejidos, incluidos el hueso y la médula ósea y son esenciales para la formación de la interfaz hueso-implante. Tras una lesión, éstas se reclutan en el sitio de la lesión (interfase implante/herida) y contribuyen a la regeneración ósea. En los sitios de fractura ósea, las células madre mesenquimales se reclutan rápidamente en el sitio y comienzan a proliferar aproximadamente tres días después de la lesión. Esto es promovido por las respuestas inflamatorias a las lesiones y la liberación de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas²².

Se han realizado importantes observaciones sobre la osteointegración en las primeras etapas de la cicatrización del lecho implantario. La formación del coágulo de fibrina crea un andamiaje sobre el que se producen los primeros eventos celulares. Las plaquetas que forman parte integral del coágulo de fibrina son fuentes ricas en factores de crecimiento y contribuyen a la osteointegración. Este andamiaje de fibrina se convierte en un elemento necesario para el movimiento celular desde los sitios adyacentes hacia la superficie del implante⁷.

Tras el reclutamiento de osteoprogenitores en la superficie del implante se favorece su proliferación y posterior diferenciación a células osteoblásticas que forman una matriz mineralizante. La diferenciación osteoblástica ahora está bien definida y múltiples estudios han demostrado que los osteoprogenitores adherentes al implante forman hueso fácilmente^{12,23}. La matriz cálcica depositada mediante las células osteogénicas produce la

INTRODUCCIÓN

formación de hueso nuevo y trabeculado proporcionando y aumentando la fijación biológica del implante al hueso ²⁴.

Múltiples señales están involucradas en la inducción del linaje osteoblástico. Sin embargo, existen dos “interruptores moleculares esenciales” para la formación de osteoblastos, los factores de transcripción RUNX2 y OSTERIX (SP7). Por lo tanto, la regulación positiva de estos factores osteoinductivos impulsa la formación ósea y su expresión se observa en células adherentes al implante. Otros mediadores importantes de la osteogénesis incluyen la vía de señalización de la proteína morfogenética ósea (BMP), la vía de señalización del sitio de integración relacionado con Wingless (Wnt) y la vía de señalización de la hormona paratiroidea (PTH), entre otras. Además, las proteínas adhesivas de la matriz extracelular elaboradas en la superficie del implante también influyen en la osteogénesis. Todas parecen ser activas en el proceso de osteointegración ⁷.

En las células osteoprogenitoras en la superficie del implante, durante las fases tempranas de la osteointegración, aumenta la actividad de *Runx2* y *Osterix* y la formación ósea directa ²⁵. Además, los fenómenos de mejora de la superficie del implante favorecen tanto la síntesis de BMP como de los componentes de la vía de Wnt ⁷.

Las BMP son inductores primarios de la diferenciación osteoblástica y se expresan en células adherentes al implante; la topografía superficial mejorada se asocia con una mayor expresión de BMP ²⁶.

Hay varios ligandos de Wnt que son activos en el proceso de osteointegración y, en última instancia, activan otro factor de transcripción, la β -catenina. La topografía superficial mejorada a escala micrométrica/nanométrica aumenta la expresión de proteínas Wnt que producen la activación de la β -catenina para promover la diferenciación de osteoblastos y

la formación ósea entre las células osteoprogenitoras adherentes al implante. Por ejemplo, Wnt3A parece activar células locales que contribuyen a la osteointegración y Wnt5a y Wnt11 también contribuyen funcionalmente ¹⁶.

Finalmente, la formación ósea cesa en un proceso controlado. Una proteína producida por los osteocitos que inhibe la osteogénesis es la esclerostina. La esclerostina es expresada por las células adherentes al implante y aumenta en ausencia de estabilidad primaria. Los anticuerpos contra la esclerostina se utilizan terapéuticamente para bloquear su efecto amortiguador sobre la osteogénesis, mejorando así la formación ósea ²⁷.

3. BIOLOGÍA DEL TEJIDO ÓSEO

El sistema musculoesquelético proporciona el andamiaje físico para el cuerpo de los mamíferos. Los huesos del esqueleto humano proporcionan sitios de unión para músculos, tendones y ligamentos, lo que permite la locomoción. Los huesos también contienen los microambientes para que se produzca la hematopoyesis adulta. El papel crucial del hueso en la fisiología de los mamíferos se destaca aún más por la capacidad única del cuerpo para reparar el hueso a través de la regeneración, restaurándolo a un estado completamente funcional, previo a la lesión. Los estudios han demostrado que un equilibrio regulado de actividad entre los osteoblastos formadores de hueso y los osteoclastos, que reabsorben el hueso, es responsable de esta capacidad de reparación ²⁸.

Para comprender la relación que se establece entre un implante dental y el tejido óseo que lo rodea, es necesario comprender la anatomía y la biología del hueso, su funcionamiento, su respuesta y como interfieren sus células para

que ocurra la osteointegración del implante y su mantenimiento estable a lo largo del tiempo.

3.1. FENÓMENOS DE OSIFICACIÓN

3.1.1. Osificación endocondral:

Los huesos axiales y apendiculares se forman a través de la osificación endocondral (Figura 3) ²⁹. En este proceso, se genera una plantilla de cartílago (anlagen) del futuro hueso que contiene condrocitos, y las células que rodean a los condrocitos forman el pericondrio, que define el borde de la plantilla. En este proceso de osificación, los condrocitos experimentan hipertrofia formando cartílago hipertrófico que se mineraliza y luego se convierte en hueso. Esto ocurre en los sitios de osificación primaria y secundaria de los huesos largos en desarrollo, y en las placas de crecimiento del cartílago ubicadas en los extremos de los huesos largos ³⁰⁻³¹.

SOX9 es el factor de transcripción maestro para el compromiso de diferenciación de las células mesenquimales en osteocondroprogenitores y posterior diferenciación en condrocitos. Poco después de la condensación mesenquimal, SOX9, junto con SOX5 y SOX6, favorecen la expresión de genes del cartílago, incluyendo genes específicos de la matriz como *Col2a1* y *Acan* (Agregano), y facilitan la proliferación de condrocitos. Aunque la expresión de *Sox9* es necesaria para establecer la diferenciación mesenquimal, el compromiso de los osteocondroprogenitores hacia el linaje osteogénico requiere la regulación negativa de *Sox9* y la regulación positiva de *Runx2* ³².

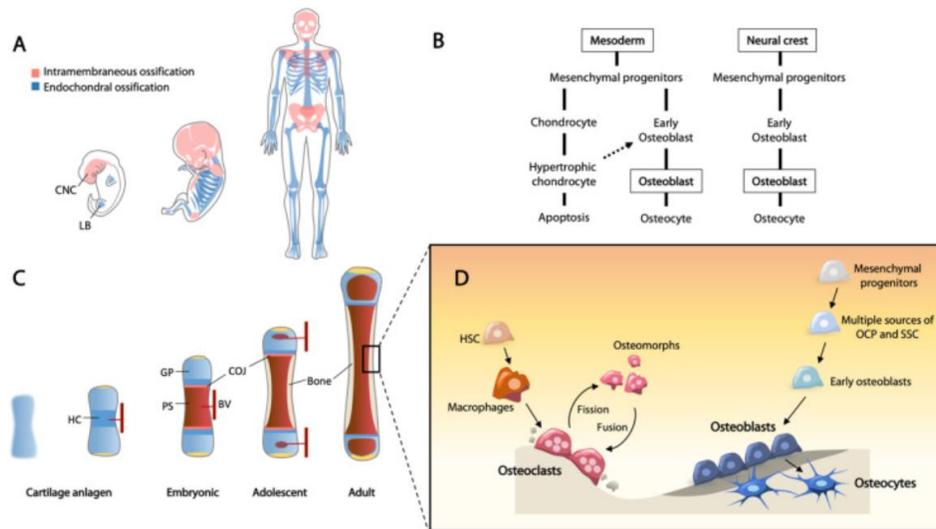


Figura 3

Fenómeno de osificación y de remodelación ósea. A: Osificación intramembranosa y osificación endocondral. B: Rutas principales de diferenciación osteogénica. C: Osificación endocondral en los huesos de las extremidades (Chan et al ²⁹).

La hipertrofia de los condrocitos representa el inicio de la osificación endocondral, un proceso regulado por una regulación positiva de la expresión de *Runx2* y *Col10a1*, concomitante con una regulación negativa de *Atf4*. Las células pericondriales adyacentes a los condrocitos hipertróficos se diferencian en osteoblastos y secretan matriz extracelular formando el collar óseo perióstico. El centro de osificación primaria se forma entonces dentro de la región hipertrófica, que es la primera zona de mineralización del anágeno del cartílago ²⁹.

En la unión condroósea, los condrocitos hipertróficos dirigen una invasión de los vasos sanguíneos a través de la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Los vasos sanguíneos infiltrados facilitan el reclutamiento de osteoclastos para degradar el cartílago

INTRODUCCIÓN

mineralizado y de osteoprogenitores para iniciar la osteogénesis, formando la esponjosa primaria con el establecimiento del cartílago de la placa de crecimiento en los extremos epifisarios de los huesos largo. En la placa de crecimiento, una zona proliferativa precede a la hipertrofia ²⁹.

Aunque la apoptosis y el reemplazo por hueso han sido ampliamente considerados como el destino terminal de los condrocitos hipertróficos, estudios recientes han demostrado que los condrocitos hipertróficos retienen la plasticidad del potencial multilinaje para diferenciarse en osteoblastos, adipocitos, pericitos y células del estroma. Los osteoblastos derivados de condrocitos hipertróficos desempeñan funciones esenciales en el mantenimiento de la homeostasis ósea y la curación de fracturas. Estos datos respaldan que los osteoblastos se pueden formar de dos maneras, directamente diferenciados de los osteocondroprogenitores o mediante condrogénesis antes del estado osteoblástico ³³⁻³⁴.

Además de las zonas proliferativas e hipertróficas, existe una zona de reserva que contiene en su mayoría condrocitos que no se dividen y que sirven para proporcionar una fuente de células a la zona proliferativa. Estudios recientes sugirieron que la placa de crecimiento es un nicho importante que alberga células madre esqueléticas (SSCs). Estas SSCs son multipotentes y pueden dar lugar a condrocitos, osteoblastos y adipocitos en condiciones de diferenciación específicas ³⁵⁻³⁶.

3.1.2. Osificación aposicional:

El crecimiento óseo radial se logra mediante el modelado óseo durante el período de crecimiento óseo activo. El control hormonal y la carga mecánica juegan papeles importantes en este proceso. El crecimiento óseo aposicional es el aumento en el grosor de los huesos por la adición de tejido

INTRODUCCIÓN

óseo de la médula (endosteal) o la superficie perióstica de los huesos. Este engrosamiento y aumento de la masa ósea continúa en la vida posnatal, alcanzando un pico en humanos alrededor de los veinte-treinta años de edad³⁵⁻³⁷. Los osteoprogenitores o las células madre esqueléticas se transforman en osteoblastos y son partícipes de este crecimiento, así como a los procesos de reparación y remodelación. Los osteoblastos son las células responsables de la deposición y calcificación de la matriz ósea. Estas células producen componentes de la matriz extracelular como el colágeno tipo I, la osteopontina y la fosfatasa alcalina, que ayuda al proceso de mineralización y la deposición de cristales de hidroxiapatita durante la formación ósea²⁹.

La señalización WNT/ β -catenina es una vía crucial en la maduración de los osteoblastos. La eliminación de β -catenina de los precursores osteoblásticos provoca la detención su diferenciación en osteoblastos. Estudios recientes han evidenciado in vivo que la señalización WNT determina que los progenitores mesenquimales se comprometan con el linaje osteoblástico, así como la transición de los condrocitos hipertróficos a osteoblastos²⁹.

Con el crecimiento aposicional, una fracción de los osteoblastos maduros se convierten en células inactivas que recubren la superficie del hueso, mientras que los osteoblastos activos se incrustan en la matriz ósea calcificada y se diferencian en osteocitos como parte de la red canalicular osteocítica. Los osteocitos se consideran células diferenciadas terminalmente que mantienen la homeostasis esquelética. Estas células residen en lagunas y se comunican entre sí a través de canalículos dendríticos para regular la homeostasis del calcio y el fósforo. Los osteocitos producen y transportan esclerostina (*SOST*) a través de los canalículos a los osteoblastos en la superficie ósea, como un regulador negativo de la formación ósea a través de

INTRODUCCIÓN

la unión a los correceptores LRP5/6, inhibiendo la señalización de WNT. La desregulación de la formación y el mantenimiento óseo da como resultado una amplia gama de enfermedades comunes como la osteoporosis y la osteogénesis imperfecta ³⁸.

3.2. FACTORES REGULADORES IMPLICADOS EN LA OSTEOGÉNESIS

La formación de hueso funcional durante el desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis ósea en adultos depende de la activación espacio-temporal de factores de transcripción osteogénicos. En el grupo de factores de transcripción que controlan los osteoblastos se incluyen varias proteínas: Smads, CCAAT/proteínas de unión potenciadoras β (C/EB β), C/EBP δ , factor potenciador linfático (efector Wnt), Twist, Runx1/Cbfb, factor de transcripción activador 4 (ATF4), Runx2 y Osterix, de los cuales los cuatro últimos son los principales factores de transcripción que funcionan dentro de la diferenciación osteoblástica (Figura 4) ³⁹.

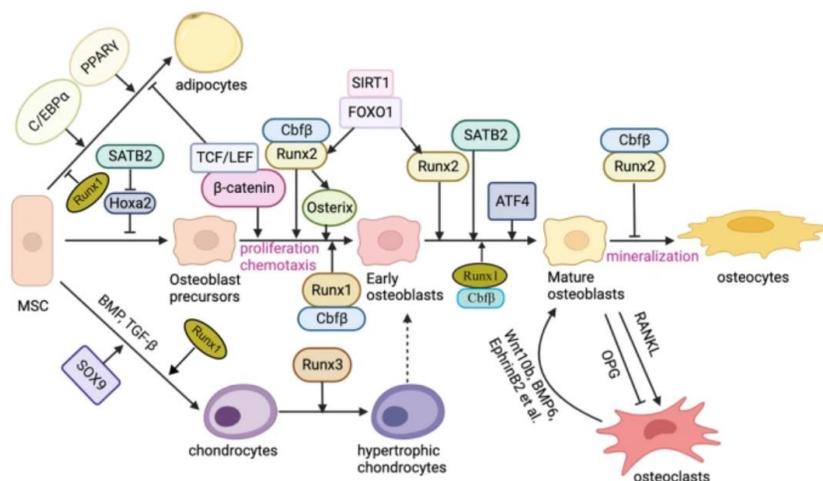


Figura 4.

Factores de transcripción implicados en la diferenciación hacia los distintos linajes celulares de las MSC (Zhu et al., ³⁹).

INTRODUCCIÓN

Los moduladores transcripcionales que funcionan como "interruptores maestros" coordinan la transformación de las MSC en tipos de células específicas de tejido. *Runx2* es fundamental en la formación ósea. Durante la diferenciación, desempeña un papel importante en la regulación del crecimiento celular y la activación o represión de los genes. Aunque la diferenciación osteoblástica se basa principalmente en *Runx2* y *Osterix*, otros genes importantes como *Runx1* y *Cbfb* también son necesarios para la diferenciación ³⁹.

RUNX2 (factor de transcripción relacionado con runt 2) es un factor de transcripción de la familia RUNT que se expresa en la etapa tardía de condensación mesenquimal en el desarrollo esquelético y en células progenitoras osteocondrales, actuando como un regulador maestro de la osteogénesis. Su expresión es necesaria para la diferenciación de osteoblastos y odontoblastos y regula muchas expresiones genéticas relacionadas con los huesos y los dientes. *Runx2* determina el linaje de osteoblastos y odontoblastos a partir de células mesenquimales. Su expresión es crucial para la diferenciación osteoblástica de los progenitores del pericondrio y la maduración del collar óseo. Los ratones deficientes en *Runx2* mueren al nacer debido a insuficiencia respiratoria y la formación ósea se ve gravemente afectada ⁴⁰.

RUNX2 tiene un dominio de activación que activa los genes de osteocalcina y COL1A1, además de un dominio de unión al ADN conservado. *Runx2* es un marcador temprano esencial para la diferenciación osteoblástica, indicado por el momento relativo de su expresión. En la etapa en la que las MSC se diferencian por primera vez en células precursoras de osteoblastos antes de transformarse en osteoblastos inmaduros, la expresión de *Runx2* se

INTRODUCCIÓN

regula positivamente. Sin embargo, en las etapas finales de la diferenciación y formación de osteoblastos, la expresión de *Runx2* disminuye gradualmente ³⁹.

La expresión de *Runx2* alcanza su pico en preosteoblastos/osteoblastos inmaduros y disminuye en osteoblastos maduros, lo que indica su papel esencial en la diferenciación temprana. En el linaje divergente de osteocondroprogenitores, la regulación negativa o la supresión de la expresión de *Runx2* es necesaria para la condrogénesis y cuando estos condrocitos sufren hipertrofia, *Runx2* se regula positivamente nuevamente. El segundo aumento de expresión de *Runx2* parece estar involucrado en la transición de condrocitos hipertróficos a osteoblastos ⁴¹⁻⁴².

Numerosos coactivadores transcripcionales interactúan con RUNX2. Cbfb es el más importante, porque puede unirse a las proteínas de la familia Runx para formar heterodímeros, mejorando la estabilidad de RUNX2 y posteriormente facilitando la unión de RUNX2 a las secuencias de ADN diana. Cbfb protege a RUNX2 restringiendo la ubiquitinación, evitando así su degradación y promoviendo aún más la expresión de genes específicos de osteoblastos. Cbfb también es crucial para estimular la osteogénesis al inhibir la expresión del gen regulador de la adipogénesis C/EBP α y activar la señalización de Wnt10b/ β -catenina ³⁹.

RUNX2 también puede promover la expresión génica al interactuar con el factor similar a Elf-1 mieloide (MEF) y unirse a un promotor de marcadores de osteoblastos, como OPN, cerca de MEF. La presencia de estos dos elementos de respuesta a factores de transcripción (RRE y ERE) cerca de la región proximal del promotor es necesaria para que MEF y RUNX2 funcionen en el promotor de genes marcadores óseos. Al acercarse a estos dos elementos, MEF y RUNX2 muestran efectos sinérgicos significativos en la actividad del

INTRODUCCIÓN

promotor. MEF y RUNX2 afectan sinérgicamente a los promotores de OPN, OCN y ALP³⁹.

La osteocalcina (OC) es la proteína de matriz ósea no colágena más abundante y se transcribe a partir de *Bglap* y *Bglap2*, cuyas expresiones están reguladas directamente por *Runx2*. Los ratones deficientes en *Bglap* y *Bglap2* tienen una masa ósea, formación ósea y resorción ósea normales. Aunque las fibras de colágeno corren a lo largo de la dirección longitudinal del hueso largo en ratones de tipo salvaje y los deficientes en *Bglap/Bglap2*, la orientación de los cristales de apatita, que es paralela a las fibras de colágeno en los ratones de tipo salvaje, se altera notablemente en los ratones *Bglap/Bglap2*^{-/-}, y la resistencia ósea se reduce. Por lo tanto, la osteocalcina es necesaria para la alineación de los cristales de apatita paralelos a las fibras de colágeno⁴³.

Osterix (*Osx*), también conocido como SP7, es un factor de transcripción específico de osteoblastos que pertenece a la familia similar a Krüppel. Se ha confirmado que *Osx* está involucrado en la diferenciación, maduración y actividad de los osteoblastos⁴⁴. *Osx* tiene funciones en las últimas etapas de la osteogénesis y la maduración, controlando la maduración a osteoblastos funcionales y una mayor diferenciación a osteocitos. La eliminación de *Osx* en ratones conduce a la letalidad neonatal debido al déficit de formación ósea general, malformación grave de la caja torácica y la falta de expresión de genes de osteoblastos como *Sparc* y *Spp1*. La inactivación posnatal de *Osx* da como resultado una acumulación anormal de cartílago, ausencia de hueso trabecular y maduración deteriorada de los osteocitos.

Parece que *Osx* actúa aguas debajo de *Runx2*, ya que no se expresa en osteoblastos deficientes en *Runx2*, mientras que la expresión de *Runx2* se observa en osteoblastos deficientes en *Osx*. Por lo tanto, durante la

INTRODUCCIÓN

especificación del linaje osteogénico, *Runx2* promueve la diferenciación de progenitores mesenquimales, iniciando la osteogénesis, y *Osx* apoya la maduración de osteoblastos funcionales. El papel esencial de *Osx* se atribuye además a su regulación de marcadores de osteoblastos como *Dkk1*, un antagonista importante de la señalización WNT/ β -catenina. Por lo tanto, existe una relación integral entre *Runx2* y *Osx* en comunicaciones complejas entre varios reguladores en células óseas en el desarrollo óseo y la homeostasis ⁴⁴.

3.3. VÍAS BIOLÓGICAS IMPLICADAS EN LA OSTEOGÉNESIS

Como se ha descrito hasta ahora, existen múltiples diseños de biomateriales que tratan de mejorar la osteogénesis. Entender cómo los diferentes parámetros de diseño inducen la osteogénesis es crucial para desarrollar los biomateriales más óptimos para la regeneración ósea. Una característica de estos biomateriales es su profunda influencia en la forma celular, provocando una arquitectura alterada del citoesqueleto y de las integrinas. Las alteraciones de la forma celular inducidas por los biomateriales coinciden con otros eventos de señalización externa cruciales para la osteogénesis, como la señalización del factor de crecimiento TGF- β /BMP, WNT, NOTCH, Ca^{2+} /Pi y la señalización NF- κ B. Además, también intervienen la señalización de YAP y de la integrina ⁴⁵.

3.3.1. Vía de señalización TGF- β /BMP

La señalización de TGF- β y BMP desempeña un papel importante en la formación adecuada de los huesos, el crecimiento y la posterior homeostasis celular. La señalización de TGF- β y BMP se inicia cuando estos factores de crecimiento se unen a sus respectivos receptores en la membrana celular. Después de esto, se inicia una cascada de eventos de fosforilación en los

INTRODUCCIÓN

complejos SMAD. Los complejos SMAD son transportados al núcleo, uniéndose a regiones promotoras específicas. La importancia de la señalización de TGF- β y BMP se destaca por la observación de que las mutaciones en los genes responsables de estas cascadas de señalización conducen a defectos óseos. Además, la señalización de BMP-2 es esencial en los fenómenos de reparación ósea al iniciar la curación de las fracturas ⁴⁶.

Un mecanismo molecular bien conocido y crucial relacionado con la señalización de BMP es la capacidad de regular la expresión de la homeobox 5 distal-less (DLX5), que posteriormente interactúa con regiones potenciadoras del factor de transcripción relacionado con runt 2 (RUNX2). RUNX2 y su control sobre genes asociados como osterix (OSX) y osteocalcina (OCN) son esenciales para la osteogénesis. En este contexto, se sabe que TGF- β influye directamente en la expresión de RUNX2, mientras que también se sabe que las proteínas SMAD forman complejos con RUNX2 para dirigir la actividad transcripcional ⁴⁷.

Además del efecto de las propiedades mecánicas intrínsecas del biomaterial, existen efectos similares del estiramiento mecánico en la secreción del factor de crecimiento y la expresión del receptor. BMP-2 se utiliza ampliamente para mejorar la reparación ósea después de una lesión; sin embargo, los efectos no deseados asociados con las dosis suprafisiológicas que se utilizan comúnmente son fenómenos bien conocidos. Al utilizar fuerzas biomecánicas que mejoran la eficacia de BMP-2, puede ser posible reducir la cantidad de BMP-2 necesaria para lograr un resultado clínico satisfactorio. De hecho, se ha demostrado que los osteoblastos expuestos a estimulación mecánica demuestran una fosforilación de SMAD mejorada en condiciones de estimulación con BMP-2. De manera similar, existe evidencia de que la vía TGF- β puede modificarse mediante estimulación mecánica ⁴⁸.

INTRODUCCIÓN

Cuando las células osteoblásticas se exponen a cultivos in vitro, las características del biomaterial y las características externas no reflejan la fisiología de las condiciones in vivo. Se sabe que las propiedades de los biomateriales, como rugosidad y microestructuras, alteran el perfil de secretoma de las células, lo que permiten alteraciones en las señalizaciones autocrinas o paracrinas. Una consideración adicional es el uso de estímulos biomecánicos. Como se mencionó anteriormente, se sabe que las propiedades de los biomateriales, como la rugosidad y las microestructuras, alteran el perfil del secretoma de las células, lo que produce alteraciones en la señalización autocrina o paracrina ⁴⁹.

Además, la sensibilidad de las células a las señales solubles puede verse afectada por biomateriales que modulan la expresión del receptor del factor de crecimiento o por otros medios. Además del efecto de las propiedades mecánicas intrínsecas del biomaterial, los estiramientos mecánicos a los que se somete el biomaterial también modulan la secreción del factor de crecimiento y la expresión del receptor. Por ejemplo, la BMP-2, que es utilizada ampliamente para mejorar la reparación ósea después de una lesión, tiene efectos no deseados asociados con dosis suprafisiológicas. Al utilizar fuerzas biomecánicas que mejoran la eficacia de BMP-2, puede ser posible reducir la cantidad de BMP-2 necesaria para lograr un resultado clínico satisfactorio ⁵⁰.

Otro ejemplo son los osteoblastos expuestos a estimulación mecánica, los cuales demuestran una fosforilación de SMAD mejorada en condiciones de estimulación con BMP-2. La vía TGF- β también puede modificarse mediante estimulación mecánica ⁵¹. Los receptores BMP y TGF- β pueden regularse positivamente tanto en superficies de titanio micro-rugosas como nano-rugosas ⁴⁵.

INTRODUCCIÓN

Las propiedades estructurales de los biomateriales, incluida su estructura superficial (sub)micrométrica, son importantes para el rendimiento clínico de los dispositivos médicos ortopédicos y los sustitutos de injertos óseos. Existe evidencia de que este efecto podría estar relacionado con la modificación de la señalización de BMP y de la producción de TGF- β . Junto con el aumento de los niveles de expresión, las nanotopografías pueden influir en la actividad del receptor al mejorar la colocación de las integrinas con los receptores BMP-2. Además, los genes diana de BMP, como Runx2, se regulan positivamente de forma notable después de la estimulación con BMP-2 de células cultivadas en estas superficies nanoestructuradas en comparación con las superficies planas.

En resumen, la sensibilidad de las células al TGF- β y BMP se puede modificar controlando las propiedades de los biomateriales, como sus propiedades estructurales y mecánicas, y ejerciendo estimulación mecánica sobre las células. Esto se logra mediante múltiples mecanismos, como se muestra en la co-localización del receptor de integrina/BMP o la expresión del receptor de BMP y TGF- β . Además, los biomateriales pueden estimular la secreción de TGF- β y BMP, lo que conduce a una mejor señalización autocrina ⁴⁵.

3.3.2. Vía de señalización de Wnt

La vía de señalización de Wnt se conserva evolutivamente y controla el mantenimiento de la homeostasis tisular. La vía de señalización de Wnt se puede clasificar en dos vías principales: la vía canónica (también denominada vía Wnt/ β -catenina), que depende de la actividad de la β -catenina, y la vía no canónica (que consiste en la vía Wnt/PCP y la vía Wnt/Ca²⁺), que opera independientemente de la actividad de la β -catenina. La vía de señalización

canónica de Wnt es esencial para el desarrollo óseo normal, la homeostasis y la regeneración ⁴⁸. Es interesante destacar que existe una fuerte comunicación cruzada entre la señalización de Wnt y BMP, ya que ambas actúan sobre RUNX2. La β -catenina puede influir en la expresión de RUNX2 mediante la unión del factor de transcripción FHL2. Además, la señalización Wnt/ β -catenina puede impulsar la expresión de la fosfatasa alcalina (ALP) a través de RUNX2. La señalización de Wnt es importante para la diferenciación osteogénica de las MSC, mantenimiento fenotípico de los osteoblastos y la diferenciación de osteoclastos.

Como ocurre para la vía de señalización TGF- β /BMP, la señalización Wnt también puede verse influenciada mediante el control de las propiedades de los biomateriales. Los micropits, las estructuras superficiales, las islas adhesivas y los materiales que promueven la formación de esferoides aumentan la expresión de ligandos Wnt u otros componentes de la vía Wnt, influyendo así en la actividad de la vía. La rugosidad, las estructuras superficiales y los cambios en la química que alteran la unión de integrinas y la formación de FAK influyen directamente en la actividad de β -catenina. Teniendo en cuenta la importancia de la señalización de Wnt en procesos biológicos como la diferenciación osteogénica, la aplicación de biomateriales que modifiquen adecuadamente esta vía puede ser útil en un contexto de regeneración ósea ⁴⁵.

3.3.3. Vía de señalización YAP/TAZ

La vía YAP/TAZ también desempeña un papel importante en la diferenciación osteogénica. TAZ coactiva la transcripción génica dependiente de RUNX2, mientras que reprime la adipogénesis al reducir la transcripción génica dependiente del receptor activado por el proliferador de peroxisomas

(PPAR) γ ⁵². Otros estudios también respaldan una interacción entre TAZ y RUNX2 y su efecto positivo sobre la osteogénesis⁵³. Por lo tanto, el control de la actividad de TAZ es una consideración esencial en los protocolos de diferenciación osteogénica. Además de TAZ, YAP también exhibe efectos positivos en la inducción osteogénica a través de la interacción con β -catenina⁵⁴.

3.4. REMODELADO ÓSEO

El tejido óseo tiene una estructura macroporosa mineralizada con componentes a escala nanométrica que determinan su resistencia. La hidroxiapatita inorgánica (HAp) constituye la mayor parte del componente mineralizado. La matriz extracelular orgánica (ECM) se compone predominantemente de colágeno tipo I y células óseas: células progenitoras osteogénicas, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos.

El tejido óseo se encuentra en un proceso continuo de remodelado, de manera que el tejido óseo viejo es reabsorbido por los osteoclastos y se produce tejido óseo de novo por los osteoblastos. Existe evidencia de que los osteocitos actúan como mecanosensores y orquestadores de este proceso de remodelación ósea⁵⁵.

La remodelación ósea es un proceso muy complejo mediante el cual se reemplaza hueso viejo por hueso nuevo, en un ciclo compuesto por tres fases: el inicio de la resorción ósea por parte de los osteoclastos, el período de reversión de la reabsorción a la formación de hueso nuevo y la formación ósea por parte de los osteoblastos. Este proceso ocurre debido a las acciones coordinadas de osteoclastos, osteoblastos, osteocitos y células de revestimiento óseo que juntas forman la estructura anatómica temporal llamada unidad multicelular básica (BMU)⁵⁶.

INTRODUCCIÓN

Es fundamental el equilibrio entre la formación y la reabsorción ósea y depende de la acción de varios factores locales y sistémicos, incluidas hormonas, citocinas, quimiocinas y estimulación biomecánica ⁵⁶.

3.4.1. Linajes celulares del tejido óseo

Los linajes celulares que intervienen en la estructura ósea y están implicadas en su remodelación son los osteoblastos, los osteocitos, los osteoclastos y las células madre y osteoprogenitoras (Figura 5).

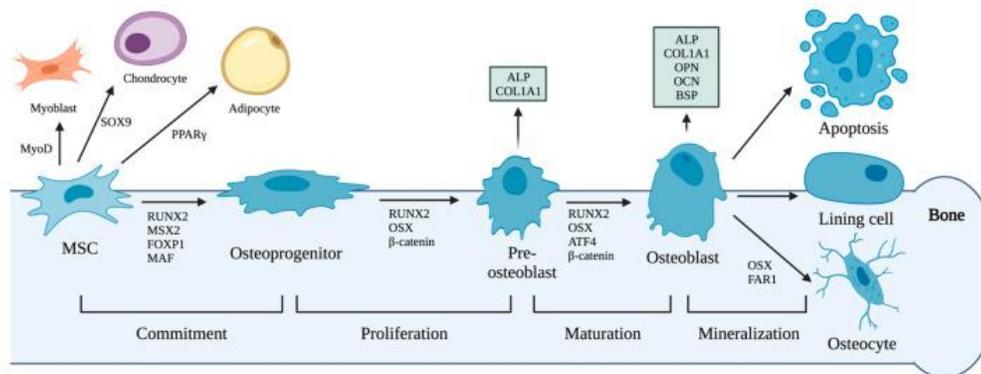


Figura 5

Diferenciación del linaje osteoblástico (Kitaura et al ⁵⁶).

- Osteoblastos:

Los osteoblastos son las principales células responsables de la formación ósea. Secretan una sustancia denominada osteoide, componente orgánico de la matriz, constituido por colágeno tipo I, osteopontina, osteocalcina y fosfatasa alcalina. La deposición de calcio, en forma de hidroxapatita, con el colágeno tipo I, proporciona soporte estructural al esqueleto ²⁸. Estas células, debido a su función, tienen en su citoplasma un

INTRODUCCIÓN

abundante retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi prominente, así como varias vesículas secretoras ⁵⁷.

Son derivadas de las células madre mesenquimales (MSC). El compromiso de MSC con el linaje osteoprogenitor requiere la expresión de genes específicos, siguiendo pasos programados como son la síntesis de proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y miembros de las vías Wingless (Wnt). Las expresiones de los factores de transcripción relacionados con Runt 2 (RUNX2), y Osterix (OSX o SP7) son cruciales para la diferenciación de osteoblastos. Además, Runx2 es un gen maestro de la diferenciación de los osteoblastos.

La especialización de los osteoblastos hacia el linaje esquelético se puede dividir en tres etapas: osteoprogenitor, preosteoblasto y osteoblasto. Inicialmente, la expresión del factor de transcripción SOX9 marca el compromiso con una célula osteoprogenitora. La expresión posterior del factor RUNX en la célula osteoprogenitora significa el compromiso con un preosteoblasto. Durante la etapa de maduración, la señalización de WNT- β -catenina actúa sobre los preosteoblastos para inducir la expresión de OSX, que define la diferenciación de la célula a un osteoblasto. En última instancia, la expresión de RUNX2 y OSX marca el compromiso con un osteoblasto maduro ^{28,58}. Esta etapa se caracteriza por la expresión de los genes de colágeno tipo 1 *Colla1* y *Colla2*.

Las células comienzan a producir la matriz extracelular (ECM) rica en colágeno, el principal componente orgánico del hueso. La fosfatasa alcalina no específica del tejido (TNAP) también se induce en esta etapa, como iniciadora de la mineralización de la ECM. A medida que los osteoblastos maduran, también comienzan a secretar proteínas adicionales, importantes en la maduración de la matriz, como la osteocalcina (OCN), una proteína muy

INTRODUCCIÓN

abundante en la ECM cuya función sigue siendo controvertida pero puede estar involucrada en la orientación de los cristales de hidroxiapatita ⁵⁹.

Existen tres destinos potenciales para los osteoblastos maduros: muerte por apoptosis, transformación en células de revestimiento óseo o mayor diferenciación en osteocitos, pero no se conoce el mecanismo por el cual se determina el destino de un osteoblasto en particular. Sin embargo, los osteoblastos determinados a convertirse en osteocitos están incrustados dentro de la matriz extracelular ósea en un proceso activo que requiere la escisión proteolítica de la matriz de colágeno. Durante este proceso, las células en transformación comienzan a proyectar extensiones celulares, inicialmente polarizadas hacia el frente de mineralización pero luego también dirigidas hacia la superficie ósea. Las células en esta etapa de diferenciación se han denominado osteocitos osteoides u osteocitos inmaduros, ya que asumen la morfología dendrítica característica de los osteocitos pero aún no están rodeadas de hueso mineralizado. Uno de los primeros marcadores que expresan los osteocitos en esta etapa intermitente es E11/podoplanina (también conocida como GP38), que ha demostrado estar involucrada en la remodelación del citoesqueleto y la elongación de las dendritas ⁵⁹.

Los osteocitos representan la mayoría de las células que se encuentran en el hueso mineralizado maduro y coordinan el mantenimiento óseo a través de interacciones entre osteoblastos y osteoclastos. El proceso de mantenimiento óseo es sensible a las fuerzas mecánicas. Durante la descarga mecánica, los osteocitos expresan el ligando del activador del receptor del factor nuclear- κ B (RANKL), que promueve la resorción ósea a través de la activación de los osteoclastos. Por el contrario, en respuesta a la carga mecánica, los osteocitos disminuyen la expresión de la proteína 1 relacionada con Dickkopf (DKK1) y la esclerostina, lo que conduce a una mayor

INTRODUCCIÓN

formación ósea a través de la activación de la señalización WNT- β -catenina en los osteoblastos. Los osteocitos responden a señales hormonales y mecánicas para controlar estrictamente la remodelación ósea a través de vías de señalización ³⁸.

- Osteocitos:

Estas células comprenden el 90-95% de la totalidad de las células óseas, son las células más abundantes y longevas, con una vida útil de hasta 25 años. Se encuentran dentro de lagunas rodeadas de matriz ósea mineralizada, con una morfología dendrítica. Los osteocitos se derivan de las células madre mesenquimales a través de la diferenciación de osteoblastos. Pasan por cuatro etapas reconocibles: osteoide-osteocitos, preosteocitos, osteocito joven y osteocito maduro. Durante el desarrollo a partir de osteoblastos, los osteocitos sufren cambios morfológicos y ultraestructurales notorios, incluida la reducción de su tamaño la disminución de los orgánulos aumentando la proporción nucleo-citoplasma, coincidiendo con una disminución en la síntesis y secreción de proteínas ⁶⁰.

Los osteocitos secretan esclerostina (regulador negativo de la masa ósea) y FGF-23, regulador del metabolismo del fosfato. Además, los osteocitos pueden actuar como células mecanosensoriales, transformando la tensión mecánica en señalización química hacia las células efectoras (osteoblastos y osteoclastos). Por tanto, el osteocito juega un papel importante en la biología ósea, concretamente en el proceso de remodelación, ya que regula tanto la actividad de los osteoblastos como de los osteoclastos. La apoptosis de los osteocitos es una señal quimiotáctica de la reabsorción ósea osteoclástica. Y los osteocitos apoptóticos son engullidos por los osteoclastos en la reabsorción ⁶¹.

INTRODUCCIÓN

- Osteoclastos:

Los osteoclastos son células multinucleadas de gran tamaño cuya función principal es la resorción ósea. Estas células se originan a partir del linaje hematopoyético y se diferencian en osteoclastos maduros mediante la interacción del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y el RANKL. El M-CSF promueve la proliferación de precursores de osteoclastos, mientras que el RANKL promueve la diferenciación de precursores de osteoclastos a osteoclastos maduros. Durante la remodelación ósea, la osteoclastogénesis comienza con el reclutamiento de precursores de osteoclastos por osteocitos que expresan RANKL. La expresión de RANKL y M-CSF dentro del compartimento de la médula ósea inicia la diferenciación de precursores de osteoclastos a osteoclastos, lo que conduce al inicio de la remodelación ósea. En condiciones de homeostasis, la relación entre formación ósea y resorción ósea sigue un programa estrictamente controlado para garantizar la consistencia de la masa ósea. Por ejemplo, la liberación del factor de crecimiento transformante β (TGF β) activo y del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1) después de la reabsorción de la matriz ósea desencadena la diferenciación de osteoblastos para reemplazar la matriz reabsorbida con nueva matriz ósea. Un desequilibrio de este control conduce a la osteoporosis, la enfermedad más común asociada con la regulación positiva de la actividad de los osteoclastos, que ocurre cuando la resorción ósea excede la formación ósea ⁶².

- Células madre y osteoprogenitoras:

La diferenciación de los osteoblastos requiere una multitud de pasos desde que una célula madre se diferencia hasta convertirse en un osteoblasto maduro. Se ha demostrado que las células madre mesenquimales (MSC) y las células madre esqueléticas (SSC), por separado, dan lugar a osteoblastos; sin

INTRODUCCIÓN

embargo, la relación entre estas dos poblaciones de células madre no se ha determinado con precisión. A lo largo de la diferenciación de los osteoblastos, se expresan genes específicos para marcar su maduración en cada etapa durante el desarrollo y la reparación.

Las MSC, descubiertas por primera vez en la médula ósea, son una población de células madre multipotentes, no hematopoyéticas. Las MSC tienen la capacidad de diferenciarse en distintos tipos de células maduras de tejidos mesenquimales como hueso, cartílago y grasa. A través de la adición de factores exógenos, las MSC tienen la capacidad de ser dirigidas hacia un destino de diferenciación celular. Por ejemplo, la adición de dexametasona, fosfato de β -glicerol y ascorbato a MSC humanas favorece la diferenciación osteogénica.

Las células forman nódulos con mayor expresión de fosfatasa alcalina. RUNX2 y OSX son los principales factores de transcripción cuya activación compromete a las células con el linaje osteogénico. La expresión de RUNX2 está precedida por la regulación positiva de GLUT1, que resulta en una regulación de retroalimentación ⁶². GLUT1 es un transportador de glucosa, y su regulación positiva facilita una mayor captación de glucosa por las células.

Esta secuencia de eventos indica que la diferenciación de osteoblastos requiere una alta demanda de energía, que se satisface con un mayor transporte y captación de glucosa a través de la regulación positiva de GLUT1 ⁶³. Se ha demostrado que las MSC mantienen la expresión de genes característicos del desarrollo embrionario, como los genes Hox. Los genes Hox codifican factores de transcripción conservados evolutivamente que controlan el patrón esquelético.

4. UTILIZACION DE LAS CÉLULAS MADRE EN IMPLANTOLOGÍA ORAL

Las células madre pueden jugar un papel importante en los procesos biológicos de oseointegración y regeneración ósea relacionados con el tratamiento con implantes dentales ⁶⁴. Las células madre mesenquimales de médula ósea de rata (BMSC) cultivadas en láminas de matriz extracelular (ECM) regulan positivamente los niveles de expresión de los genes relacionados con la osteogénesis como la fosfatasa alcalina (ALP), la proteína morfogenética ósea 2 (BMP2) y el factor de transcripción relacionado con runt 2 (Runx2). *In vivo*, estas células demostraron una formación superior de hueso nuevo. Este estudio demuestra que las láminas de ECM derivadas de BMSC promueven la osteointegración *in vitro* e *in vivo* ⁶⁵.

Un estudio con células madre mesenquimales humanas (hMSC) obtuvo resultados muy concluyentes. La topografía de la superficie del implante influye en la morfología, migración y diferenciación de las células madre. La incorporación de una rugosidad macro, micro y nanométrica jerárquica en el titanio produce una morfología estrellada típica de los osteoblastos/osteocitos maduros, una migración rápida y aleatoria y una diferenciación osteogénica mejorada en las células madre mesenquimales sembradas. La literatura sugiere que la cobertura rápida de una superficie por parte de las células madre junto con la estimulación de la diferenciación ósea minimiza la posibilidad de formación de biopelículas al tiempo que aumenta la tasa de integración del dispositivo con el tejido óseo circundante ¹⁷.

Las células madre mesenquimales humanas derivadas de los dientes (d-hMSC) se han utilizado en distintas superficies tratadas de titanio (mecanizados, tratados con chorro de arena y grabados con ácido (SLA) con y sin medio de inducción osteogénica) para evaluar su comportamiento y su

INTRODUCCIÓN

papel en la osteogénesis local. Las d-hMSC mejoran la formación de hueso nuevo alrededor de un implante con el aumento reforzado del potencial osteogénico de las superficies tratadas con SLA ⁶⁶.

Las células humanas mesenquimales (MSC) se han utilizado para estudiar los posibles efectos beneficiosos del tratamiento de las superficies SLA de titanio con manganeso (Mn). La superficie tratada exhibió una función de MSC relacionada con la osteogénesis mejorada; mejoró los eventos celulares tempranos, incluida la propagación y la formación de adhesión focal, y promovió la diferenciación completa de las MSC humanas en osteoblastos maduros en la superficie del implante SLA ⁶⁷.

En otro estudio, las células mesenquimales de pulpa dental (DPSC) se cultivaron sobre superficies de titanio sometidas a diferentes tratamientos de postproducción para eliminar partículas de polvo adheridas a la superficie (con ácidos orgánicos o pulido electroquímico). Las superficies eran biocompatibles y adecuadas para procesos de adhesión y proliferación celular. Existían diferencias entre las distintas superficies con respecto al compromiso osteogénico de este tipo de células madre. Además, las proteínas implicadas en la adhesión y supervivencia celular, así como las citoquinas liberadas, se modulan de forma diferencial entre las diferentes superficies, lo que confirma la influencia dinámica del diseño interno y de los tratamientos de postproducción en la respuesta e interacción de las células DPSC hacia las superficies de titanio ⁶⁷.

5. LAS CÉLULAS MADRE AMNIÓTICAS EPITELIALES Y MESENQUIMALES

La membrana amniótica humana está compuesta por una capa de células epiteliales, de donde derivan las células madre amnióticas epiteliales

INTRODUCCIÓN

(hA ESCs) y una capa estromal, de donde derivan las células mesenquimales (hAMSCs). Estas células madre amnióticas tienen características de pluripotencialidad y su alta plasticidad les permite derivar en cualquier tejido originario de las 3 capas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo.

- Ventajas frente a otras células madre:

Sus características les confieren grandes ventajas sobre otras células madre, como capacidad de renovación, potencial de multidiferenciación, ausencia de tumorigenicidad, baja o nula inmunogenicidad, ausencia de preocupaciones éticas o legales y potentes efectos paracrinos, especialmente efectos inmunomoduladores. Todo esto las convierte en una fuente prometedora de células madre para la terapia celular en diversas enfermedades ⁶⁸.

La placenta está compuesta por la membrana amniótica, la placa coriónica, la decidua basal, las vellosidades coriónicas, los cotiledones/espacio interuilloso y los tabiques placentarios (Figura 6). Entre estos componentes placentarios, la membrana amniótica sirve como materia prima adecuada en terapia celular debido a su alto contenido de células. Las hAMSC derivadas del epiblasto y las hAESC derivadas del hipoblasto son dos tipos primarios de células madre en la membrana amniótica que son responsables de la producción de la matriz extracelular (ECM), diferentes citoquinas y factores de crecimiento. Las hAESC provienen de la capa más interna del amnios que entra en contacto directo con el líquido amniótico y el feto, mientras que las hAMSC se encuentran dispersas en la membrana ⁶⁹.

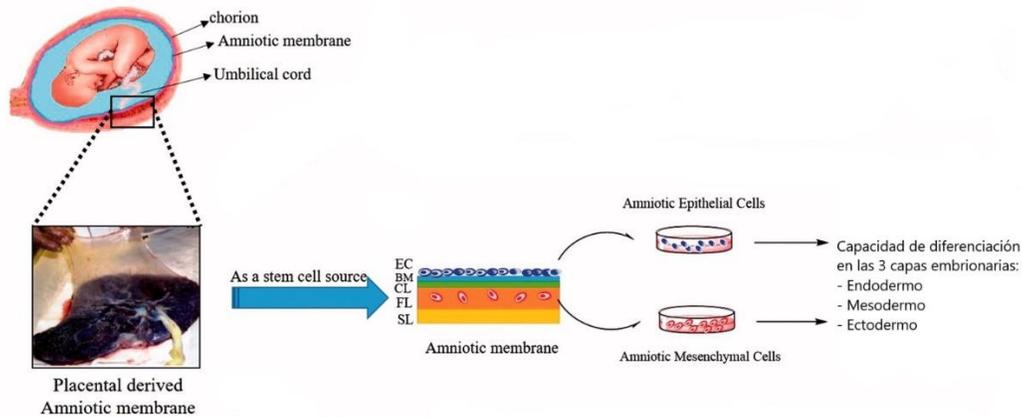


Figura 6
 Obtención de células humanas derivadas del amnios (hADSC).
 Se destaca la pluripotencialidad de estas células, que se pueden
 diferenciar en tejidos de las 3 capas embrionarias.
 (Riedel et al ⁶⁴)

En comparación con las células madre de otras fuentes, las células humanas derivadas del amnios (hADSC) tienen las siguientes ventajas:

1. Son fáciles de obtener, fuente abundante y sin disputas éticas y morales: como lo que queda después del nacimiento fetal, la membrana amniótica se puede utilizar para la separación de las hAMSC y las hAESC, sin que exista perjuicio para los donantes
2. Sin tumorigenicidad: Numerosos estudios han mostrado que las hADSC no proliferan ni crecen en agar blando in vitro, no forman colonias ni se forman teratomas después de implantar ratones NOD-SCID in vivo ⁷⁰.
3. Baja inmunogenicidad y alta histocompatibilidad: las hADSC se consideran células inmunológicamente privilegiadas y mostraron características notables de baja inmunogenicidad. Las hADSC poseen una baja expresión del antígeno principal de histocompatibilidad clase I (*HLA-ABC*) y β 2 microglobulina, ninguna expresión del antígeno principal de histocompatibilidad clase II (*HLA-DR*) y no expresan moléculas

INTRODUCCIÓN

coestimuladoras como CD80, CD86 y CD40 ⁷¹. Además, el trasplante de estas células no produce rechazo inmunológico, ni produce reacciones alérgicas, toxicidad o formación de tumores ⁷².

- Expresión de marcadores de superficie para su aislamiento:

Tanto las hAMSC como las hAESC expresan marcadores clásicos de células madre mesenquimales (MSC), como CD90, CD44, CD73 y CD105, y carecen de marcadores de superficie celular como CD45, CD34, HLA-CR, CD80, CD86.

- Elevada pluripotencialidad:

Las hADSC tienen el potencial de diferenciarse en las tres capas germinales cuando se exponen a factores de crecimiento o productos químicos exógenos. Tanto las hAMSC como las hAESC expresan los marcadores de superficie típicos de las células madre embrionarias, como SSEA-3, SSEA-4, SOX-2, TRA1-60 y TRA1-81 y especialmente, Oct-4 y Nanog, teniendo gran potencial de uso en medicina regenerativa. Hasta ahora, los estudios han demostrado que las hADSC pueden diferenciarse en multitud de linajes celulares, incluido el óseo ⁷³.

- Efectos inmunomoduladores e inmunosupresores:

Los factores solubles derivados de hAMSC, incluidos TGF- β , HGF, PGE2 eIDO y los contactos célula-célula inhiben la proliferación y producen la inmunosupresión de las células mononucleadas (PBMCs) ⁷⁴⁻⁷⁵. Además, las hADSC también tienen efectos inmunomoduladores e inmunosupresores sobre los procesos inflamatorios, entre ellos la reducción de las actividades de las células inflamatorias y la inhibición de la migración y el reclutamiento de células inmunitarias a los sitios de lesión ⁷⁶. Las hADSC también exhibieron

INTRODUCCIÓN

propiedades angiogénicas, citoprotectoras, anticicatrices y antibacterianas. Por lo tanto, es razonable creer que las hADSC pueden ser una fuente celular potencial para la terapia celular de enfermedades.

- Utilidad: terapia celular en enfermedades:

Las características inmunosupresoras e inmunoestimulantes tienen un papel clave en el tratamiento de varias enfermedades. Las hADSC secretan una variedad de factores de crecimiento, incluidas citocinas angiomoduladoras, péptidos antibacterianos y agentes antiinflamatorios, que presentan propiedades angiogénicas, citoprotectoras, inmunosupresoras, antiinflamatorias, anticicatrizantes y antibacterianas ⁷².

Las citoquinas y los exosomas derivados de las hADSC tienen un potencial importante para la reparación de diversas enfermedades (ginecológicas, nerviosas, pulmonares, hepáticas, cancerosas, dermatológicas, óseas, cardiovasculares, inflamatorias, renales, diabetes, enfermedades autoinmunitarias...), evitando las deficiencias del trasplante de células madre, como el rechazo inmunológico ⁷². Las hADSC tienen una fuerte capacidad para transdiferenciarse en distintos linajes celulares, lo que sugiere que en el futuro, la inducción de la diferenciación de las hADSC hacia un fenotipo óseo *in vitro* antes del trasplante será un método eficaz para el tratamiento de enfermedades dentales.

Varios estudios han demostrado que las hAMSC mejoran la diferenciación osteogénica de las células madre adiposas humanas (AdSC), las células madre mesenquimales de la médula ósea (BMSC) y promueven la formación de tubos de las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC). Cuando las hAMSC se co-cultivan con BMSC, la actividad ALP de las BMSC y la expresión de marcadores osteogénicos, incluyendo OCN y

INTRODUCCIÓN

Runx2, se regularon positivamente. Por el contrario, en el co-cultivo, las hAMSC revierten la inhibición de la diferenciación osteogénica inducida por estrés oxidativo causada por peróxido de hidrógeno ⁷⁷⁻⁷⁸.

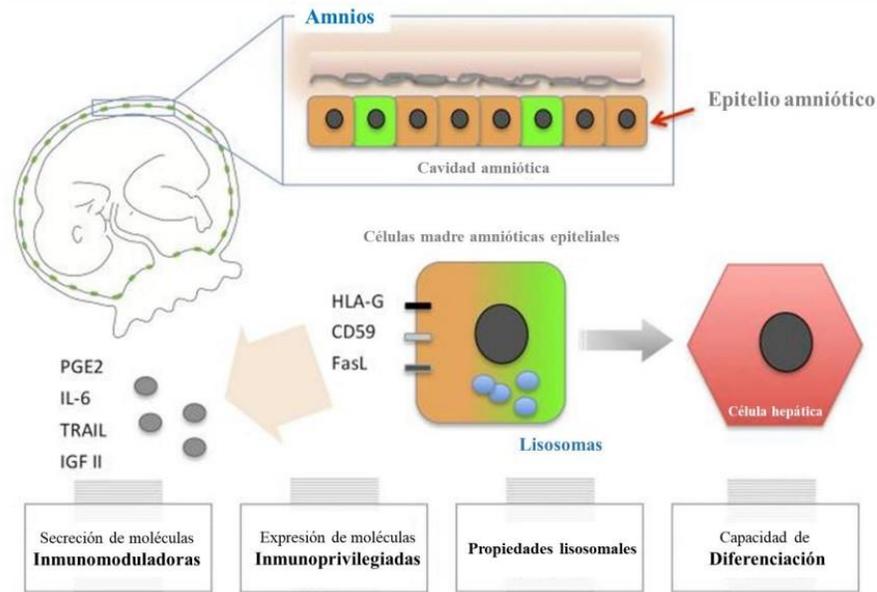


Figura 7

Células madre amnióticas. En la imagen se puede observar la capa de la placenta de donde son extraídas, sus principales marcadores de superficie, las principales citoquinas que liberan y sus principales características. (Liu et al. ⁷²)

Basándose en estos estudios *in vitro*, en un estudio se aplicaron hAMSC a modelos animales de defectos óseos. Este grupo de trabajo inyectó hAMSC intraperitonealmente en ratones que padecían osteogénesis imperfecta (OI). Los ratones trasplantados eran capaces de mejorar la calidad estructural ósea, la mineralización y la densidad ósea, regularon positivamente los genes relacionados con la osteogénesis y negativamente los asociados con la inflamación, TGF- β y la diferenciación osteoclástica ⁷⁹.

INTRODUCCIÓN

Se ha demostrado que las hAMSC aceleran la formación de hueso nuevo no solo en defectos óseos, sino promoviendo una rápida osteointegración de implantes dentales ⁸⁰. Aunque las células madre humanas amnióticas tienen una capacidad osteoblástica ligeramente inferior que otras células madre (hBMSC y hAFMSC), su mayor capacidad proliferativa y su menor rechazo inmunológico, las hace idóneas para su uso en aplicaciones de regeneración ósea ⁸¹.

- Regeneración ósea:

La cicatrización de fracturas es un proceso regenerativo complejo y bien orquestado que está coordinado por una variedad de tipos de células, incluidas células inflamatorias, células endoteliales vasculares, células madre mesenquimales (MSC) y fibroblastos. En las diversas etapas del proceso de curación ósea, la inflamación y la angiogénesis preceden a la osteogénesis, lo que indica que controlar la inflamación y promover la angiogénesis en una etapa temprana podría acelerar la formación ósea posterior y, en última instancia, la remodelación ósea ⁸².

- Neoformación ósea en implantes dentales:

Después de la disolución de la fase mineral, el osteoclasto (Oc) libera catepsina (Cp), metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9) y fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP) que degradan la matriz orgánica. EphrinB2 (Eph2) presente en la membrana de los osteoclastos se une a EphrinB4 (Eph4) en la membrana de osteoblastos (Ob), promoviendo la diferenciación de osteoclastos. La señalización inversa, EphrinB4/EphrinB2, inhibe la osteoclastogénesis. Sema4D producido por los osteoclastos inhibe a los osteoblastos, mientras que Sema3A secretado por los osteoblastos inhibe a los

INTRODUCCIÓN

osteoclastos. Los osteoblastos (Ob) también producen receptor activador del factor nuclear KB (RANKL) y osteoprotegerina (OPG), que aumentan y disminuyen la osteoclastogénesis, respectivamente. Los osteoblastos (Ob) secretan proteínas colágenas (Col1) y no colágenas como osteocalcina (OCN), osteopontina (OSP), osteonectina (OSN), sialoproteína ósea (BSP), y proteínas morfogenéticas óseas (BMP) ⁸³.

Los osteocitos (Ot) se encuentran dentro de lagunas rodeadas de matriz ósea mineralizada (B). Sus prolongaciones citoplasmáticas cruzan los canalículos para conectarse con otras prolongaciones de osteocitos vecinos mediante uniones gap, compuestas principalmente por Conexina 43 (Cx3), así como con prolongaciones citoplasmáticas de osteoblastos (Ob) y células de revestimiento óseo (BLC) en la superficie ósea. RANKL secretado por los osteocitos estimula la osteoclastogénesis, mientras que la prostaglandina E2 (PGE2), el óxido nítrico (NO) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) estimulan la actividad de los osteoblastos. Por el contrario, los osteocitos producen OPG que inhibe la osteoclastogénesis; además, los osteocitos producen esclerostina e inhibidor de la vía de señalización WNT de Dickkopf (DKK-1) que disminuyen la actividad de los osteoblastos ⁸³.

Con las proteínas de la matriz del trauma óseo, los factores de crecimiento que se almacenan en la matriz ósea se vuelven solubles y los vasos sanguíneos lesionados activan la proliferación del fibrinógeno para crear una primera matriz extracelular en el defecto ⁸³.

En la superficie del implante interactúan proteínas plasmáticas como la albúmina, las globulinas o la fibrina, este proceso de absorción de proteínas es muy efectivo, aumentando su concentración en la superficie en comparación con el medio acuoso circundante. Al ser la Albúmina la proteína con más alta concentración en la sangre es la primera que se une a la superficie y serán

INTRODUCCIÓN

reemplazadas lentamente por proteínas con una menor concentración, pero con una mayor afinidad por la superficie, como son la vitronectina o la fibronectina ⁸⁴.

Las plaquetas liberan factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF).

La angiogénesis es el requisito previo para la osteogénesis. El hueso nuevo se forma solo en estrecha conexión con los vasos sanguíneos. Primero se desarrolla el vaso sanguíneo y luego sigue el hueso, este proceso recibe el nombre de osteogénesis angiogénica ⁸⁵. La célula osteoprogenitora se adhiere a la superficie de un implante a través de integrinas. Las integrinas se unen a las proteínas de la matriz extracelular, como la fibronectina. Un osteoblasto no se adhiere directamente al metal, sino a la capa de proteínas en la parte superior del implante. La propia célula precursora del hueso produce fibronectina celular insoluble necesaria para la unión celular al titanio. Después de esta firme unión a la superficie, la célula osteoprogenitora se denomina osteoblasto que comienza a expresar osteocalcina, fosfatasa alcalina y colágeno tipo I ⁸⁴.

A la semana de la inserción del implante, comienza la formación de hueso nuevo y los contactos óseos primarios se complementan con contactos óseos secundarios recién formados. Histológicamente, el hueso que se forma después de una lesión se caracteriza porque sus fibras de colágeno no son paralelas, estas fibras están orientadas al azar. Este hueso crece a lo largo de la superficie ósea existente y a lo largo de la superficie del implante dental hacia las ranuras de las roscas ⁹.

La formación de hueso nuevo comienza con la secreción de una matriz de colágeno por parte de los osteoblastos. La formación de hueso dentro del

INTRODUCCIÓN

proceso alveolar es un proceso de osificación intramembranosa, comenzando por la secreción de colágeno tipo III ^{9,84}.

En la fase de remodelación del tejido óseo son los osteoclastos los que eliminan el tejido óseo entretejido y lo reemplazan por hueso lamelar, formándose en el interior de las fibras de colágeno placas cristalinas de hidroxiapatita orientadas. Su nanoestructura proporciona las propiedades mecánicas y biológicas únicas del hueso, lo suficientemente rígido que lo hace resistente a fuerzas de presión y tracción manteniendo su elasticidad ⁸⁴.

El osteoclasto es la célula clave de la fase de remodelación. Estas células aparecen en la herida al cabo de unos días. Comienzan a crear espacio para la formación de hueso nuevo y eliminan los contactos primarios entre el hueso y el implante. Al cabo del tiempo, la mayor parte del hueso entretejido y el hueso viejo de los contactos óseos primarios son reemplazados por hueso recién formado y orientado a la carga ⁵⁶.

El origen de los osteoclastos son los monocitos transportados por la sangre. Se adhieren a las paredes de los vasos sanguíneos mediante la interacción CXCR-4, y SDF-1 que se unen a la superficie de las células endoteliales. La formación de osteoclastos requiere la presencia del ligando RANK y M-CSF. Estas proteínas unidas a la membrana son producidas por osteoblastos vecinos, lo que requiere un contacto directo entre estas células y los precursores de osteoclastos ⁵⁶.

6. SUPERFICIE DEL IMPLANTE

La superficie de un implante está en contacto directo con el tejido óseo. Por lo tanto, las propiedades de la superficie son un factor determinante principal para el posterior comportamiento complejo de las células en la interfaz hueso-implante in vivo, así como para la respuesta celular in vitro.

INTRODUCCIÓN

Diferentes parámetros, por ejemplo, la topografía de la superficie, la química, la carga y las condiciones de cultivo (in vitro) o el entorno fisiológico (in vivo), afectan las interacciones discretas entre las células y el biomaterial ⁸⁶.

Cuando el implante se expone a los fluidos biológicos, se produce la adsorción de agua, moléculas de suero, proteínas y células en su superficie. Después de su adsorción a la superficie, las proteínas se adaptan a una conformación específica, que depende de las propiedades de la superficie (química y carga). La unión inicial de la célula con el material está determinada por la composición, la densidad y la conformación de las proteínas adsorbidas. Posteriormente, las células cercanas a la superficie comienzan la detección filopodial a través de las sus integrinas. Las integrinas son receptores de la superficie celular de glicoproteínas que interactúan con las proteínas adhesivas de la matriz extracelular, se agrupan en los denominados puntos de adhesión focal y, por lo tanto, participan en la adhesión celular a los biomateriales ⁸⁶.

A partir de estos puntos de adhesión focales, las fuerzas se transmiten a través de la membrana celular y se produce la reorganización del citoesqueleto celular. Las interacciones entre las integrinas y las proteínas de la matriz extracelular se producen a través del reconocimiento de dominios de secuencia de aminoácidos (p. ej., RGD (Arg Gly Asp)) que se encuentran en la fibronectina, osteoprotegerina y sialoproteína ósea, o GFOGER (glicina-fenilalanina-hidroxi prolina-glicina-glutamato-arginina) para el colágeno tipo I ⁸⁶.

El impacto de las características de la superficie en la morfología y diferenciación celular está mediado por las integrinas. La señalización de las integrinas interfiere con las rutas de señalización de los factores de crecimiento, guiando el patrón de comportamiento de las MSC y las células

óseas. Los estudios han demostrado que la sobreexpresión de las integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$ en las células formadoras de hueso induce posteriormente una diferenciación favorable de los osteoblastos tanto en las superficies de los implantes de titanio micro y nanoestructurados. La vinculina, la talina y la RhoA son proteínas citoesqueléticas que actúan como reguladores esenciales de la adhesión celular y vinculan las integrinas al citoesqueleto de actina. Por lo tanto, el modo de expresión de estas proteínas de adhesión citoesquelética regula la señalización intracelular mediada por integrinas y también contribuye a las vías de señalización relacionadas con la osteogénesis posteriores de las células madre mesenquimales (MSC) ⁸⁶.

7. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS, MICROESTRUCTURALES Y MECÁNICAS DEL TITANIO.

El material de referencia utilizado en implantes dentales intraóseos es el titanio o sus aleaciones, debido a su óptima resistencia, su excelente durabilidad, su biocompatibilidad y sus propiedades antibacterianas ¹³. El titanio es el noveno metal más abundante y fue descubierto por William Gregory en 1791. En su forma pura se presenta como un metal plateado con características físico-químicas únicas, como baja densidad (4506 g/cm^3) y alta resistencia (590 MPa) ⁸⁷. Los estudios con este metal se desarrollan para los temas más diversos, como aplicaciones en deportes, pigmentos, joyería, equipos marinos, industria aeroespacial y médica ⁸⁸. En cuanto a la industria dental, se sabe que el titanio y sus aleaciones no son tóxicos e incluso son más biocompatibles que el cromo-cobalto y el acero inoxidable. Además, son compatibles con la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética

INTRODUCCIÓN

(RM). Estos biomateriales de titanio son la base para la fabricación de prótesis e implantes dentales ⁸⁹.

La superficie del titanio puede reaccionar rápidamente con el oxígeno cuando se expone a líquidos biológicos (p. ej. Saliva y sangre) formando una capa de pasivación de óxido sobre la superficie del metal que proporciona una gran resistencia a la corrosión en su superficie. Esta característica de resistencia a la corrosión facilita la biocompatibilidad al mantener la integridad mecánica del material y la salud del tejido óseo circundante ⁹⁰.

Sin embargo, las propiedades electro-fisicoquímicas del dióxido de titanio son sustancialmente diferentes en comparación con los tejidos duros dentales mineralizados, creando un microambiente distinto que afecta la adherencia de los primeros colonizadores orales (como *Estreptococos* y *Actinomyces*) y puede alterar las interacciones entre especies asociadas con la salud periimplantaria. Para superar estos obstáculos, se ha aplicado una diversidad de modificaciones físicas, químicas y biológicas a la superficie de los implantes de titanio para mejorar su rendimiento biológico y los resultados de la osteointegración ⁹¹.

El titanio es un material bioinerte, que induce poco o ningún efecto deletéreo sobre el tejido circundante. Sin embargo, a pesar de sus inherentes ventajas, sin un tratamiento superficial adecuado, termina teniendo una baja integración con el hueso y el tejido gingival, lo que puede conducir a pérdidas de los implantes dentales. Estos fallos en la implantación ocurren debido a una mala osteointegración, afectando la estabilidad del implante en el hueso, lo que puede llevar al establecimiento de infecciones y procesos inflamatorios en el espacio periimplantario. Para reducir tales problemas, se investigan diferentes tratamientos superficiales para promover una mejor

osteointegración y prevenir la formación de biopelículas bacterianas dañinas⁹².

Durante las últimas décadas se ha producido un importante avance en el diseño y fabricación de superficies de implantes de titanio con el objetivo de mejorar su osteointegración. La topografía y la rugosidad de la superficie del implante de titanio son esenciales para una adecuada adhesión, proliferación y diferenciación osteoblástica¹⁹.

Se ha demostrado que las superficies rugosas de titanio, que maximizan el contacto con el hueso alveolar circundante, presentan una mejor integración que las lisas. Este beneficio puede atribuirse sustancialmente al hecho de que la microporosidad de la superficie mejora la diferenciación osteoblástica de las células madre mesenquimales circundantes, que son en última instancia responsables de la curación y consolidación ósea después de la colocación del implante²³. Además, las células óseas humanas tienen una capacidad de adhesión muy baja a las superficies metálicas lisas, y el uso de estos materiales sin modificar podría provocar infecciones, inflamación y una baja viabilidad celular. Por esta razón, se han propuesto modificaciones que afectan la rugosidad, la topografía y la química de la superficie del implante para aumentar la viabilidad celular y su diferenciación⁹³.

En general, las células óseas y estromales humanas tienen una capacidad de adhesión muy baja a superficies metálicas lisas, y el uso de estos materiales podría provocar infecciones, inflamación y baja viabilidad celular. Por este motivo, se han propuesto modificaciones que afectan la rugosidad, la topografía y la química de la superficie del implante para aumentar la viabilidad celular y la biocompatibilidad. Las modificaciones de superficie más comunes utilizadas en odontología se basan en la abrasión mecánica, el chorro de arena y el grabado ácido¹⁹. Las diferentes superficies obtenidas

mediante mecanizado, arenado, grabado ácido y las tratadas mediante arenado y posterior grabado ácido han sido profundamente estudiadas en los aspectos de las propiedades fisicoquímicas de la superficie ⁹⁴.

7.1. TOPOGRAFÍA DE LA SUPERFICIE DE IMPLANTES DENTALES

En el contexto de los biomateriales para la regeneración ósea, la rugosidad de la superficie se define comúnmente como una colección de patrones de altura distribuidos aleatoriamente con dimensiones a micro o nanoescala. La importancia de la rugosidad del material en la reparación y regeneración ósea ha sido ampliamente ilustrada en superficies metálicas (por ejemplo, aleaciones de titanio), cuya rugosidad se puede modificar fácilmente por medios mecánicos, como tratamiento con chorro de arena, o tratamientos químicos, como grabado ácido ¹⁹. Se ha demostrado que los dispositivos médicos con un cierto grado de rugosidad superficial poseen capacidades osteointegrativas superiores en comparación con los implantes de titanio de superficie lisa ⁴⁵.

También se ha demostrado que el aumento de la rugosidad superficial de las superficies de las placas de cultivo de tejidos influye en el comportamiento de los osteoblastos promueve la diferenciación de MSC hacia el linaje osteogénico ⁴⁵. Un efecto biomecánico primario de la rugosidad de la superficie sobre las células son las alteraciones en los cambios de forma celular y la señalización de integrinas que influyen en la diferenciación osteogénica ⁹⁵.

Se ha demostrado que los biomateriales sin rugosidad superficial en el rango de micro y nanoescala obstaculizan la diferenciación osteogénica celular. Las superficies más rugosas (rugosidad media promedio $Ra > 0,5 \mu\text{m}$) se correlacionaron con un mayor contacto entre el hueso y el implante (BIC) y

INTRODUCCIÓN

son las preferidas por las células óseas. En las superficies lisas, se adhieren y proliferan menos células proosteogénicas, sino más bien fibróticas, lo que puede dar lugar a la formación de tejido fibroso y al aflojamiento del implante in vivo. En general, las células proosteogénicas son más favorables para adherirse, proliferar y diferenciarse en superficies rugosas con nanopatrones, lo que reduce el riesgo de fibrosis indeseable ⁸⁶.

La rugosidad del titanio favorece el proceso de diferenciación osteoblástica a través de variaciones en la regulación transcripcional o expresión génica de factores osteogénicos debido a variaciones morfológicas de las células causadas por la topografía de la superficie del titanio ¹⁹.

Podemos clasificar la topografía de los implantes dentales en macro, micro y nanoescala. La macrotopografía de un implante está determinada por su geometría visible como son las roscas y diseño cónico. La escala métrica es de milímetros a micrómetros. Una macrogeometría adecuada combinada con una preparación adecuada del lecho implantario es la base fundamental del éxito clínico de un implante ¹⁹.

La microtopografía se corresponde con la microrrugosidad a escala micrométrica (1-100 μm) y es modificada por técnicas de fabricación como son el mecanizado, el arenado, el grabado ácido, la anodización y la utilización de diferentes procedimientos de recubrimientos de superficies. Hoyos, surcos y protuberancias caracterizan la microtopografía y sientan las bases para las respuestas biológicas en la interfase hueso-implante ¹⁹.

La nanotopografía provoca cambios a nivel biológico, físico y químico originando un incremento en la adhesión de las células osteogénicas y potencialmente promoviendo la osteointegración. La nanotopografía de los implantes dentales influye en las interacciones célula-implante, a nivel celular y de las proteínas. En las etapas iniciales del proceso de cicatrización, las

INTRODUCCIÓN

modificaciones nanomorfológicas influyen con frecuencia en la interacción química de las sustancias y el desarrollo del hueso en el sitio implantado. Las nanopartículas también tienen repercusiones directas en la diferenciación celular, promoviendo el desarrollo del linaje osteoblástico ⁹⁶. Se ha evidenciado que los implantes con superficie a nanoescala demuestran una mayor formación ósea asociada con niveles más altos de expresión de *Osterix* durante el período de curación de 21 días con evidencia directa de regulación genética asociada a la superficie que involucra una vía osteoinductiva mediada a nanoescala que utiliza *Osterix* para dirigir la osteoinducción de células adherentes ⁹⁷.

La topografía a nanoescala afecta en múltiples etapas al fenómeno de osteointegración, incluida la inmunomodulación inicial, el reclutamiento de MSC y la posterior diferenciación osteoblástica que conduce a la producción y mineralización de la matriz ósea. Una topografía a nanoescala modula favorablemente la polarización de los macrófagos adherentes hacia fenotipos antiinflamatorios y regenerativos y promueve el fenotipo osteoinductivo de las células madre mesenquimales adherentes ⁹⁸.

Los parámetros científicos comúnmente utilizados para describir la rugosidad de la superficie es el bidimensional (2D Ra - promedio de rugosidad del perfil) y el tridimensional (3D Sa - promedio de rugosidad del área) ⁹⁹⁻¹⁰⁰.

La primera generación de implantes dentales de titanio tenía superficies mecanizadas, casi lisas (0,3-1 μm). Los implantes mecanizados necesitaban una cirugía en dos etapas, pero garantizaban un buen rendimiento clínico. La mejor integración ósea de las superficies rugosas de titanio ha promovido el desarrollo de numerosos tratamientos y modificación de recubrimientos de superficies, con el fin de promover una integración ósea más rápida y fisiológica de los implantes dentales ¹⁰¹.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los implantes dentales comerciales tienen un Ra de 1-2 μm . Este rango de rugosidad parece ser óptimo para conseguir la osteointegración. Los picos, valles, y protrusiones de la microtopografía de la superficie de los implantes constituyen un evento importante para la configuración de la interfase implante-hueso y es esencial para la respuesta biológica ¹⁰⁰.

Los principales procesos de modificación de superficies utilizados actualmente para la realización de implantes dentales son el arenado con partículas de varios tamaños y materiales (las dimensiones de las partículas suelen estar comprendidas entre 25 μm y 250 μm , normalmente fabricadas por Al_2O_3 , TiO_2 o ZrO_2) consiguiendo una rugosidad final de 0,5–2,0 μm ; el grabado ácido, con una rugosidad final de 0,3-1,0 μm ; superficies arenadas y grabadas con ácido (SLA), obtenidas mediante diversos grabados con ácido realizados sobre superficies arenadas y que dan como resultado superficies microtexturizadas, con una rugosidad de 1-2 μm ; superficies modificadas con láser para obtener micro y nanoestructuras y finalmente, las superficies anodizadas, obtenidas por oxidación electroquímica en diversos electrolitos y dando lugar a capas porosas de óxido de titanio, enriquecidas con diferentes iones, como el calcio o el fósforo ¹⁰¹.

Las modificaciones de la microtopografía pueden incrementar el área de superficie, lo que se traduce en mayores niveles de contacto y uniones hueso-implante. Estos cambios topográficos alteran el crecimiento, el metabolismo, la producción de citoquinas y factores de crecimiento y la migración de células osteogénicas ¹⁰².

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La interacción entre las células y su microambiente es crucial para mantener el comportamiento normal de las células. La selección adecuada de materiales de andamiaje, tipos de células madre y sustancias bioactivas son imprescindibles para el éxito de la ingeniería de tejidos, influyendo en la regeneración y la reparación de los tejidos dañados. La topografía de las superficies de titanio y sus aleaciones influyen en distintos comportamientos y procesos celulares como formación ósea, adsorción de proteínas e interacción de los osteoblastos con el biomaterial. Estos aspectos juegan un papel fundamental en la generación de nuevas células osteoblásticas y en el mecanismo de osteoconducción ^{9,13,19}.

Se han estudiado y aplicado diversas técnicas de tratamientos superficiales para mejorar las propiedades biológicas de la superficie, lo que favorece el mecanismo de osteointegración. Esta estrategia tiene como objetivo promover la osteointegración con una formación ósea más rápida y fuerte, para conferir una mejor estabilidad durante el proceso de cicatrización, permitiendo así una carga más rápida del implante ^{2,4,6}.

Algunos de los objetivos para el desarrollo de modificaciones de la superficie de los implantes son mejorar el rendimiento clínico en zonas con poca cantidad o calidad de hueso, acelerar la cicatrización ósea y permitir así protocolos de carga inmediata o temprana y también estimular el crecimiento óseo para permitir la colocación de implantes en sitios que carecen de suficiente reborde alveolar residual ¹³⁻¹⁵.

Una superficie modificada microscópicamente, con una rugosidad superficial puede mejorar el contacto entre el hueso y el implante a través

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

de la fijación mecánica y promover las funciones específicas de las células óseas, como la adhesión celular y la diferenciación osteogénica. Una superficie modificada a nanoescala con una gran área superficial puede promover la proliferación celular y la diferenciación osteogénica. La topografía rugosa de titanio es más bioactiva y biomimética que la topografía de titanio lisa o mecanizada, y puede beneficiar las funciones de las células óseas. El aumento de rugosidad del titanio conduce a un aumento en el proceso de diferenciación osteoblástica a través de variaciones en la regulación transcripcional o expresión génica de factores osteogénicos debido a variaciones morfológicas de las células causadas por la topografía de la superficie del titanio ^{18,21,23}.

En este sentido, se ha demostrado que los implantes con un grado importante de rugosidad, favorecen el anclaje mecánico y la fijación primaria al hueso, mientras que las topografías a nivel nanométrico se centran en la mejora de la respuesta del huésped mediante la promoción de la adsorción de proteínas y la adhesión de células osteoblásticas durante las primeras etapas de la curación en la región periimplantaria. Además, tras el contacto de la superficie del implante con los fluidos biológicos, se forma dióxido de titanio que sirve como una capa de pasivación que determina la biocompatibilidad del implante.

Sin embargo, las propiedades electroquímicas/fisicoquímicas del dióxido de titanio son fundamentalmente diferentes en comparación a los tejidos duros dentales mineralizados, creando un microambiente distinto que afecta la adherencia de los primeros colonizadores orales y puede alterar las interacciones entre especies asociadas con la salud periimplantaria. Para superar estos obstáculos, se ha aplicado una

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

diversidad de modificaciones físicas, químicas y biológicas a la superficie de los implantes de titanio para mejorar su rendimiento biológico y los resultados de la osteointegración ^{19,99-100}.

Entre las modificaciones físicas del titanio, las modificaciones a nivel microscópico parecen lograr la osteointegración más intensa, mientras que las modificaciones a nivel nanométrico disminuyen la adhesión bacteriana de manera más efectiva. A nivel químico, las modificaciones a nivel nanométrico se logran para aumentar la hidrofiliidad de la superficie y, por lo tanto, promover la osteointegración al tiempo que reducen la adhesión bacteriana hidrófoba. Además, se puede lograr una estimulación directa de la osteointegración y la mitigación de la formación de biopelículas mediante modificaciones biológicas específicas. Por ejemplo, se sabe que el recubrimiento con factor de crecimiento mejora la osteointegración, mientras que el recubrimiento con agente antibacteriano combate directamente las bacterias y mejora las propiedades del implante ⁹⁴⁻⁹⁸.

Otro tipo de modificación biológica es la utilización de células madre sobre la superficie del implante. El papel de los osteoblastos es esencial en el proceso de osteointegración. Para lograr una regeneración exitosa, se requieren tres procesos esenciales: la presencia de las condiciones apropiadas para el crecimiento de elementos osteogénicos (osteoconducción), la estimulación de células indiferenciadas para formar osteoblastos (osteoinducción) y la presencia de osteoblastos que formarán hueso nuevo (osteogénesis) ⁷⁸⁻⁸².

El hueso autólogo es el único material que tiene propiedades osteoconductoras, osteoinductivas y osteogénicas, y por lo que es el estándar de oro en el tratamiento reconstructivo. Los autoinjertos son los

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

más eficaces biológica y clínicamente, ya que contienen células óseas vivas que garantizan la biocompatibilidad y no activan al sistema inmunológico del receptor. Se necesitan hasta doce meses para obtener un hueso integrado y vascularizado, para su posterior proceso de modificación ⁶⁴⁻⁶⁸.

La recuperación y preparación del injerto requiere de una cirugía adicional, que debilita el hueso del lugar de donde se extrae el material, además de aumentar el riesgo de complicaciones y padecimientos post-tratamiento. La cantidad de material necesario para el injerto es limitada y el potencial que pueden presentar los autoinjertos varía dependiendo del paciente y del lugar del que se ha obtenido el material. Estas desventajas mencionadas han impulsado la búsqueda de nuevas soluciones en ingeniería de tejidos, como la utilización de células madre que sean capaces de reconstruir de forma predecible y longitudinal el defecto óseo. Se cree que las células madre podrían alcanzar todos los criterios modernos para garantizar el éxito total del tratamiento implantológico (completa integración del material implantado y el hueso, pérdida ósea marginal por debajo de 0,2 mm y funcionamiento de la restauración protésica) ⁷⁰⁻⁷⁴.

Se ha observado que las células madre trasplantadas participan en el reclutamiento de células madre endógenas de la médula ósea, creando centros de osificación mediante la formación de callos óseos. La formación del callo conduce a la formación de hueso esponjoso joven que posteriormente se convierte en hueso maduro. En este proceso participan distintas citoquinas producidas por las células madre, donde la vía MCP-1/CCR2 juega un papel crucial en este fenómeno. MCP-1 es una citocina proinflamatoria cuya función es atraer a monocitos y basófilos, participando en la quimiotaxis de leucocitos. CCR2 es un receptor que se

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

une a proteínas G que es capaz de unirse a distintos quimioatrayentes, como MCP-1^{68-69,72}.

Las células madre parecen tener implicaciones terapéuticas prometedoras en la regeneración ósea. Sin embargo, la regeneración ósea es un área de especialización relativamente nueva en la ingeniería de tejidos y aún no se conocen completamente los mecanismos presentes en el cuerpo durante el trasplante. En cuanto a la evaluación clínica de las células trasplantadas, aún no se ha aclarado si el hueso nuevo se forma a partir de las propias células madre trasplantadas (función osteogénica de las células madre) o a través de células formadoras de hueso del reservorio tisular, estimuladas por las células madre trasplantadas (función osteoinductora de las células madre)⁷⁴⁻⁷⁷.

Teniendo en cuenta la evidencia experimental sobre la influencia de la topografía de la superficie de los implantes y la mejora en el proceso de osteointegración con la utilización de diversos tipos de células madre, el objetivo general del presente estudio de investigación doctoral es evaluar la respuesta de los tipos de células madre amnióticas humanas (hAECs y hAMSCs) en las diferentes superficies de titanio utilizadas actualmente en el ámbito de la implantología oral.

Los objetivos específicos son:

1. Determinar la topografía y la rugosidad de las superficies de los implantes dentales analizados.
2. Conseguir el aislamiento y cultivo de células madre amnióticas humanas, epiteliales y mesenquimales (hAECs y hAMSCs)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3. Evaluar la viabilidad celular de las células madre amnióticas humanas (hAECs y hAMSCs) en las diversas superficies de implantes dentales analizadas.
4. Evaluar la respuesta osteoblástica y su expresión génica (actividad de la ALP, deposición de calcio y expresión de marcadores osteogénicos) en las diferentes superficies de implantes de titanio utilizadas.

MATERIAL
Y
MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio doctoral ha sido realizado en la Facultad de Odontología de la Universidad de Sevilla en el Máster de Implantología Oral. La fase experimental del presente estudio ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica del Hospital Universitario Virgen Macarena y en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

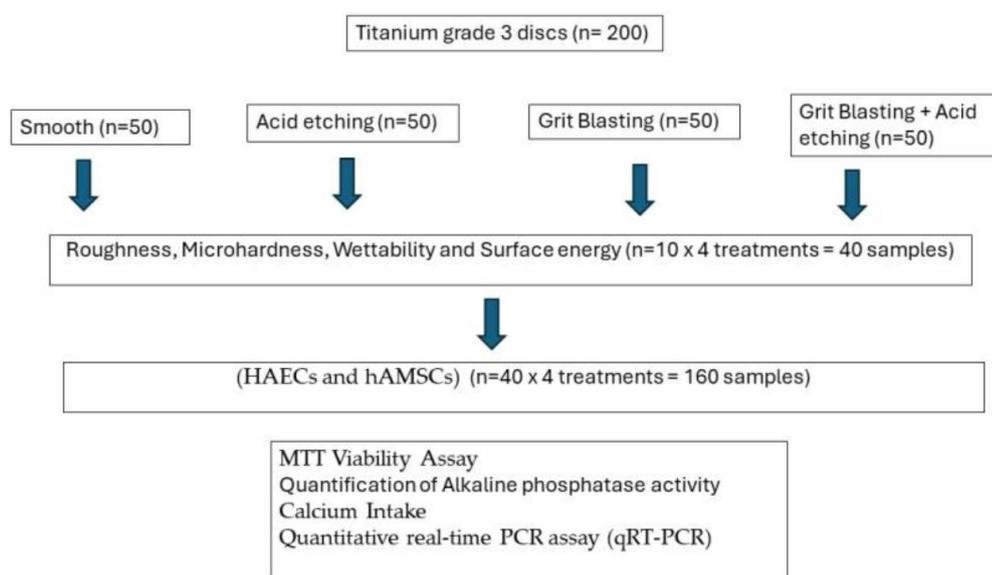


Figura 1.

Diagrama de flujo con el número de muestras de cada tipo y las distintas técnicas analizadas.

1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE TITANIO

Galimplant® (Sarria, Lugo, España) proporcionó doscientos discos de titanio (5 mm de diámetro y 2 mm de ancho) con diferentes tratamientos superficiales. El titanio comercialmente puro era de grado 3 (Ti: 99,5 %, O: 0,3%, Fe: 0,1%, C: 0,05%, N: 0,05%). Las superficies se trataron de la siguiente manera:

MATERIAL Y MÉTODOS

- Mecanizado (MACH): Los discos presentan la abrasión mecánica propia del mecanizado de implantes dentales sin tratamiento superficial posterior (n =50).
- Arenado (GBLAST): La rugosidad se obtuvo pulverizando partículas abrasivas de óxido de aluminio (Al_2O_3) sobre la superficie de titanio a una presión de 2,5 bares y una separación pistola-muestra de 100 mm (n = 50).
- Grabado ácido (AE): El grabado ácido se realizó con una mezcla de ácidos HCl y HNO_3 concentrados 1:1 durante 45 segundos (n = 50).
- Arenado y grabado ácido (GBLAST + AE): Los discos fueron arenados con partículas de alúmina de 250 a 450 μm a una presión de 2,5 bares y a una distancia de la superficie de la pistola de 100 mm. Posteriormente, se lavaron con agua destilada y se trataron por inmersión en una mezcla ácida 1:1 de ácido clorhídrico concentrado y ácido nítrico durante 45 segundos (n = 50).

Se desarrollaron este tipo de tratamientos de superficies o topografías porque son las más utilizadas en implantes de titanio como sustitutos de las raíces dentales. El titanio mecanizado fué utilizado como control.

Para los estudios de caracterización superficial (topografía y rugosidad), las muestras fueron limpiadas incubándose en alcohol metílico durante 15 minutos en ultrasonidos y posteriormente en acetona durante 5 minutos. Los materiales fueron secados con corriente de aire caliente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ensayos de microdureza se realizaron mediante el método de dureza Vickers con un microdurómetro Matsuzawa de alta precisión ® (Tokio, Japón), aplicando una carga de 1 kilogramo durante 15 segundos. El indentador era una pirámide de diamante.

2. CARACTERIZACIÓN DE SUPERFICIES DE DISCOS DE TITANIO

Para observar la topografía de la superficie se utilizó el microsopio electrónico de barrido Jeol 6400 ® (Jeol, Tokio, Japón), y la evaluación de la rugosidad superficial se realizó mediante microscopía electrónica de barrido láser confocal, CLSM; OLS (Olympus Lext 3000, Shinjuku, Japón) obteniéndose los diferentes perfiles de las diferentes superficies. En primer lugar, se verificó el equipo con la utilización de una muestra de referencia (Mitutoyo SR 15, Elgoibar, España “Precision Reference Specimen”: $S_a = 0,10 \mu\text{m}$). Se calcularon un total de 3 mediciones en 3 muestras de cada superficie ¹⁰³.

El análisis del ángulo de contacto se realizó con agua destilada ultrapura Millipore Milli-Q ® (Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Alemania) y formamida Contact Angle System OCA15 plus ® (Dataphysics, Filderstadt, Alemania), y los datos correspondientes se analizaron con SCA20 ® (Dataphysics, Filderstadt, Alemania). Las mediciones del ángulo de contacto se realizaron con el método de la gota sésil. Las gotas se generaron con una jeringa micrométrica y se depositaron sobre discos. Se depositó un total de 3 μL de agua destilada y 1 μL de formamida en cada muestra a 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. La humectabilidad se estudia

MATERIAL Y MÉTODOS

midiendo el ángulo de contacto siguiendo la ecuación de Young y describe el equilibrio en la línea trifásica entre sólido (s), líquido (l) y vapor (v):

$$\gamma_{sv} = \gamma_{sl} + \gamma_{lv}\cos\Theta_Y$$

Las tensiones interfaciales, γ_{sv} , γ_{sl} y γ_{lv} , forman el ángulo de contacto de equilibrio de humectación, denominado ángulo de contacto de Young Θ_Y . La ecuación de Young supone que la superficie es químicamente homogénea y topográficamente lisa. La relación entre la rugosidad y la humectabilidad fué corregida por Wenzel, quien afirmó que agregar rugosidad a la superficie mejorará la humectabilidad causada por la química de la superficie. La afirmación de Wenzel se puede describir de la siguiente manera:

$$\cos\Theta_m = r\cos\Theta_Y$$

Θ_m es el ángulo de contacto medido, Θ_Y es el ángulo de contacto de Young y r es la relación de rugosidad. La relación de rugosidad (r) se define como la relación entre el área de superficie sólida real y geométrica/nominal ($r > 1$ para una superficie rugosa). La ecuación de Wenzel es una aproximación que se vuelve más precisa a medida que la gota se hace más grande en comparación con la escala de la rugosidad. Nuestros valores experimentales se modificaron utilizando la ecuación de Wenzel¹⁰⁴.

Finalmente, la energía superficial se determinó aplicando la ecuación de Owens, Wendt, Rabel y Kaelble (OWRK) a los valores de mojabilidad obtenidos con el agua destilada y la formamida^{94,105}. Esta energía se

MATERIAL Y MÉTODOS

calcula en base a las dos tensiones superficiales: un componente disperso y un componente polar de la energía libre superficial.

3. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS MADRE AMNIÓTICAS EPITELIALES Y MESENQUIMALES HUMANAS

Las placentas humanas a término se obtuvieron con el consentimiento informado por escrito de madres sanas tras partos normales por cesárea. Todos los procedimientos utilizados en este estudio fueron examinados por el Comité de Ética del Hospital Virgen Macarena de Sevilla (Documento 1). Todos los métodos probados se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices y regulaciones pertinentes.

El amnios se separó mecánicamente del corión y se lavó con solución salina fisiológica estéril para eliminar la sangre y el tejido conectivo residual. El tejido se cortó en aproximadamente 6 fragmentos de 8 cm x 8 cm y se esterilizó en flujo laminar mediante lavados sucesivos en solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril que contenía penicilina/estreptomicina 50 U/mL, anfotericina 50 U/mL y cefalexina 50 U/mL. Posteriormente, el amnios se digirió con tripsina-EDTA al 0,25% a 37°C durante 20 minutos. Las células epiteliales amnióticas (hAECs) se liberaron específicamente mediante esta digestión. Las células restantes se centrifugaron durante 10 minutos a 1300 rpm. El pellet celular se resuspendió y se filtró a través de un filtro estéril de 100 µm (BD Falcon) para eliminar los agregados de tejido. Luego, la solución celular se centrifugó durante 10 minutos a 1300 rpm ⁶⁴.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para aislar las células estromales mesenquimales amnióticas humanas (hAMSCs), tras la separación de las hAECs, los fragmentos de membrana se digirieron con 0,75 mg/mL de colagenasa II durante 90 minutos a 37°C con agitación vigorosa. La suspensión celular se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm y luego se filtró. Finalmente, las hAECs y las hAMSCs se cultivaron por separado durante 24 horas en IMDM fresco que contenía 10% FBS. Al final de cada procedimiento, se determinó el número total de células aisladas ⁶⁴.

Las células aisladas se cultivaron en medio IMDM Invitrogen ®, (Waltham, MA, EE. UU.) que contenía 10% FBS, 4 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sodio, 50 U/mL penicilina, 50 µg/mL estreptomicina y 1 mM aminoácidos no esenciales a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂. El medio se cambió dos veces por semana ⁶⁴.

4. ENSAYO DE VIABILIDAD DE MTT

Las hAECs y las hAMSC se sembraron en placas de 24 pocillos con diferentes discos de titanio (2×10^5 células por pocillo). Después de los diferentes tiempos de incubación, las células se lavaron con PBS y se añadieron 80µL de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (concentración final 1 mg/mL) en 400 µL de medio DMEM-F12 que contenía 10% de FBS. Las células se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. En las células metabólicamente activas, la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa convierte el MTT en formazán, un compuesto azul. Para cuantificar el color azul generado, se retiró el medio y se disolvió el formazán en 200 µL de etanol al 100%, seguido de una incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos. La absorbancia a

MATERIAL Y MÉTODOS

570 nm se midió utilizando un espectrofotómetro lector de microplacas DR-200Bs ® (Diatek, South Dumdum, India) ⁶⁴.

5. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ALCALINA

La actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) en los sobrenadantes de hAECs y hAMSCs se cuantificó con el ensayo colorimétrico de fosfatasa alcalina Sensolyte pNPP ® (Anaspec, Fremont, CA, EE. UU.). La actividad de la ALP se midió a 405 nm en un lector de microplacas ELx800 ® convencional (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EE. UU.) ⁶⁴.

6. CONSUMO DE CALCIO

Los sobrenadantes de hAMSCs y hAEC se recogieron (1 mL) y se almacenaron a -80°C. Las concentraciones de iones de calcio (Ca_{2+}) se determinaron utilizando el kit de ensayo de calcio (Abcam, ab102505) de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, los sobrenadantes se centrifugaron a máxima velocidad durante 5 minutos a 4°C para eliminar cualquier material insoluble. Los sobrenadantes resultantes se transfirieron a continuación a tubos limpios.

A cada muestra, se añadieron 90 µL del reactivo cromogénico. El complejo cromogénico formado entre los iones de calcio y la 0-cresolftaleína se cuantificó midiendo la absorbancia a 575 nm utilizando un lector de microplacas. Los valores de absorbancia obtenidos para cada estándar se normalizaron frente a su concentración final de calcio para crear una curva estándar. Las concentraciones de calcio en las muestras se determinaron extrapolando a partir de la curva estándar. Finalmente, la ingesta de calcio se calculó restando la concentración de calcio de cada muestra de la concentración total de calcio de control ⁶⁴.

MATERIAL Y MÉTODOS

7. ENSAYO CUANTITATIVO DE PCR EN TIEMPO REAL (QRT-PCR)

Para investigar la expresión génica en hAECs y hAMSCs tratadas y no tratadas, se aisló el ARN total utilizando el reactivo Trisure[®] siguiendo las instrucciones del fabricante (Bioline GmbH, Berlín, Alemania). La concentración y la pureza del ARN aislado se determinaron espectrofotométricamente a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000[®] (NanoDrop Technologies, Wilmington, DC, EE. UU.)⁶⁴.

Para la síntesis de ADN complementario (ADNc), 5 µg de ARN total se sometieron a transcripción inversa a 50°C durante 1 hora, empleando el kit de síntesis de ADNc de primera hebra Transcriptor (Roche). Posteriormente se realizó una reacción de qRT-PCR utilizando primers forward y reverse diseñados específicamente para los genes de interés implicados en el proceso de mineralización (factor de transcripción relacionado con Runt 2 (RUNX2), osteocalcina (OST), osterix (OSX) y fosfatasa alcalina (ALP)) utilizando los siguientes cebadores:

ALP: (F:5'-ACTCCCACTTCATCTGGAACC-3',
R:5'CCTGTTCAGCTCGTACTGCAT-3'),

RUNX2: (F:5'-GTCTCACTGCCTCTCACTTG-3', R:5'-
CACACATCTCCTCCCTTCTG-3'),

OSTERIX: (F:5'-TGAGGAGGAAGTTCACTATGG-3', R:5'-
TTCTTTGTGCCTGCTTTGC-3'),

OPN: (F:5'-CAGAATGCTGTGTCCTCTGAA-3', R:5'-
GTCAATGGAGTCCTGGCTGT-3'),

MATERIAL Y MÉTODOS

$\alpha 2$ INTEGRIN: (F:5'-CCTACAATGTTGGTCTCCCAGA-3', R:5'-AGTAACCAGTTGCCTTTTGGATT-3'),

$\alpha 5$ INTEGRINA: (F:5'-GGCTTCAACTTAGACGCGGAG-3', R:5'-TGGCTGGTATTAGCCTTGGGT-3'),

αv INTEGRINA: (F:5'-ATCTGTGAGGTTCGAAACAGGA-3', R:5'-TGGAGCATACTCAACAGTCTTTG-3'),

$\beta 1$ INTEGRINA: (F:5'-CCTACTTCTGCACGATGTGATG-3', R:5'-CCTTTGCTACGGTTGGTTACATT-3'),

$\beta 3$ INTEGRINA: (F:5'-TCCTCATCACCATCCACGA-3', R:5'-TTATCAGCCTGTGCCACGA-3'),

$\beta 5$ INTEGRINA: (F:5'-TCTCGGTGTGATCTGAGGG-3', R:5'-TGGCGAACCTGTAGCTGGA-3'),

CICLOPILINA: (F:5'-CTTCCCCGATACTTCA-3', R:5'-TCTTGGTGCTACCTC-3') y

GAPDH: (F:5'-TCCCTGAGCTGAACGGGAAG-3', R:5'-GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT-3').

El análisis de RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) se realizó utilizando un kit SYBR Premix Ex Taq[®] (Takara BIO Inc., Shiga, Japón), y las reacciones de PCR se ejecutaron en un sistema RT-PCR Applied Biosystems 7500[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). Cada reacción estándar consistió en 1 μ M de cebadores directos e inversos, 9 μ L de mezcla maestra SYBR Green 2X, 1 μ L de ADNc y agua, lo que resultó en un volumen de reacción final de 15 μ L. El proceso de termociclado se realizó a 95°C durante 10 minutos, 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 10 minutos para 40 ciclos de amplificación y annealing/extensión a 60°C durante 1 minuto. Se empleó el programa Opticon Monitor 3 para determinar el ciclo umbral (CT) para cada pocillo. La cuantificación

MATERIAL Y MÉTODOS

relativa se determinó mediante la técnica $2^{-\Delta\Delta CT}$. En el caso de las muestras tratadas, el valor $2^{-\Delta\Delta CT}$ indicó el cambio en la expresión génica, normalizada frente a los genes housekeeping (CICLOPHILINA y GAPDH)

64.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se presentan como el promedio \pm el error estándar del promedio (SEM) para un mínimo de cuatro experimentos independientes. Las comparaciones estadísticas entre los datos se realizaron mediante un test de análisis de varianza de dos vías (ANOVA). La significación estadística se definió como un valor de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. MICROSCOPIA Y TOPOGRAFÍA DE LAS SUPERFICIES DE TITANIO

En la Figura 1 se muestran imágenes de microscopía láser de barrido confocal de las diferentes rugosidades obtenidas de los discos ensayados. Las principales características superficiales (es decir, rugosidad, ángulo de contacto) de los grupos de estudio se resumen en la Tabla 1 y los perfiles obtenidos mediante microscopio interferométrico se representan en la Figura 2.

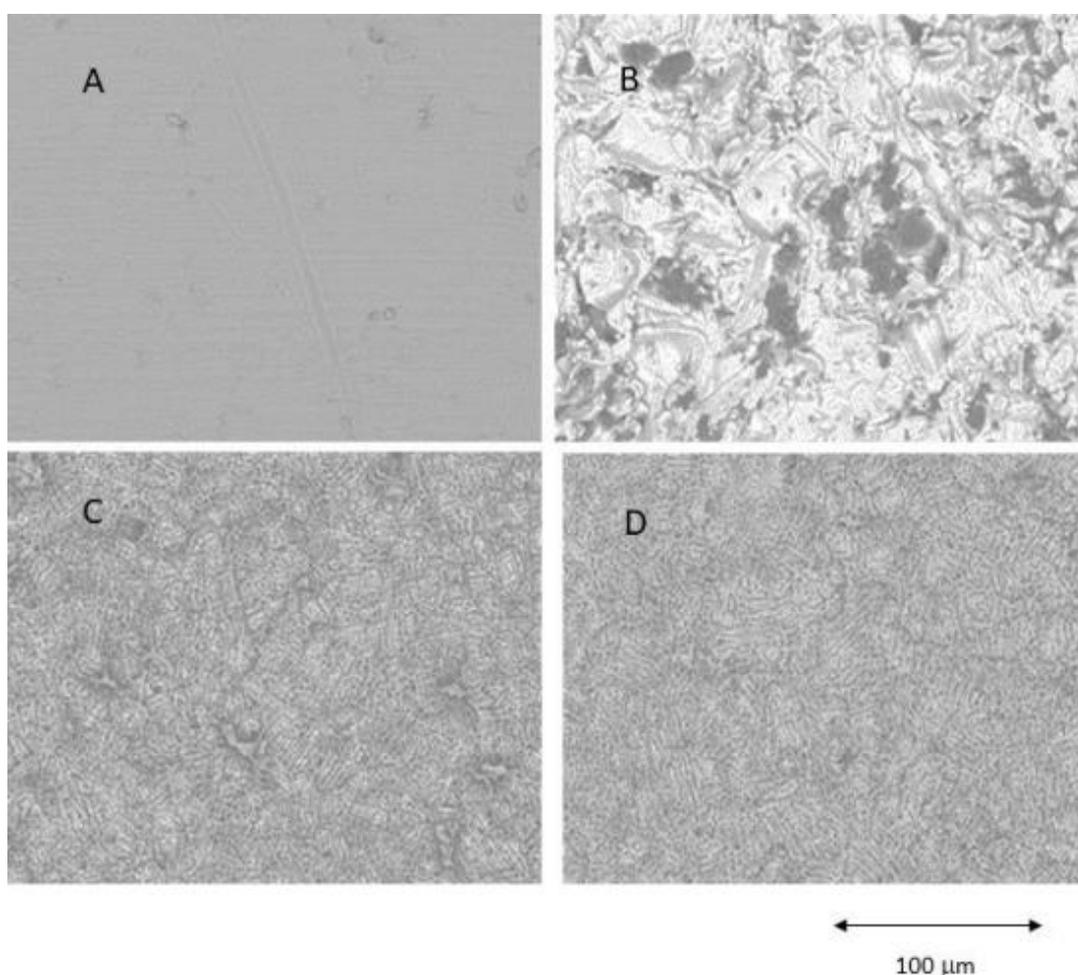


Figura 1

Diferentes superficies observadas mediante microscopio electrónico de barrido. (A) Mecanizado (MACH), (B) Arenado (GBLAST), (C) Arenado y grabado ácido (GBLAST+AE), (D) Grabado ácido (AE).

RESULTADOS

Los resultados mostraron que las superficies grabadas con ácido producen una rugosidad mayor que las muestras mecanizadas. Los discos tratados con arenado muestran una rugosidad mayor que los grabados con ácidos y mecanizados. Las superficies arenadas presentaron valles y picos más agudos y algunos residuos del óxido de aluminio utilizado para la proyección de partículas abrasivas. La superficie arenada seguida con grabado ácido mostró que la rugosidad del arenado se mantiene, pero los ángulos agudos de la rugosidad se reducen debido al ácido de grabado. Una microrrugosidad producida por grabado ácido se observa en la macrorrugosidad obtenida mediante arenado.

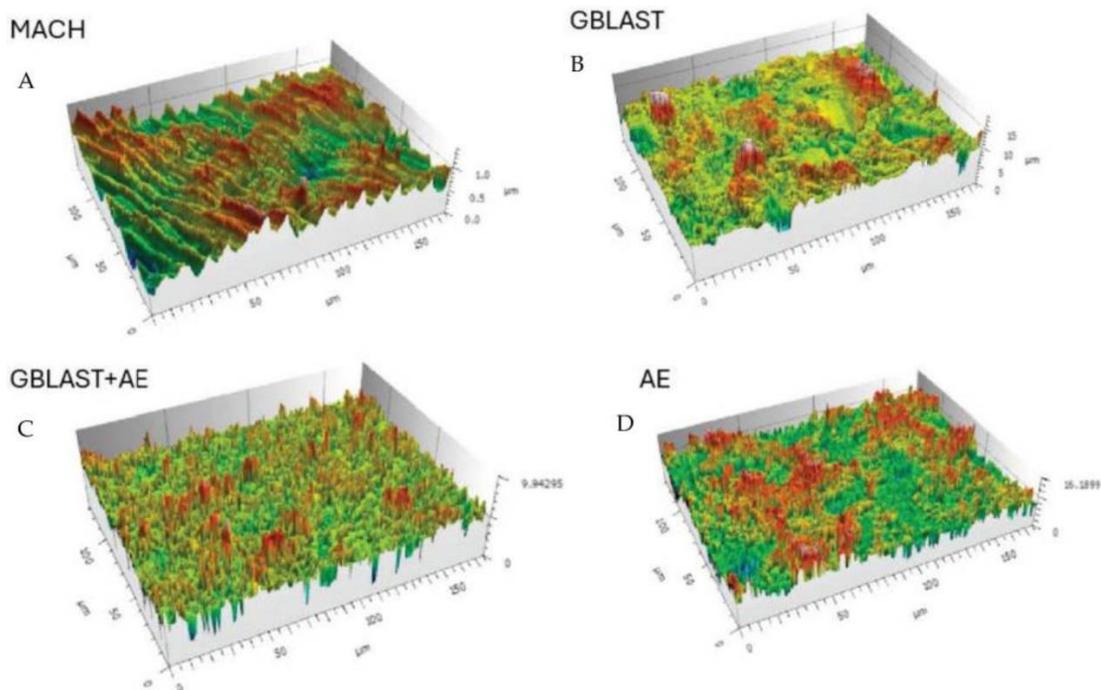


Figura 2

Superficies de los diferentes tratamientos observadas mediante imágenes de Microscopía Láser de Barrido Confocal. (A) Mecanizado (MACH), (B) Arenado (GBLAST), (C) Arenado y grabado ácido (GBLAST+AE), (D) Grabado ácido (AE).

RESULTADOS

Los estudios de microanálisis por dispersión de energía de rayos X para todas las muestras de discos de titanio con superficie arenada y con superficie arenada+grabada indican que la cantidad de alúmina es inferior al 4 % en las superficies de titanio. No se detectó ninguna otra contaminación en ninguna de las otras superficies.

Los resultados de microdureza indican valores para superficies mecanizadas de 178 HVN (sd 23), para superficies grabadas de 188 HVN (sd 17), para arenadas tratadas con pulverización abrasiva de 265 (sd 23), y para arenadas+grabadas de 268 (sd 23). Estos resultados indican diferencias significativas entre las superficies mecanizadas y grabadas con respecto a arenadas y para arenadas+grabadas. Esto se puede explicar por la copresión ejercida sobre la proyección de las partículas abrasivas. Entre las superficies mecanizadas y grabadas, así como entre arenadas y arenadas+grabadas, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$).

Superficies	Rugosidad		Ángulo de contacto (°)	
	(Sa) (µm)	a	H2O	Formamida
MACH	0,22 ± 0,09 *	1,09 ± 0,09 *	53,4 ± 6,1 *	31,6 ± 4,3 *
GBLAST	2,06 ± 0,20 **	1,66 ± 0,32 **	89,5 ± 9,9 **	63,2 ± 10,3 **
AE	1,28 ± 0,17 *	1,27 ± 0,25 *	59,4 ± 2,2 *	36,6 ± 6,2 *
GBLAST + AE	2,22 ± 0,19 **	1,76 ± 0,27 **	92,3 ± 4,9 **	70,2 ± 12,3 **

Tabla 1

La descripción de la rugosidad superficial (Sa), la relación de rugosidad (r) y el ángulo de contacto se muestran en media ± desviación estándar. Los asteriscos indican la diferencia estadísticamente significativa con $p < 0,001$. Los valores del ángulo de contacto se modificarán siguiendo la ecuación de Wenzel.

RESULTADOS

Superficie	Energía libre superficial (mJ/m ²)		
	Energía libre superficial total	Componente dispersivo	Componente polar
MACH	49,6 ± 3,3 *	30,20 ± 4,32 *	19,40 ± 2,88 *
GBLAST	38,8 ± 4,0 **	14,20 ± 2,21 *	24,60 ± 1,50 **
AE	46,5 ± 3,5 *	30,99 ± 0,85 *	15,51 ± 2,90 **
GBLAST + AE	39,3 ± 2,7 **	12,10 ± 2,34 *	27,20 ± 5,15 *

Tabla 2

Ángulo de contacto del agua, energía libre superficial y sus componentes para las diferentes superficies de Ti. Los valores son la media ± error estándar de la media. Las diferencias estadísticas frente a superficies lisas para cada columna se indican mediante símbolos de asterisco simple y doble ($p < 0,05$).

2. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LA SUPERFICIE DE LOS DISCOS DE TITANIO

2.1. VIABILIDAD CELULAR

Las células madre amnióticas mesenquimales (hAMSC) y las epiteliales (hAECs) se cultivaron en las superficies de titanio durante 1, 7 y 14 días. Se observó un aumento significativo de la viabilidad celular en las hAMSC en superficies arenadas después del cultivo durante 7 días, medido mediante el ensayo MTT.

Después de 14 días de cultivo, la viabilidad celular aumentó en las superficies mecanizadas, arenadas y arenadas+grabadas (MACH, GBLAST y GBLAST + AE) en comparación con el control del día 1 (Figura 3A). Se observaron resultados similares cuando se cultivaron hAECs en diferentes superficies de discos de Ti (Figura 3B).

RESULTADOS

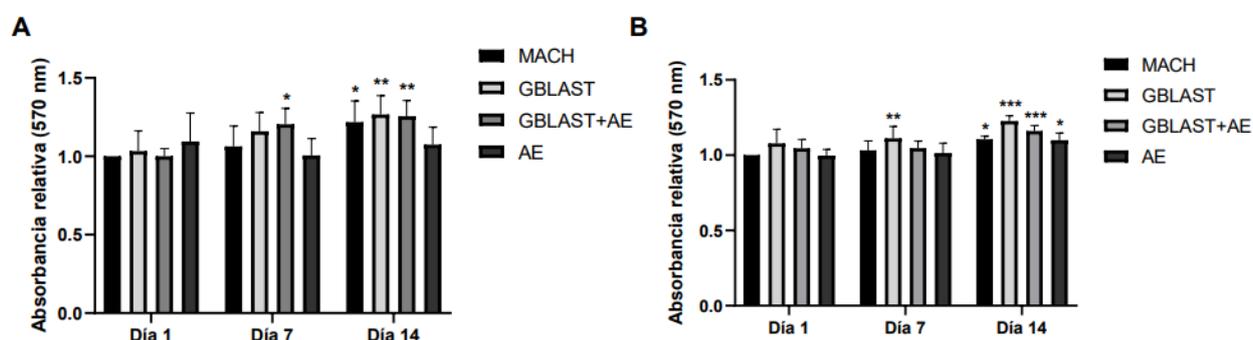


Figura 3

Viabilidad celular de (A) hAMSCs y (B) hAECs cultivadas en diferentes superficies de titanio. Los datos se presentan como media \pm DE. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. día de control 1.

2.2. ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ALCALINA

La actividad de ALP sirve como marcador para monitorear las primeras etapas de los osteoblastos. La actividad enzimática se midió para investigar la diferenciación osteogénica de las células madre amnióticas humanas cultivadas en las diferentes superficies de los discos de Ti.

El día 14, la actividad de ALP aumentó significativamente en las hAMSCs cultivadas en superficies tratadas arenadas y arenadas+grabadas (GBLAST y GBLAST+AE) en comparación con la superficie mecanizada (MACH) del día 1 (Figura 4A).

Por el contrario, al evaluar la actividad de ALP en cultivos de hAECs, no hubo diferencias significativas en ninguna de las superficies estudiadas (Figura 4B).

RESULTADOS

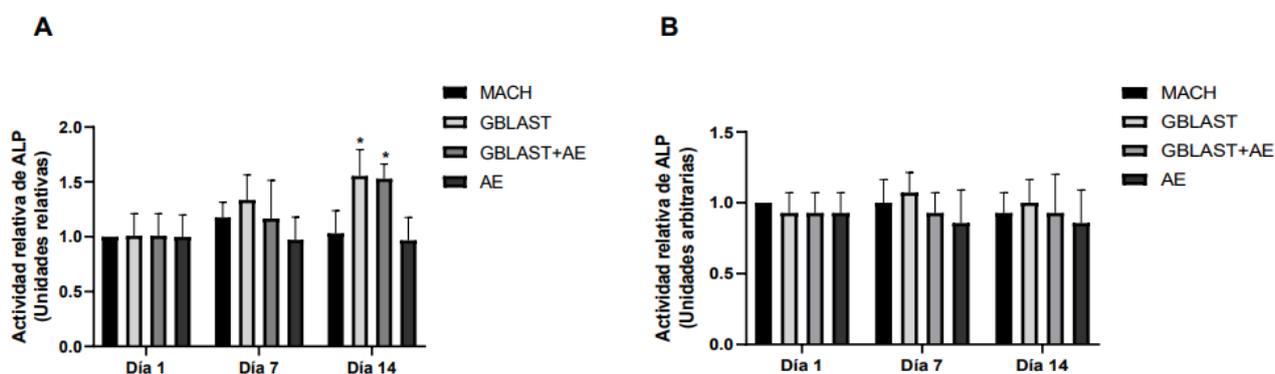


Figura 4

Actividad de ALP en (A) hAMSCs y (B) hAECs cultivadas en diferentes superficies durante 1, 7 y 14 días. Los datos se representan como media \pm DE. * $p < 0,05$ vs. día de control 1.

2.3. CONSUMO DE CALCIO

La ingesta de calcio, indicativa de la diferenciación osteogénica tardía y compatible con la existencia de osteoblastos maduros durante la formación ósea, se determinó en medios de cultivo de hAMSC y hAECs a los 1, 7 y 14 días.

Como se muestra en la Figura 5A, la ingesta de calcio de las hAMSCs aumentó significativamente en las superficies tratadas con arenado, arenado+grabado y grabado ácido (GBLAST, GBLAST+AE y AE) a los 14 días de cultivo.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de calcio en los cultivos de hAECs en ninguna de las superficies en los días de cultivo analizados (Figura 5B).

RESULTADOS

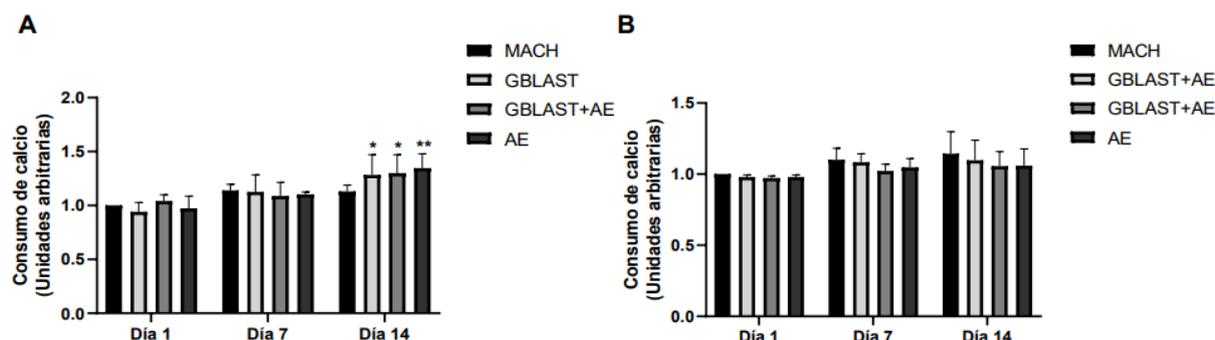


Figura 5

Ingesta de calcio de (A) hAMSCs y (B) hAECs cultivadas en diferentes superficies durante 1, 7 y 14 días. Los datos se presentan como media \pm DE. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. día de control 1.

3. EXPRESIÓN GÉNICA OSTEOGÉNICA

La expresión de marcadores osteogénicos, como OSTERIX, factor de transcripción relacionado con runt 2 (RUNX2), fosfatasa alcalina (ALP) y osteopontina (OPN), se evaluó mediante qRT-PCR en hAMSCs a los 1 y 14 días de cultivo (Figura 6).

La Figura 6 muestra un aumento significativo en los niveles de expresión de OSTERIX, RUNX2, ALP y OPN en hAMSCs que se cultivaron en superficies arenadas (GBLAST) durante 14 días. Además, la combinación de tratamientos con arenado y grabado ácido (GBLAST y AE) induce un aumento significativo en la expresión de OSTERIX y ALP (Figura 6 A,C).

RESULTADOS

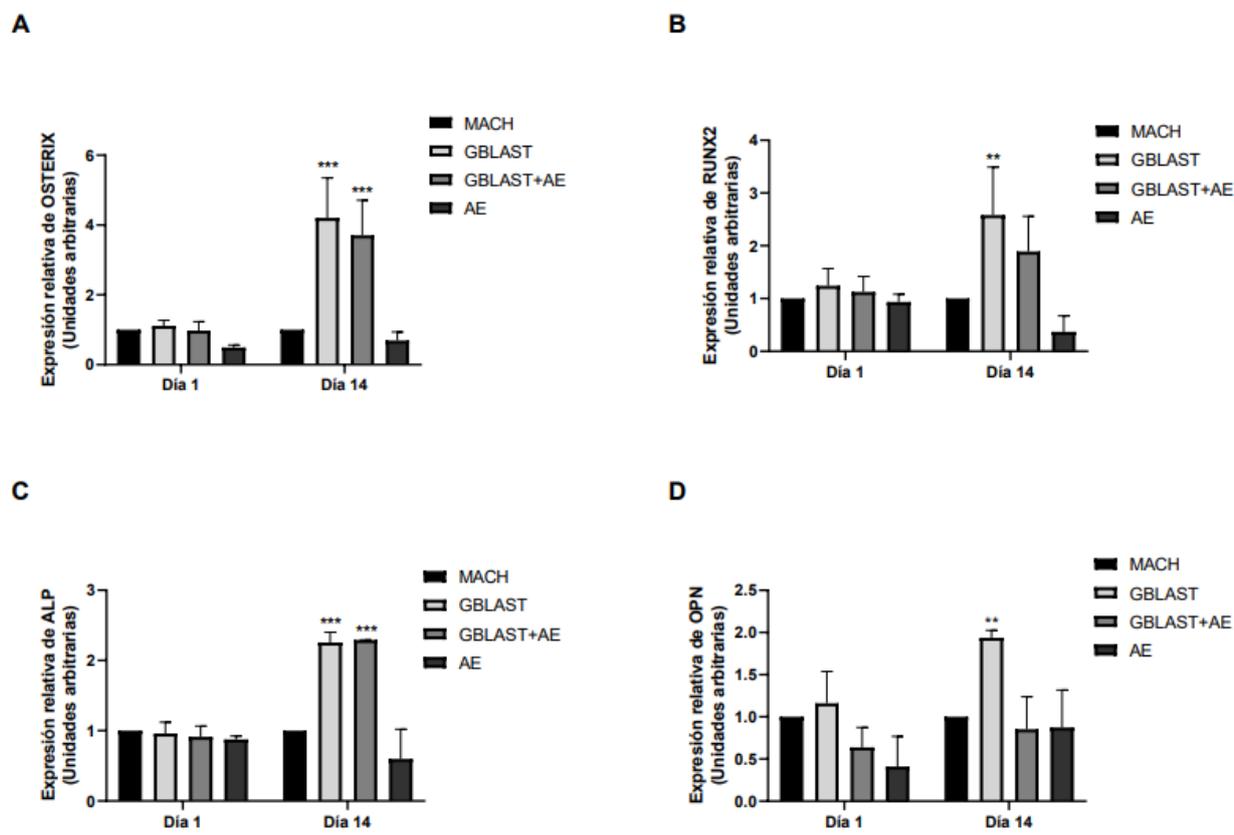


Figura 6

Resultados de RT-PCR cuantitativa de la expresión del gen osteogénico del ARNm en hAMSCs, (A) OSTERIX, (B), RUNX2, (C) ALP y (D) OPN. Los datos se presentan como media \pm DE. ** p<0,01, *** p<0,001 frente al control respectivo.

4. EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS SUBUNIDADES DE INTEGRINA α Y β

Las integrinas desempeñan un papel crucial en la unión de las células a las proteínas que se adsorben en la superficie de un implante (Figura 7). Para investigar más a fondo los mecanismos de interacción entre las hAMSCs y la superficie arenada (GBLAST), se analizó la expresión genética de las subunidades de integrina α y β , medidas por qRT-PCR. Las

RESULTADOS

figuras 7A y 7D mostraron que solo las subunidades de integrina $\alpha 2$ y $\beta 1$ se regularon positivamente en hAMSCs a los 14 días en la superficie arenada (GBLAST), en comparación con la superficie de actuación mecanizada (MACH).

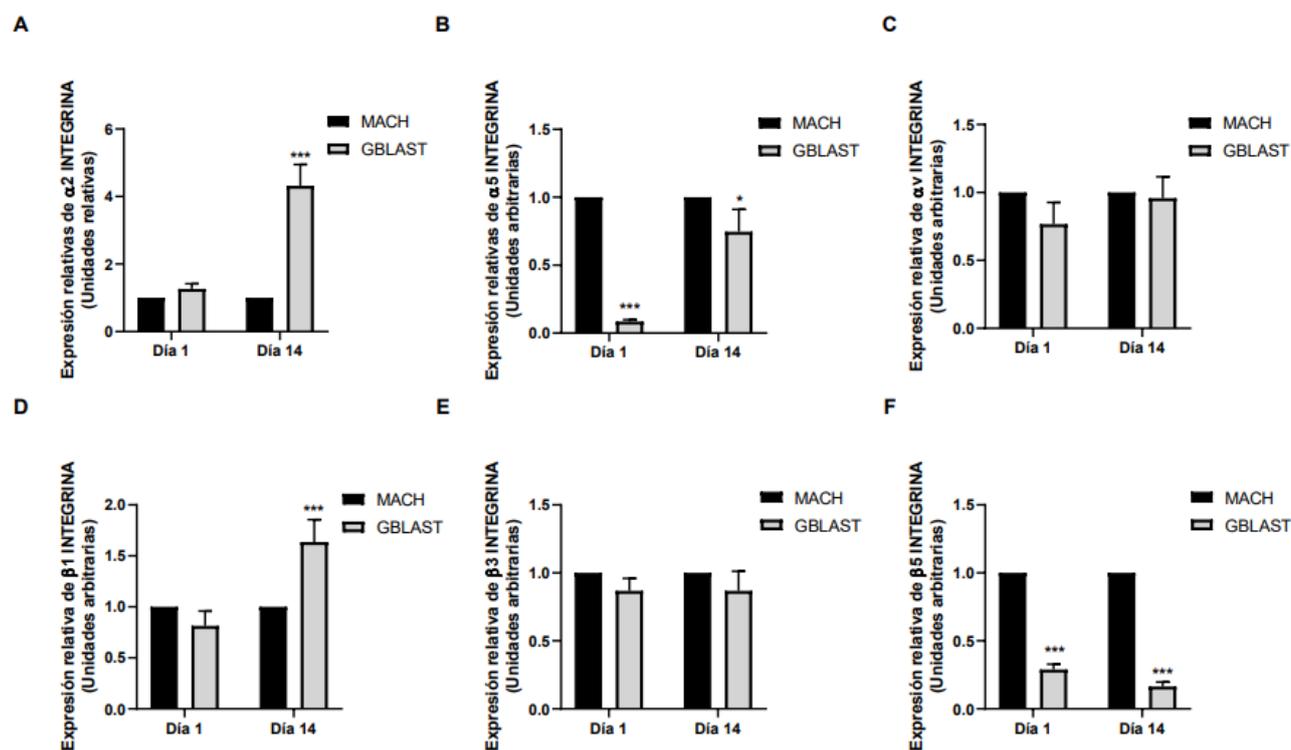


Figura 7

Resultados de RT-PCR cuantitativa de la expresión génica de las subunidades α y β de la integrina del ARNm en hAMC, (A) $\alpha 1$, (B) $\alpha 5$, (C) αv , (D) $\beta 2$, (E) $\beta 3$ y (F) $\beta 5$. Los datos se presentan como media \pm DE. * p < 0,05, *** p < 0,001 frente al control respectivo.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El presente estudio de investigación doctoral presenta la influencia de cuatro superficies de titanio diferentes en el comportamiento biológico de las células madre derivadas de la membrana amniótica humana. Nuestros hallazgos indican que los implantes de superficie de titanio con diferentes tratamientos de superficie afectan la proliferación y diferenciación de las células madre amnióticas mesenquimales (hAMSC) y las células madre amnióticas mesenquimales (hAEC). Estos tratamientos de las superficies de titanio, que provocan modificaciones de la topografía, la hidrofilia y las propiedades químicas, afectan positivamente las respuestas de las hAMSC y las hAEC. En, general, las superficies con arenado y arenado+grabado podrían mejorar la osteogénesis.

La topografía de la superficie y las propiedades fisicoquímicas de los implantes de titanio son características cruciales para la osteointegración. Las características de la topografía microscópica pueden aumentar la osteointegración mediante el contacto directo entre el hueso y el implante y la resistencia a las cargas funcionales en las superficies de titanio ^{19,100,106}.

Diversos estudios han demostrado que las modificaciones de la superficie de los implantes dentales pueden incrementar la respuesta ósea del huésped, mejorando el grado de contacto hueso-implante, y como consecuencia mejorando el nivel de osteointegración, lo que es muy importante para el tratamiento clínico con los implantes de superficie tratada ^{19,100,106}.

Además, se ha informado que las modificaciones de la superficie, que afectan tanto a la topografía como a la química de la superficie, tienen una influencia importante en la adhesión, la proliferación y la

DISCUSIÓN

diferenciación de células específicas (es decir, los osteoblastos) a través de una interacción directa entre las células y la superficie del implante ^{94,106}.

Estos tipos de superficies presentan resultados experimentales de un incremento en la adherencia celular (estudios *in vitro*), y una mayor y más rápida unión hueso-implante (estudios *in vivo*) ^{19,94,100,106}. Los estudios *in vitro* demuestran que estas superficies rugosas incrementan la actividad de los osteoblastos con una mayor producción de proteínas morfogenéticas que acelera la respuesta biológica celular ^{19,94,100,106}.

Los estudios *in vivo* en animales de experimentación demuestran que la unión de estas superficies rugosas mejora la unión del implante al tejido óseo. En este sentido, los estudios histomorfométricos confirman una mayor diferencia en el porcentaje de unión hueso-implante entre estas superficies y las mecanizadas; y así mismo los valores de la fuerza de torque necesarias para la remoción de los implantes insertados son mayores en los implantes con superficies tratadas, lo que demuestra un mayor anclaje histológico y funcional ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

De hecho, se han desarrollado varios tratamientos de superficie (arenado, grabado ácido y combinación de ambos) para mejorar la osteointegración. Es decir, las diferentes superficies de los implantes han sido tratadas con diversas sustancias (arenado de alúmina, etc.) y/o ácidos (clorhídrico, nítrico, sulfúrico) que han provocado en su superficie diversos grados de rugosidad, manifestadas por valles, cavidades o fisuras con el objetivo de lograr una superficie más biocompatible y que mejore su unión con el hueso del paciente ¹¹⁰⁻¹¹¹.

Los implantes con superficie arenada han demostrado que incrementan la adhesión, proliferación y diferenciación osteoblástica. En

DISCUSIÓN

este sentido, la rugosidad y las características topográficas son aspectos muy relevantes para el éxito de la oseointegración. La topografía afecta a la interacción celular, que influye en la orientación, migración, crecimiento y diferenciación de las células que se adhieren a la superficie estimulando la oseointegración de los implantes dentales ^{19,106,110}.

Los implantes con superficie grabada con diferentes combinaciones de ácidos (ácido nítrico, clorhídrico, sulfúrico, etc.) han sido introducidos para incrementar su rugosidad y mejorar su respuesta biológica. La respuesta celular es estimulada, y la actividad de la fosfatasa alcalina y la osteocalcina se incrementan notablemente, lo que indica que las características químicas de las superficies tratadas con ácidos, juegan un importante papel en la viabilidad celular pudiendo mejorar la oseointegración ¹¹²⁻¹¹³.

La superficie arenada + grabada incluye en la misma superficie dos técnicas de tratamiento, el arenado y el grabado ácido. Esta superficie presenta una gran evidencia científica de estudios experimentales que demuestran su eficacia. Esta superficie presenta un incremento de la rugosidad pudiendo mejorar la adhesión de células de estirpe osteoblástica y tener un efecto sobre la configuración y conformación de pseudópodos celulares lo que aumentaría la proliferación celular, e influyendo en la expresión fenotípica de los osteoblastos ¹¹⁴⁻¹¹⁶.

Los resultados de este estudio doctoral, son confirmados por la topografía, y observados mediante la utilización de un microscopio electrónico de barrido y posteriormente mediante la microscopía de barrido confocal. Los diferentes perfiles muestran que la superficie con mayor rugosidad se obtuvo con el tratamiento de arenado. Sin embargo, el análisis

DISCUSIÓN

mostró que el grabado ácido reduce ligeramente la rugosidad de la superficie. Según varios informes, los niveles de rugosidad obtenidos por los tratamientos de arenado (GBLAST) y arenado+grabado (GBLAST + AE) están en el rango de rugosidad óptima para la adhesión de células osteoblásticas ^{111,117-118}.

En este sentido, la topografía de la superficie del implante influye en la proliferación osteoblástica, la diferenciación y la expresión de proteínas de la matriz extracelular. Se cultivaron células de osteoblastos en diferentes grupos de superficies de titanio. La topografía de la superficie tratada con una solución mixta de ácidos fue analizada mediante microscopia de barrido y espectrometría dispersa de rayos X, demostrando una mayor rugosidad, menor nivel de citotoxicidad y mejor biocompatibilidad que los controles con superficie mecanizada ¹¹⁷.

Estos resultados son confirmados por otro estudio que evalúa como la topografía de la superficie puede influir en la diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales mediante el análisis de los niveles de expresión de genes relacionados con el hueso y el marcador de células madre ¹¹⁸. Al comparar los discos mecanizados y los discos con superficie arenada+grabada a alta temperatura, la RT-PCR cuantitativa en tiempo real mostró una reducción significativa de los genes relacionados con el hueso osteocalcina (BGLAP) y factor de transcripción de osteoblastos (RUNX2). El presente estudio demostró que la topografía de la superficie del implante afecta la expresión génica de los osteoblastos ¹¹⁸.

Nuestros resultados muestran una mayor viabilidad celular para las superficies arenadas (GBLAST) y arenadas + grabadas (GBLAST + AE) en comparación con las superficies mecanizadas (MACH) y grabadas con

DISCUSIÓN

ácidos (AE). Esto puede explicarse por el hecho de que las superficies con alta energía superficial promueven la adhesión celular. En este sentido, se ha observado que los osteoblastos cultivados en superficies rugosas como arenadas + grabadas (GBLAST + AE) interactúan con este tipo de superficie a través de filopodios ¹¹⁹⁻¹²⁰.

Los estudios que examinan la respuesta de los osteoblastos a las características químicas de la superficie de implantes indican que las superficies hidrófilas son osteogénicas, pero las superficies deben exhibir una mayor energía superficial para que se produzca una mayor actividad de la fosfatasa alcalina y osteocalcina y generar un microambiente osteogénico debido en parte a los efectos estimulantes de la alta energía superficial sobre los osteoblastos ¹¹⁹.

Este estudio de investigación doctoral también demuestra que la rugosidad produce valores de ángulo de contacto más altos en superficies tratadas con arenado, lo que indica una mayor hidrofobia. Los valores de las superficies rugosas han sido corregidos angularmente según la ecuación de Wenzel ¹²¹⁻¹²³. La energía superficial puede ser un aspecto que favorecerá la actividad de las células osteoblásticas. La energía superficial/humectabilidad indica el equilibrio entre las interacciones intermoleculares cuando una superficie sólida y un líquido se ponen en contacto.

Se sabe que una mayor energía superficial/humectabilidad promueve la diferenciación de células madre mesenquimales a un linaje osteogénico, así como facilita el contacto implante-hueso. Las modificaciones de la morfología de la superficie por rugosidad pueden cambiar la carga y

DISCUSIÓN

energía superficial y, de esta manera, promover la respuesta biológica de las células.

Varios informes indican que las superficies de implantes que tienen mayor energía superficial/humectabilidad son más adecuadas para la adhesión y proliferación celular en comparación con las superficies que presentan menor energía superficial ^{67,124}.

En este sentido, la caracterización de la morfología de la superficie mediante microscopía electrónica de barrido y microscopía de fuerza atómica puede revelar diferencias entre diversas superficies de implantes. Las superficies arenadas + grabadas presentan una importante energía superficial/humectabilidad que puede promover la absorción de proteínas osteogénicas y mejorar la osteointegración. Las hBMSC sembradas en estas superficies exhiben un mejor desempeño en términos de adhesión celular, proliferación y diferenciación osteoblástica ¹²⁴.

Los niveles de microdureza también son más altos en superficies tratadas con arenado, porque la proyección de partículas abrasivas provoca una deformación plástica del titanio generando un estado de tensión compresiva residual. Esta tensión residual mejora las propiedades mecánicas de fatiga ya que inhibe la formación de grietas en la superficie del metal ^{106,119}.

Las propiedades superficiales de los implantes de titanio, como la topografía, la rugosidad, la humectabilidad y la química, tienen un impacto significativo en la actividad celular ^{106,125-126}. De hecho, la interacción de las células con la matriz extracelular en la interfase de un implante determina la biología de las células y los tejidos. La microscopía electrónica de barrido y la perfilometría revelan el tipo de topografía. Las

DISCUSIÓN

células osteoblásticas suelen mostrar un mayor crecimiento en superficies con baja rugosidad, aunque sin una correlación directa con la topografía de la superficie ¹²⁶.

Se ha demostrado que las superficies de Ti nanoestructuradas en gradiente promueven la adhesión y proliferación de hAMSC *in vitro*. Además, la morfología de hAMSC en las superficies exhiben un crecimiento importante y pseudópodos extendidos ¹²⁷. Estos hallazgos experimentales indican que los materiales de Ti nanoestructurados en gradiente podrían mejorar tanto la diferenciación osteogénica como las propiedades mecánicas, lo que puede tener aplicaciones más amplias en la ingeniería de tejidos óseos y la implantación clínica ¹²⁷.

Los resultados del presente estudio de investigación doctoral demuestran que las hAMSC y hAEC se cultivaron con éxito en superficies de titanio durante 1, 7 y 14 días. Se observó un aumento significativo en la viabilidad celular en hAMSC en superficies arenadas (GBLAST) después de cultivar durante 7 días. Después de 14 días de cultivo, la viabilidad celular aumentó en superficies mecanizadas (MACH), arenadas (GBLAST) y arenadas + grabadas (GBLAST + AE). Se observaron resultados similares cuando las hAEC se cultivaron en diferentes superficies.

Este estudio de investigación doctoral analizó también los efectos de los implantes de superficie de titanio con diferentes tratamientos de superficie sobre la proliferación y diferenciación de hAMSCs y hAECs. Nuestros resultados *in vitro* confirman que el tratamiento de la superficie de titanio, que produce modificaciones en la topografía, hidrofilia y propiedades químicas de los implantes de titanio, es positivo para las respuestas de hAMSCs y hAECs. Estos hallazgos biológicos son

DISCUSIÓN

importantes porque han demostrado la viabilidad celular intensa de las células madre amnióticas en todas las superficies analizadas.

De hecho, diversos estudios *in vitro* confirman el efecto de las modificaciones de la topografía y las propiedades fisicoquímicas de las superficies de titanio en el comportamiento de las células madre y la osteogénesis ^{16-18,127}. Varias superficies (es decir, arenado, grabado ácido, zirconio) han demostrado una osteointegración mejorada a través de la estimulación directa del microambiente de las células madre. Recientemente se ha informado que los implantes de titanio con diferentes rugosidades superficiales, nanoestructuras y humectabilidad, fabricados mediante la modificación de titanio arenado y grabado ácido mediante tratamiento con H₂O₂, mejoran significativamente el crecimiento y la proliferación de la adhesión celular ¹⁶.

En este sentido, la micro/nanotopografía superficial y las propiedades fisicoquímicas de los implantes de titanio son esenciales para la osteogénesis. Sin embargo, la influencia de estas características superficiales en los comportamientos de las células madre y la osteogénesis aún no se comprende por completo. Los estudios celulares *in vitro* han demostrado que la superficie arenada+grabada con nanoestructuras, rugosidad y humectabilidad, podría mejorar significativamente el comportamiento de las células madre mesenquimales óseas y la osteogénesis en la superficie lo que tendría un gran potencial para la implantología dental ¹⁶.

Además, la adhesión celular temprana, la migración y la diferenciación eficiente de las células madre a osteoblastos son clave para colonizar la superficie de los implantes dentales. En este sentido, todos

DISCUSIÓN

estos fenómenos celulares previenen la formación de biopelículas y la infección asociada a los implantes. De hecho, la micro-nano-rugosidad del titanio da como resultado una maduración más rápida de los osteoblastos/osteocitos y la diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales (MSC) ¹⁷.

En el presente estudio de investigación doctoral se evaluó también, los niveles de expresión de ARNm de ciertos genes reguladores maestros de la diferenciación de osteoblastos (RUNX2 y OSTERIX) en hAMSC a los 14 días de cultivo. RUNX2 y OSTERIX son genes de factores de transcripción para la diferenciación osteogénica. Se ha demostrado que RUNX2 es esencial para la diferenciación de MSC en preosteoblastos, y OSTERIX es un factor de transcripción específico de osteoblastos para la diferenciación de preosteoblastos en osteoblastos maduros ⁶⁷.

El comportamiento de las células madre mesenquimales humanas en una superficie arenada + grabada, fue analizada, demostrando que este tipo de superficie puede mejorar la función de las células madre relacionadas con la osteogénesis, y estimular los eventos celulares tempranos como el crecimiento, la adhesión focal y la expresión de ARNm de genes críticos relacionados con la adhesión y promover la diferenciación completa de las células madre humanas en osteoblastos maduros ⁶⁷.

En este contexto, nuestro estudio de investigación doctoral muestra que las superficies arenadas (GBLAST) y arenadas + grabadas (GBLAST + AE) produjeron un aumento en la expresión de RUNX2 y OSTERIX de 4,2 veces y 3,7 veces, respectivamente, en comparación con la superficie de control mecanizada (MACH). Estos hallazgos indican que una superficie con modificación arenada o arenada+grabada es eficaz para iniciar el

DISCUSIÓN

primer paso en la cascada relacionada con la osteogénesis de las hAMSC, promoviendo la regulación positiva de factores de transcripción críticos específicos del hueso.

El presente estudio también ha cuantificado la expresión de ARNm de algunos genes marcadores de fenotipo que indican las etapas de diferenciación osteoblástica temprana de fosfatasa alcalina (ALP) y madura de osteopontina (OPN). Después de 14 días de incubación, se observó un aumento de la expresión de ALP en las superficies arenadas (GBLAST) y arenadas + grabadas (GBLAST + AE), lo que indica una diferenciación osteoblástica temprana en ambas superficies tratadas.

Sin embargo, parece que las últimas etapas de la diferenciación osteoblástica, detectadas por la expresión de osteopontina (OPN), solo ocurren en superficies arenadas (GBLAST) a los 14 días de cultivo. Este resultado sugiere un posible retraso en la progresión de la diferenciación osteoblástica en superficies tratadas con arenado y grabado (GBLAST + AE), posiblemente requiriendo un período de cultivo prolongado para su finalización. Ninguno de los genes osteoblásticos evaluados se detectó en hAEC durante los 14 días de cultivo.

La fosfatasa alcalina (ALP) es un marcador de diferenciación de osteoblastos de uso común. Esta enzima desempeña un papel en la formación, maduración y mineralización de la matriz extracelular al mejorar la concentración de iones de fosfato e inhibir la acción del éster fosfórico¹²⁸⁻¹²⁹.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio demuestran que después de 14 días de cultivo de hAMSC, la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) aumentó significativamente en las superficies tratadas con arenado (GBLAST) y arenado+grabado (GBLAST + AE). La ausencia de actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) en el sobrenadante de los cultivos de hAEC indica que estas células no se diferenciaron en osteoblastos en ninguna de las superficies tratadas utilizadas en nuestro estudio. El hecho de que solo las hAMSC mostraran diferenciación osteogénica cuando se cultivaron en las superficies tratadas puede explicarse por las diferencias en la capacidad de diferenciación osteogénica ya informadas entre estas células y las hAEC.

Un estudio demuestra que las hAEC mostraron una capacidad de diferenciación osteoblástica, sin embargo, las hAMSC mostraron un fenotipo osteoblástico más alto cuando se cultivaron bajo estimulación osteogénica. Esta investigación confirmó una menor actividad de ALP y mineralización extracelular de las hAEC en comparación con las hAMSC. Con base en esta evidencia previa, es posible que las hAEC no respondan a las diferentes superficies cambiando su fenotipo a uno más osteoblástico como lo observaron las hAMSC ⁸².

La actividad de mineralización es un signo fundamental de la fase tardía de la diferenciación osteogénica ¹³⁰. Para mejorar la respuesta celular sobre superficies de titanio y, por lo tanto, su osteointegración, la superficie de titanio se biofuncionalizó con fibronectina y elastina que regulan la diferenciación de las células madre al respaldar el microambiente biológico. En particular, la adhesión y proliferación de células madre mesenquimales humanas aumentó significativamente en el titanio recubierto con las proteínas induciendo una diferenciación

DISCUSIÓN

osteogénica, como la actividad de la fosfatasa alcalina y la actividad de mineralización, para mejorar la regeneración ósea ¹³⁰.

Las hAMSC aceleraron las tasas de deposición mineralizada en las superficies de implantes inyectadas en modelos de elevación del seno maxilar de conejos. Además, las hAMSC mejoraron la formación ósea diferenciándose en células osteoblásticas ¹³¹. El volumen óseo, el volumen óseo/volumen tisular, la relación de contacto hueso-implante y las estructuras similares a vasos en el grupo tratado con hAMSC fueron significativamente mejores. Las actividades de la fosfatasa alcalina de las hAMSC fueron muy altas. Las observaciones mostraron que las hAMSC aceleraron las tasas de deposición mineralizada en las superficies de los implantes y en las áreas aumentadas con hueso. Estos datos demostraron que las hAMSC podrían mejorar la osteointegración del implante y la regeneración ósea después de la elevación de seno maxilar y podrían usarse para optimizar la implantación dental en el futuro ¹³¹.

Los resultados del presente estudio de investigación doctoral demostraron que el consumo de calcio de las hAMSC aumentó significativamente el día 14 en las todas las superficies tratadas arenadas (GBLAST), arenadas + grabadas (GBLAST+ AE) y grabadas con ácidos (AE). En línea con los resultados anteriores sobre la actividad de ALP, no se detectaron niveles de calcio en los cultivos de hAEC.

Se sabe que la rugosidad de la superficie influye en la concentración y la actividad biológica de las proteínas adsorbentes y el comportamiento celular posterior ¹³². Las integrinas son los vínculos entre las células y la matriz extracelular y desempeñan un papel crucial en los transductores de señales para regular el crecimiento, la diferenciación y la motilidad celular

DISCUSIÓN

¹³³. Si bien es evidente que todas las moléculas extracelulares son parte integral de un organismo multicelular, resulta paradójico que a menudo se las considere dissociadas de las células. Las interacciones dinámicas vinculan el entorno intracelular a través de receptores de la superficie celular con conjuntos extracelulares multimoleculares. Estas interacciones no solo controlan el comportamiento de las células individuales, sino que también determinan la arquitectura tisular. Los receptores de integrina modulan eventos de señalización que son esenciales para la diferenciación celular ¹³³.

De hecho, la integrina $\alpha 2\beta 1$, se une a los sitios del colágeno tipo I, que media la respuesta de los osteoblastos a las superficies de implantes de Ti micro y nanoestructurados en las células madre ¹³⁴. Las células madre pueden exhibir características de osteoblastos (fosfatasa alcalina, RUNX2 y osteocalcina) cuando crecen en superficies microestructuradas de titanio que son suficientes para inducir la diferenciación de células madre a osteoblastos. Esta diferenciación se debía a la señalización a través de las integrinas $\alpha 2\beta$ en los osteoblastos en la superficie ¹³⁴.

De manera similar, la introducción de la microrrugosidad de la superficie del titanio disminuyó la proliferación y mejoró la diferenciación osteogénica en las células osteoblásticas mediada por la integrina $\alpha 2\beta 1$. Además, el silenciamiento de las subunidades $\alpha 2$ o $\beta 1$ resultó en un aumento de la proliferación celular y una reducción de la diferenciación celular comparable a las células de tipo salvaje en superficies de Ti más lisas ¹³⁵. Nuestros resultados indican que las superficies arenadas (GBLAST) podrían mejorar la diferenciación osteoblástica de las hAMSC.

DISCUSIÓN

En este contexto, el presente estudio de investigación doctoral evaluó las diferencias en la expresión génica de las subunidades de integrina $\alpha 2$, $\alpha 5$, αv , $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 5$ en las hAMSC entre las superficies arenadas (GBLAST) y mecanizadas (MACH). Los hallazgos experimentales describieron una mayor expresión de las hAMSC $\alpha 2$ y $\beta 1$ en la superficie arenadas (GBLAST). Estos resultados sugieren que la superficie de Ti tratada con arenado modula la diferenciación osteogénica de las hAMSC a través de la interacción de las integrinas $\alpha 2/\beta 1$. Es necesario realizar más estudios para revelar el mecanismo de diferenciación osteogénica de las hAMSC en las superficies arenadas (GBLAST).

Las células madre amnióticas humanas son reconocidas por sus ventajas, en particular su capacidad inmunomoduladora y su estatus inmunoprivilegiado, sobre otros tipos de células madre para aplicaciones en terapia celular ^{72,82}. En este sentido, las hAMSC se han utilizado en varios estudios, demostrando su potencial inmunomodulador y regenerativo óseo. La regeneración ósea se ha convertido en un foco de investigación y un objetivo terapéutico en el campo de la medicina ósea y articular. La terapia basada en células madre tiene como objetivo promover la regeneración endógena y mejorar los efectos terapéuticos y los efectos secundarios de la reconstrucción tradicional de defectos y trastornos óseos significativos. Las hAMSC son células también con funciones superiores en la regulación inmunitaria, inflamación y la regeneración tisular vascularizada ⁸².

Las células madre, incluidas las células madre embrionarias, las células madre pluripotentes inducidas y las células madre adultas, pueden reparar o reemplazar tejidos dañados o degenerativos y mejorar la recuperación funcional en modelos experimentales y ensayos clínicos ⁷². Sin embargo, todavía existen muchas limitaciones y problemas sin resolver

DISCUSIÓN

en relación con la terapia con células madre en términos de barreras éticas, rechazo inmunológico, tumorigenicidad y fuentes celulares. Al revisar la literatura reciente y nuestros trabajos relacionados, las células madre amnióticas, incluidas las hAMSC y las hAESC, han demostrado ventajas considerables sobre otras células madre ⁷².

Nuestros resultados demostraron la capacidad de diferenciación osteogénica de las hAMSC cuando se cultivan sobre una superficie de titanio arenada (GBLAST). Este nuevo hallazgo podría emplearse en una nueva estrategia terapéutica para mejorar la osteointegración de los implantes dentales. Se necesitarán estudios *in vivo* para dilucidar el efecto de las hAMSC en el microambiente local de regeneración tisular y osteointegración de implantes Ti con superficie arenada (GBLAST) para su utilización como una posible terapia combinada en el campo de la implantología oral.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

PRIMERA. Desde un punto de vista microscópico, los implantes dentales tratados con arenado o arenado + grabado presentan una mayor rugosidad, así como un mayor ángulo de contacto y una menor energía superficial en comparación con las superficies tratadas químicamente o mecanizadas.

SEGUNDA. Las superficies modificadas, especialmente las arenadas y arenadas-grabadas, presentan una hidrofiliidad reducida, mayor microdureza y una energía de superficie menor. Todas estas características de la topografía tridimensional parecen incrementar la respuesta celular.

TERCERA. Las células madre amnióticas epiteliales y mesenquimales son capaces de sobrevivir y proliferar en las superficies de titanio tratadas y mecanizadas, aunque las superficies arenadas con mayor rugosidad favorecen la viabilidad celular.

CUARTA. Las células madre mesenquimales amnióticas tienen una mayor viabilidad celular y un mayor grado de diferenciación osteogénica en las superficies tratadas con arenado comparadas con las superficies grabadas con ácido y mecanizadas, demostrando un mayor efecto biológico para la osseointegración.

QUINTA. Las células madre amnióticas epiteliales no parecen diferenciarse en células osteoblásticas ya que no se observa un aumento de expresión génica en marcadores osteogénicos ni signos de mineralización.

SEXTA. Son necesarios más estudios de investigación sobre los mecanismos de las células madre en implantología oral para un mayor conocimiento de su biología y de su aplicación clínica.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Sotova C, Yanushevic O, Kriheli, N, Grigoriev S, Evdokimov V, Kramar O, Nozdrin M, Peretyagin N, Undritsova N, Popelyshkin E, Peretyagin P. Dental implants: modern materials and methods of their surface modification. *Materials* 2023; 16, 7383.
2. Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Impl* 1986; 1:11-25.
3. Albrektsson T, Wennerberg A. On osseointegration in relation to implant surfaces. *Clin Impl Dent Relat Res* 2019; 21(S1): 4-7.
4. Alfaraj TA, Al-Madani S, Alqahtani NS, Almohammadi AA, Alqahtani AM, AlQabbani HS, Bajunaid MK, Alharthy BA, Aljalfan N. Optimizing osseointegration in dental implantology: a cross-disciplinary review of current and emerging strategies. *Cureus* 2023; 30:47943.
5. Miri R, Shirzadeh A, Kermani H, Khajavi A. Relationship and changes of primary and secondary stability in dental implants: A review. *Int J Contemp Dent Med Rev* 2017:3011.
6. Wang Z, Wang J, Wu R, Wei J. Construction of functional surfaces for dental implants to enhance osseointegration. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023; 11: 1320307.
7. Cooper LF, Shirazi S. Osseointegration—the biological reality of successful dental implant therapy: a narrative review. *Front Oral Maxillofac Med* 2022; 4: 39.
8. Chen Y, Goodheart C, Rua D. The body's cellular and molecular response to protein-coated medical device implants: a review focused on fibronectin and BMP proteins. *Int J Mol Sci* 2022; 21:8853
9. Guglielmotti MB, Olmedo DG, Cabrini RL. Research on implants and osseointegration. *Periodontology 2000* 2019; 79: 178-189.
10. Annunziata M, Guida L. The effect of titanium surface modifications on dental implant osseointegration. *Front Oral Biol* 2015;17: 62-77.
11. Tomasi C, Derks J. Etiology, occurrence, and consequences of implant loss. *Periodontology 2000* 2022; 88: 13-35.

BIBLIOGRAFÍA

12. Souza JC, Sordi M, Kanazawa M, Ravindran S, Henriques B, Silva FS, Aparicio C, Cooper LF. Nano-scale modification of titanium implant surfaces to enhance osseointegration. *Acta Biomaterialia* 2019; 94, 112-131.
13. Inchingolo AM, Malcangi G, Ferrante L, Del Vecchio G, Viapiano , Inchingolo A, Mancini, A, Annicchiarico C, Inchingolo F, Dipalma G, Minetti E, Palermo A, Patano A. Surface coatings of dental implants: a review. *J Funct Biomater* 2023; 14: 287.
14. Wall I, Donos N, Carlqvist K, Jones F, Brett P. Modified titanium surfaces promote accelerated osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells *in vitro*. *Bone* 2009; 45: 17-26.
15. Gittens R A, McLachlan T, Olivares-Navarrete R, Cai Y, Berner S, Tannenbaum R, Schwartz Z, Sandhage KH, Boyan BD. The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. *Biomaterials* 2011; 32: 3395-3403.
16. Li H, Huang J, Wang Y, Chen Z, Li X, Wei Q, Liu X, Wang Z, Wen B, Zhao Y, Liu J, Zuo J. Nanoscale modification of titanium implants improves behaviors of bone mesenchymal stem cells and osteogenesis *in vivo*. *Oxid Med Cell Longev* 2022:2235335.
17. Long EG, Buluk M, Gallagher MB, Schneider JM, Brown JL. Human mesenchymal stem cell morphology, migration, and differentiation on micro and nano-textured titanium. *Bioact Mater.* 2019;4: 249-255.
18. Tseng KF, Shiu ST, Hung CY, Chan YH, Chee TJ, Huang PC, Lai PC, Feng SW. Osseointegration potential assessment of bone graft materials loaded with mesenchymal stem cells in peri-implant bone defects. *Int J Mol Sci.* 2024 Jan 10;25(2):862.
19. Velasco-Ortega E, Alfonso-Rodríguez CA, Monsalve-Guil L, España-López A, Jiménez-Guerra A, Garzón I, Alaminos M, Gil FJ. Relevant aspects in the surface properties in titanium dental implants for the cellular viability. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2016; 64:1-10.

BIBLIOGRAFÍA

20. Zhao R, Yang R, Cooper PR, Khurshid Z, Shavandi A, Ratnayake J. Bone grafts and substitutes in dentistry: a review of current trends and developments. *Molecules* 2021; 26:3007.
21. Popkov AV, Popkov DA, Kononovich NA, Gorbach EN, Tverdokhlebov SI, Bolbasov EN, Darvin EO. Biological activity of the implant for internal fixation. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018; 12:2248-2255.
22. Su P, Tian Y, Yang C, Ma X, Wang X, Pei J, Qian A. Mesenchymal stem cell migration during bone formation and bone diseases therapy. *Int J Mol Sci* 2018; 19:2343.
23. Boyan BD, Cheng A, Olivares-Navarrete R, Schwartz Z. Implant surface design regulates mesenchymal stem cell differentiation and maturation. *Adv Dent Res* 2016; 28:10-7.
24. Mastrangelo F, Parma-Benfenati S, Quaresima R. Biologic bone behavior during the osseointegration process: histologic, histomorphometric, and SEM-EDX evaluations. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2023; 43:65-72.
25. Masaki C, Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford C. Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16:650-6.
26. Carreira AC, Zambuzzi WF, Rossi MC, Astorino Filho R, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone morphogenetic proteins: promising molecules for bone healing, bioengineering, and regenerative medicine. *Vitam Horm.* 2015;99: 293-322.
27. da Silva Sasso GR, Florencio-Silva R, Sasso-Cerri E, Gil CD, de Jesus Simões M, Cerri PS. Spatio-temporal immunolocalization of VEGF-A, Runx2, and osterix during the early steps of intramembranous ossification of the alveolar process in rat embryos. *Dev Biol* 2021; 478:133-143.
28. Salhotra A, Shah HN, Levi B, Longaker MT. Mechanisms of bone development and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020; 21:696-711.

BIBLIOGRAFÍA

29. Chan WCW, Tan Z, To MKT, Chan D. Regulation and Role of Transcription Factors in Osteogenesis. *Int J Mol Sci* 2021;22(11):5445.
30. Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40:46-62.
31. Long F, Ornitz DM. Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5:008334.
32. Rashid H, Chen H, Javed A. Runx2 is required for hypertrophic chondrocyte mediated degradation of cartilage matrix during endochondral ossification. *Matrix Biol Plus* 2021; 12:100088.
33. Yang G, Zhu L, Hou N, Lan Y, Wu XM, Zhou B, Teng Y, Yang X. Osteogenic fate of hypertrophic chondrocytes. *Cell Res* 2014; 24:1266-9
34. Yang L, Tsang KY, Tang HC, Chan D, Cheah KS. Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111:12097-102.
35. Bianco P, Robey P. G. Skeletal stem cells. *Development* 2015; 142: 1023-1027.
36. Burr DB, Allen MR. *Basic and Applied Bone Biology*. Elsevier. 2019.
37. Weaver C M, Peacock M. *Skeletal changes across the life span*. Elsevier. 2019.
38. Compton JT, Lee FY. A review of osteocyte function and the emerging importance of sclerostin. *J Bone Joint Surg Am* 2014; 96:1659-68.
39. Zhu S, Chen W, Masson A, Li YP. Cell signaling and transcriptional regulation of osteoblast lineage commitment, differentiation, bone formation, and homeostasis. *Cell Discov* 2024; 10:71.
40. Komori T. Signaling networks in RUNX2-dependent bone development. *J Cell Biochem* 2011; 112:750-5.

BIBLIOGRAFÍA

41. Ding M, Lu Y, Abbassi S, Li F, Li X, Song Y, Geoffroy V, Im HJ, Zheng Q. Targeting Runx2 expression in hypertrophic chondrocytes impairs endochondral ossification during early skeletal development. *J Cell Physiol* 2012; 227:3446-56.
42. Khotib J, Marhaeny HD, Miatmoko A, Budiatin AS, Ardianto C, Rahmadi M, Pratama YA, Tahir M. Differentiation of osteoblasts: the links between essential transcription factors. *J Biomol Struct Dyn* 2023; 41:10257-10276.
43. Komori T. Whole aspect of Runx2 functions in skeletal development. *Int J Mol Sci* 2022; 23: 5776.
44. Ramazzotti G, Fiume R, Chiarini F, Campana G, Ratti S, Billi AM, Manzoli L, Follo MY, Suh PG, McCubrey J, Cocco L, Faenza I. Phospholipase C- β 1 interacts with cyclin E in adipose-derived stem cells osteogenic differentiation. *Adv Biol Regul* 2019; 71:1-9.
45. Vermeulen S, Tahmasebi Birgani Z, Habibovic P. Biomaterial-induced pathway modulation for bone regeneration. *Biomaterials*. 2022; 283:121431.
46. Cao X, Chen D. The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene* 2005; 357:1-8.
47. Wu M, Chen G, Li YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res* 2016; 4:16009.
48. Wu Z, Li W, Jiang K, Lin Z, Qian C, Wu M, Xia Y, Li N, Zhang H, Xiao H, Bai J, Geng D. Regulation of bone homeostasis: signaling pathways and therapeutic targets. *MedComm (2020)* 2024; 5:657.
49. Regier MC, Montanez-Sauri SI, Schwartz MP, Murphy WL, Beebe DJ, Sung KE. The influence of biomaterials on cytokine production in 3D cultures. *Biomacromolecules* 2017; 18:709-718.

BIBLIOGRAFÍA

50. James AW, LaChaud G, Shen J, Asatrian G, Nguyen V, Zhang X, Ting K, Soo C. A Review of the clinical side effects of bone morphogenetic protein-2. *Tissue Eng Part B Rev.* 2016; 22:284-97.
51. Grier WG, Moy AS, Harley BA. Cyclic tensile strain enhances human mesenchymal stem cell Smad 2/3 activation and tenogenic differentiation in anisotropic collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Eur Cell Mater.* 2017; 33:227-239.
52. Hong JH, Hwang ES, McManus MT, Amsterdam A, Tian Y, Kalmukova R, Mueller E, Benjamin T, Spiegelman BM, Sharp PA, Hopkins N, Yaffe MB. TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science* 2005; 309:1074-8.
53. Matsumoto Y, La Rose J, Kent OA, Wagner MJ, Narimatsu M, Levy AD, Omar MH. Reciprocal stabilization of ABL and TAZ regulates osteoblastogenesis through transcription factor RUNX2. *J Clin Invest* 2016; 126:4482-4496.
54. Pan JX, Xiong L, Zhao K, Zeng P, Wang B, Tang FL, Sun D, Guo HH, Yang X, Cui S, Xia WF, Mei L, Xiong WC. YAP promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation by regulating β -catenin signaling. *Bone Res* 2018; 6:18.
55. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19:444-51.
56. Kitaura H, Marahleh A, Ohori F, Noguchi T, Shen WR, Qi J, Nara Y, Pramusita A, Kinjo R, Mizoguchi I. Osteocyte-related cytokines regulate osteoclast formation and bone resorption. *Int J Mol Sci* 2020; 21:5169.
57. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys* 2014; 561:3-12.
58. Ambrosi TH, Longaker MT, Chan CKF. A Revised perspective of skeletal stem cell biology. *Front Cell Dev Biol.* 2019; 7:189.
59. Kitase Y, Prideaux M. Targeting osteocytes vs osteoblasts. *Bone.* 2023; 170:116724.

BIBLIOGRAFÍA

60. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* 2006; 235:176-90.
61. Chen H, Senda T, Kubo KY. The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis. *Med Mol Morphol* 2015; 48:61-8.
62. Feng X, Teitelbaum SL. Osteoclasts: new insights. *Bone Res* 2013; 1:11-26.
63. Wei J, Shimazu J, Makinistoglu MP, Maurizi A, Kajimura D, Zong H, et al. Glucose uptake and Runx2 synergize to orchestrate osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 2015; 161:1576-1591.
64. Riedel R, Pérez-Amodio S, Cabo-Zabala L; Velasco-Ortega E; Maymó J, Gil J, Monsalve-Gil L, Ortiz-Garcia I, Pérez-Pérez A; Sánchez-Margalet V; Jiménez-Guerra A. Influence of the surface topography of titanium dental implants on the behavior of human amniotic epithelial and mesenchymal stromal cells. *Int J Mol Sci* 2024, 25, 7416.
65. Feng Y , Jiang Z , Zhang Y , Miao X , Yu Q , Xie Z , Yang G . Stem-cell-derived ECM sheet-implant complexes for enhancing osseointegration. *Biomater Sci*. 2020 Dec 7;8(23):6647-6656.
66. Choi H, Park KH, Jung N, Shim JS, Moon HS, Kim HJ, Oh SH, Kim YY, Ku SY, Park YB. In Vivo study for clinical application of dental stem cell therapy incorporated with dental titanium implants. *Materials* 2021;14:381.
67. Park JW, Tsutsumi Y, Park EK. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells modulated by surface manganese chemistry in SLA titanium implants. *Biomed Res Int* 2022; 13:5339090.
68. Abbasi-Kangevari M, Ghamari SH, Safaeinejad F, Bahrami S, Niknejad H. Potential therapeutic features of human amniotic mesenchymal stem cells in multiple sclerosis: immunomodulation, inflammation suppression, angiogenesis promotion, oxidative stress inhibition, neurogenesis induction, mmps regulation, and remyelination stimulation. *Front Immunol*. 2019; 10:238.

BIBLIOGRAFÍA

69. Kim KY, Suh YH, Chang KA. Therapeutic effects of human amniotic epithelial stem cells in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci.* 2020 Apr 10;21(7):2658.
70. Jafari A, Rezaei-Tavirani M, Farhadhosseinabadi B, Zali H, Niknejad H. Human amniotic mesenchymal stem cells to promote/suppress cancer: two sides of the same coin. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12:126.
71. Banas RA, Trumpower C, Bentlejewski C, Marshall V, Sing G, Zeevi A. Immunogenicity and immunomodulatory effects of amnion-derived multipotent progenitor cells. *Hum Immunol* 2008;69:321-8.
72. Liu QW, Huang QM, Wu HY, Zuo GS, Gu HC, Deng KY, Xin HB. Characteristics and therapeutic potential of human amnion-derived stem cells. *Int J Mol Sci* 2021;22:970.
73. Wu Q, Fang T, Lang H, Chen M, Shi P, Pang X, Qi G. Comparison of the proliferation, migration and angiogenic properties of human amniotic epithelial and mesenchymal stem cells and their effects on endothelial cells. *Int J Mol Med* 2017; 39:918-926.
74. Dabrowski FA, Burdzinska A, Kulesza A, Chlebus M, Kaleta B, Borysowski J, Zolocinska A, Paczek L, Wielgos M. Mesenchymal stem cells from human amniotic membrane and umbilical cord can diminish immunological response in an in vitro allograft model. *Gynecol Obstet Invest* 2017; 82:267-275.
75. Morandi F, Marimpietri D, Görgens A, Gallo A, Srinivasan RC, El-Andaloussi S, Gramignoli R. Human amnion epithelial cells impair t cell proliferation: The role of HLA-G and HLA-E molecules. *Cells* 2020 ;9:2123.
76. Carvajal HG, Suárez-Meade P, Borlongan CV. Amnion-derived stem cell transplantation: A novel treatment for neurological disorders. *Brain Circ* 2016; 2:1-7.
77. Wang Y, Du Y, Yuan H, Pan Y, Wu J, Du X, Hao S, Yan Z, Li X, Liu K, Xu F. Human amnion-derived mesenchymal stem cells enhance the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by

BIBLIOGRAFÍA

promoting adiponectin excretion via the APPL1-ERK1/2 signaling pathway. *IUBMB Life* 2020;72:296-304.

78. Zhang C, Du Y, Yuan H, Jiang F, Shen M, Wang Y, Wang R. HAMSCs/HBMSCs coculture system ameliorates osteogenesis and angiogenesis against glucolipotoxicity. *Biochimie* 2018; 152:121-133.

79. Ranzoni AM, Corcelli M, Hau KL, Kerns JG, Vanleene M, Shefelbine S, et al. Counteracting bone fragility with human amniotic mesenchymal stem cells. *Sci Rep* 2016; 6:39656.

80. Jiang F, Zhang W, Zhou M, Zhou Z, Shen M, Chen N, Jiang X. Human amniotic mesenchymal stromal cells promote bone regeneration via activating endogenous regeneration. *Theranostics* 2020;10: 6216-6230.

81. Si J, Dai J, Zhang J, Liu S, Gu J, Shi J, Shen SG, Guo L. Comparative investigation of human amniotic epithelial cells and mesenchymal stem cells for application in bone tissue engineering. *Stem Cells Int* 2015:565732.

82. Li J, Zhou Z, Wen J, Jiang F, Xia Y. Human amniotic mesenchymal stem cells promote endogenous bone regeneration. *Front Endocrinol* 2020; 11:543623.

83. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int* 2015:421746.

84. Filipowska J, Tomaszewski KA, Niedźwiedzki Ł, Walocha JA, Niedźwiedzki T. The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning. *Angiogenesis* 2017; 20:291-302.

85. Pandey C, Rokaya D, Bhattarai BP. Contemporary concepts in osseointegration of dental implants: a review. *Biomed Res Int.* 2022: 6170452.

86. Beauvais S, Drevelle O, Jann J, Lauzon MA, Foruzanmehr M, Grenier G, Roux S, Faucheux N. Interactions between bone cells and biomaterials: An update. *Front Biosci* 2016; 8:227-63.

BIBLIOGRAFÍA

87. Nicholson JW. Titanium alloys for dental implants: a review. *Prosthesis* 2020; 2:100-116.
88. Haider AJ, Jameel ZN, Al-Hussaini IH. Review on: titanium dioxide applications. *Energy Procedia*, 2019; 157, 17-29.
89. Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol.* 2013; 10:15.
90. Eliaz N. Corrosion of metallic biomaterials: a review. *Materials* 2019; 12: 407.
91. Han W, Fang S, Zhong Q, Qi S. Influence of dental implant surface modifications on osseointegration and biofilm attachment. *Coatings* 2022; 12: 1654.
92. Silva RCS, Agrelli A, Andrade AN, Mendes-Marques CL, Arruda IRS, Santos LRL, Vasconcelos NF, Machado G. Titanium dental implants: an overview of applied nanobiotechnology to improve biocompatibility and prevent infections. *Materials* 2022;15:3150.
93. Mamalis A, Silvestros S. Modified titanium surfaces alter osteogenic differentiation: a comparative microarray-based analysis of human mesenchymal cell response to commercial titanium surfaces. *J Oral Implantol* 2013; 39:591-601.
94. Lukaszewska-Kuska M, Wirstlein P, Majchrowski R, Dorocka-Bobkowska B. Osteoblastic cell behaviour on modified titanium surfaces. *Micron* 2018;105: 55-63.
95. Olivares-Navarrete R, Rodil SE, Hyzy SL, Dunn GR, Almaguer-Flores A, Schwartz Z, Boyan BD. Role of integrin subunits in mesenchymal stem cell differentiation and osteoblast maturation on graphitic carbon-coated microstructured surfaces. *Biomaterials* 2015;51:69-79.
96. Alamoudi A. Nanoengineering and surface modifications of dental implants. *Cureus* 2024: 51526.

BIBLIOGRAFÍA

97. Morandini Rodrigues L, Lima Zutin EA, Sartori EM, Rizzante FAP, Mendonça DBS, Krebsbach PH, Jepsen KJ, Cooper LF, Vasconcellos LMR, Mendonça G. Nanoscale hybrid implant surfaces and Osterix-mediated osseointegration. *J Biomed Mater Res A* 2022; 111:696-707.
98. Shirazi S, Huang CC, Kang M, Lu Y, Leung KS, Pitol-Palin L, Gomes-Ferreira PHS, Okamoto R, Ravindran S, Cooper LF. Evaluation of nanoscale versus hybrid micro/nano surface topographies for endosseous implants. *Acta Biomater* 2024; 173:199-216.
99. Schneider GB, Perinpanayagam H, Clegg M, Zaharias R, Seabold D, Keller J, Stanford C. Implant surface roughness affects osteoblast gene expression. *J Dent Res*. 2003 May;82(5):372-6.
100. Luque Millán, FJ, Ortiz García, I, Matos Garrido, N, Jiménez Guerra, A, España López, A, Velasco Ortega, E. La evaluación topográfica de las superficies de los implantes de titanio. *Av Odontoestomatol* 2018, 34: 121-129.
101. Ferraris S, Bobbio A, Miola M, Spriano S. Micro- and nano-textured, hydrophilic and bioactive titanium dental implants. *Surface Coatings Tech* 2015; 276: 374-383.
102. Shibata Y, Tanimoto Y. A review of improved fixation methods for dental implants. Part I: Surface optimization for rapid osseointegration. *J Prosth Res* 2015; 59: 20-33.
103. ISO 25178. Surface roughness standards. European Union: Maastricht. The Netherlands 2001.
104. Wenzel RW. Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Ind. Eng Chem* 1936; 20: 988.
105. Annarelli CC, Fornazero J, Cohen R, Bert J, Besse J. Colloidal protein solutions as a new standard sensor for adhesive wettability measurements. *J Colloid Interface Sci* 1999: 213:386–394.
106. Velasco-Ortega E, Alfonso-Rodríguez CA, Monsalve-Guil L, España-López A, Jiménez-Guerra A, Garzón I, Alaminos M, Gil FJ. Relevant

BIBLIOGRAFÍA

aspects in the surface properties in titanium dental implants for the cellular viability. Mater Sci Eng C 2016; 64: 1–10.

107. Blanco López PP, Monsalve Guil L, Matos Garrido N, Moreno Muñoz J, Nuñez Márquez E, Velasco Ortega E. La oseointegración de implantes de titanio con diferentes superficies rugosas. Av Odontoestomatol 2018; 34: 141-149.

108. Velasco-Ortega E, Ortiz-García I, Jiménez-Guerra J, Monsalve-Guil L, Muñoz-Guzón F, Gil FJ. Comparison between sandblasted-acid etched and oxidized titanium dental implants: *In vivo* study. Int J Mol Sci 2019; 20:13.

109. Velasco-Ortega E, Ortiz-García I, Jiménez-Guerra A, Núñez-Márquez E, Moreno-Muñoz J, Rondón-Romero JL, Cabanillas-Balsera D, Gil J, Muñoz-Guzón F, Monsalve-Guil L. Osseointegration of sandblasted and acid-etched implant surfaces. A histological and histomorphometric study in the rabbit. Int J Mol Sci 2021, 2, 8507.

110. Gil J, Perez R, Herrero-Climent M, Rizo-Gorrita M, Torres-Lagares D, Gutierrez JL. Benefits of residual aluminum oxide for sand blasting titanium dental implants: osseointegration and bactericidal effects. Materials 2021; 15: 178.

111. Cervino G, Fiorillo L, Iannello G, Santonocito D, Risitano G, Cicciu M. Sandblasted and acid etched titanium dental implant surfaces systematic review and confocal microscopy evaluation. Materials 2019;12:1763.

112. Zhang F, Zhang CF, Yin MN, Ren LF, Lin HS, Shi GS. Effect of heat treatment on H₂O₂/HCl etched pure titanium dental implant: An in vitro study Med Sci Monit 2012; 18: 265-272.

113. Pontes AEF, de Toledo CT, Garcia VG, Ribeiro FS, Sakakura CE. Torque analysis of a triple acid-etched titanium implant surface. Sci World J 2015; ID 819879.

114. Ramaglia L, Postiglione L, di Spigna G, Capece G, Salzano S, Rossi G. Sandblasted-acid-etched titanium surface influences *in vitro* the

BIBLIOGRAFÍA

biological behavior of SaOS-2 human osteoblast-like cells. *Dent Mater J* 2011; 30:183-192.

115. Orsini E, Salgarello S, Martini D, Bacchelli B, Quaranta M, Pisoni L, Bellei E, Joechler M, Ottani V. Early healing events around titanium implant devices with different surface microtopography: a pilot study in an *in vivo* rabbit model. *Sci World J* 2012; ID 349842.

116. Lee HJ, Yang IH, Kim SK, Yeo IS, Kwon TK. *In vivo* comparison between the effects of chemically modified hydrophilic and anodically oxidized titanium surfaces on initial bone healing. *J Periodontal Implant Sci* 2015; 45:94-100.

117. Zareidoost A, Yousefpour M, Ghaseme B, Amanzadeh A. The relationship of surface roughness and cell response of chemical surface modification of titanium. *J Mater Sci Mater Med* 2012; 23:1479-1488.

118. Perrotti V, Palmieri A, Pellati A, Degidi M, Ricci L, Piattelli A, Carinci F. Effect of titanium surface topographies on human bone marrow stem cells differentiation *in vitro*. *Odontology* 2013; 101:133-139.

119. Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, Boyan BD. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A* 2005; 74:49-58.

120. Velasco-Ortega E, Fos-Parra I, Cabanillas-Balsera D, Olmos J, Pérez R A, Gil J, Ortiz-Garcia I, Giner M, Bocio-Núñez J, Montoya-García MJ, Jimenez-Guerra A. Osteoblastic cell behavior and gene expression related to bone metabolism on different titanium surfaces. *Int J Mol Sci* 2023; 24:3523.

121. Nicolas-Silvente AI, Velasco-Ortega E, Ortiz-Garcia I, Monsalve-Guil L, Gil J, Jimenez-Guerra A. Influence of the titanium implant surface treatment on the surface roughness and chemical composition. *Materials*. 2020; 13:314.

BIBLIOGRAFÍA

122. Palmquist A, Omar OM, Esposito M, Lausmaa J, Thomsen P. Titanium oral implants: surface characteristics, interface biology and clinical outcome. *J R Soc Interface* 2010;7 Suppl 5(Suppl 5): S515-27.
123. Murphy M, Walczak MS, Thomas AG, Silikas N, Berner S, Lindsay R. Toward optimizing dental implant performance: Surface characterization of Ti and TiZr implant materials. *Dent Mater* 2017;33:43-53.
124. Yin L, Chang Y, You Y, Liu C, Li J, Lai HC. Biological responses of human bone mesenchymal stem cells to Ti and TiZr implant materials. *Clin Implant Dent Relat Res* 2019; 21:550-564.
125. Pegueroles M, Aparicio C, Bosio M, Engel E, Gil FJ, Planell JA, Altankov G. Spatial organization of osteoblast fibronectin matrix on titanium surfaces: effects of roughness, chemical heterogeneity and surface energy. *Acta Biomater* 2010; 6:291-301.
126. Lange R, Lüthen F, Beck U, Rychly J, Baumann A, Nebe B. Cell-extracellular matrix interaction and physico-chemical characteristics of titanium surfaces depend on the roughness of the material. *Biomol Eng* 2002; 19:255-61.
127. Wang W, Wang Z, Fu Y, Dunne N, Liang C, Luo X, Liu K, Li X, Pang X, Lu K. Improved osteogenic differentiation of human amniotic mesenchymal stem cells on gradient nanostructured Ti surface. *J Biomed Mater Res A*. 2020 Sep;108(9):1824-1833.
128. Sola-Ruiz MF, Perez-Martinez C, Labaig-Rueda C, Carda C, Martín De Llano JJ. Behavior of Human Osteoblast Cells Cultured on Titanium Discs in Relation to Surface Roughness and Presence of Melatonin. *Int J Mol Sci* 2017;18:823.
129. Vansana P, Kakur K, Taniguchi, Y, Egashira K, Matsuzaki E, Tsutsum T, Kido H. The effect of AMP kinase activation on differentiation and

BIBLIOGRAFÍA

maturation of osteoblast cultured on titanium plate. *J Dent Sci* 2022; 17: 1225–1231.

130. Park BH, Jeong ES, Lee S, Jang JH. Bio-functionalization and in-vitro evaluation of titanium surface with recombinant fibronectin and elastin fragment in human mesenchymal stem cell. *PLoS One* 2021;16:0260760.

131. Yin L, Zhou ZX, Shen M, Chen N, Jiang F, Wang SL. The human amniotic mesenchymal stem cells (hAMSCs) improve the implant osseointegration and bone regeneration in maxillary sinus floor elevation in rabbits. *Stem Cells Int* 2019;2019:9845497.

132. Yang J, Wang J, Yuan T, Zhu XD, Xiang Z, Fan YJ, Zhang XD. The enhanced effect of surface microstructured porous titanium on adhesion and osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Mater Sci Mater Med* 2013;24:2235-46.

133. Humphries MJ, Travis MA, Clark K, Mould AP. Mechanisms of integration of cells and extracellular matrices by integrins. *Biochem Soc Trans* 2004; 32:822-5.

134. Olivares-Navarrete R, Hyzy SL, Hutton DL, Erdman CP, Wieland M, Boyan BD, Schwartz Z. Direct and indirect effects of microstructured titanium substrates on the induction of mesenchymal stem cell differentiation towards the osteoblast lineage. *Biomaterials* 2010; 31:2728-35.

135. Lai M, Hermann CD, Cheng A, Olivares-Navarrete R, Gittens RA, Bird MM, Walker M, Cai Y, Cai K, Sandhage KH, Schwartz Z, Boyan BD. Role of $\alpha 2\beta 1$ integrins in mediating cell shape on microtextured titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A*. 2015; 103:564-73.

**DOCUMENTACIÓN
ADJUNTA**



Article

Influence of the Surface Topography of Titanium Dental Implants on the Behavior of Human Amniotic Stem Cells

Rodrigo Riedel ^{1,2}, Soledad Pérez-Amodio ³, Laura Cabo-Zabala ⁴, Eugenio Velasco-Ortega ⁵, Julieta Maymó ^{1,2}, Javier Gil ^{3,*}, Loreto Monsalve-Guil ^{5,*}, Iván Ortiz-García ⁵, Antonio Pérez-Pérez ⁶, Víctor Sánchez-Margalet ⁶ and Alvaro Jiménez-Guerra ⁵

- ¹ Departament Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria Pabellón 2, 4° Piso, Buenos Aires 1428, Argentina; riedelrodrigo@gmail.com (R.R.); jmaymo@qb.fcen.uba.ar (J.M.)
 - ² CONICET, Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN), Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria Pabellón 2, 4th Floor, Buenos Aires 1428, Argentina
 - ³ Bioengineering Institute of Technology, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad Internacional de Cataluña, 08195 Sant Cugat del Vallés, Spain; sperezam@uic.es
 - ⁴ Sección de Inmunología, Hospital Regional Universitario de Malaga, Instituto de Investigación Biomédica de Malaga (IBIMA), 29590 Málaga, Spain; arual_cz@hotmail.com
 - ⁵ Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, University of Seville, 41004 Sevilla, Spain; evelasco@us.es (E.V.-O.); ivanortizgarcia1000@hotmail.com (I.O.-G.); alopajanosas@hotmail.com (A.J.-G.)
 - ⁶ Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología, Hospital Universitario Virgen Macarena, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, Avenida Sánchez Pizjuán 4, 41009 Sevilla, Spain; aperez14@us.es (A.P.-P.); margalet@us.es (V.S.-M.)
- * Correspondence: xavier.gil@uic.es (J.G.); mmonsalve2@us.es (L.M.-G.)



Citation: Riedel, R.; Pérez-Amodio, S.; Cabo-Zabala, L.; Velasco-Ortega, E.; Maymó, J.; Gil, J.; Monsalve-Guil, L.; Ortiz-García, I.; Pérez-Pérez, A.; Sánchez-Margalet, V.; et al. Influence of the Surface Topography of Titanium Dental Implants on the Behavior of Human Amniotic Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 7416. <https://doi.org/10.3390/ijms25137416>

Academic Editor: Masaru Tanaka

Received: 2 June 2024

Revised: 2 July 2024

Accepted: 4 July 2024

Published: 6 July 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The dental implant surface plays a crucial role in osseointegration. The topography and physicochemical properties will affect the cellular functions. In this research, four distinct titanium surfaces have been studied: machined acting (MACH), acid etched (AE), grit blasting (GBLAST), and a combination of grit blasting and subsequent acid etching (GBLAST + AE). Human amniotic mesenchymal (hAMSCs) and epithelial stem cells (hAECs) isolated from the amniotic membrane have attractive stem-cell properties. They were cultured on titanium surfaces to analyze their impact on biological behavior. The surface roughness, microhardness, wettability, and surface energy were analyzed using interferometric microscopy, Vickers indentation, and drop-sessile techniques. The GBLAST and GBLAST + AE surfaces showed higher roughness, reduced hydrophilicity, and lower surface energy with significant differences. Increased microhardness values for GBLAST and GBLAST + AE implants were attributed to surface compression. Cell viability was higher for hAMSCs, particularly on GBLAST and GBLAST + AE surfaces. Alkaline phosphatase activity enhanced in hAMSCs cultured on GBLAST and GBLAST + AE surfaces, while hAECs showed no mineralization signals. Osteogenic gene expression was upregulated in hAMSCs on GBLAST surfaces. Moreover, $\alpha 2$ and $\beta 1$ integrin expression enhanced in hAMSCs, suggesting a surface–integrin interaction. Consequently, hAMSCs would tend toward osteoblastic differentiation on grit-blasted surfaces conducive to osseointegration, a phenomenon not observed in hAECs.

Keywords: titanium; surfaces; amniotic stem cells; dental implants

1. Introduction

Osseointegration is the key to good fixation and long-term performance of dental implants. According to Albretksson et al., there are six factors that affect osseointegration, including the implant manufacturing material, the surface, the mechanical properties of the bone, the dental implant design, the masticatory loads, and the surgical technique [1–4]. Many studies have shown the significant importance of the implant surface, where a suitable topography for osteoblastic adhesion, proliferation and differentiation has been established [5].

However, there are other properties such as wettability and surface energy with its polar and dispersive components that will influence metabolic activity [6–8].

The different surfaces obtained by sandblasting, acid-etching, and those treated by sandblasting and subsequent acid-etching have been deeply studied in the aspects of physicochemical properties of the surface [9–11]. Today, the most common surfaces in implant dentistry are those treated by the projection of abrasive particles on the titanium (Ti) surface, especially alumina particles. This treatment makes it possible to obtain the desired roughness for the cells since it can be adjusted by the size of the abrasive particles, projection pressure, distance from the gun to the surface and the abrasiveness of the particles. In addition to achieving the desired roughness, the sandblasting treatment produces a compressive residual stress on the surface of the dental implant that hinders the nucleation of cracks due to fatigue, resulting in better long-term mechanical behavior. Different treatments will produce different wettability properties and surface energies that will also affect cell behavior [12–16]. This blasted surface can be modified with an acid-etching procedure. Strong acids like hydrochloric, sulfuric, and nitric acids are normally used for etching. The topography of both sandblasted and acid surfaces showed irregularities such as large dips, small micropits, sharp edges, and pointed tips. Sa, one of the surface parameters defined as the arithmetic mean height of the surface, is approximately 1.5 μm to 2 μm . It is known that osteogenic cells migrate to a roughened Ti surface through the fibrin clot and seem to recognize the irregularities of the surface [17–19].

Performing topography and surface chemistry modifications on titanium implants enhances osseointegration by increasing surface tension. In this context, grit blasting has been shown to improve the biological activity of titanium surfaces through increased microhardness, which is linked to higher compressive surface tension, greater hydrophilicity, and enhanced osteoblast activity. Additionally, compressive stress from grit blasting enhances implant fatigue life by inhibiting crack formation [20,21]. However, there are risk factors for biological and mechanical complications, contributing to late implant failure [22–27].

Recent studies have reported that the osteogenic effect of stem cells around an implant was clearly identified, showing the greater new bone formation especially in the early phase of bone regeneration. Moreover, stem cells can develop a direct conversion to osteoblasts, and in the early stages of osseointegration, stem cells can stimulate bone formation through a direct role in the source of new osteoblasts. This osteogenic capacity of stem cells can be improved in relation to implant surface type by an additional effect of sandblasting and acid-etching surfaces at a later phase of bone healing [28–30].

The amnion of the human placenta is a source of multipotent and pluripotent stem cells. The unlimited potential to provide cells, easy accessibility, minimal or no ethical and legal issues associated with its use, and cell isolation without invasive procedures makes the amnion very attractive for regenerative medicine applications [31]. Placental stem cells such as human amniotic mesenchymal stem cells (hAMSCs) and human amniotic epithelial stem cells (hAECs) can be isolated from the human amniotic membrane. Amnion cells possess immunomodulatory and anti-inflammatory properties [32], as well as differentiation potential, including osteogenic lineage [33–36]. Moreover, they express embryonic and pluripotency markers, do not express telomerase, and are non-tumorigenic [37]. These properties make the amniotic stem cells a valuable and non-controversial tool for application in tissue engineering and dental implanting.

The aim of this study was to compare the response of Human Amniotic Epithelial and Mesenchymal Stem Cells on four different Ti surfaces: (i) machined acting (MACH), (ii) grit-blasted (GBLAST), (iii) acid etching (AE) and (iv) grit-blasted and acid etching (GBLAST + AE) through the evaluation of cell viability, ALP activity, calcium deposition, and osteogenic marker expression. Understanding the cellular behavior of amnion stem cells on the Ti surface will provide new knowledge to facilitate the development of stem cell-based therapy applied in oral implantation.

2. Results

2.1. Topography of the Samples

Figure 1 shows Confocal Laser Scanning Microscopy images of the different roughnesses obtained. The main surface properties (i.e., roughness, contact angle) of the study groups are summarized in Table 1 and the profiles obtained by interferometric microscope in Figure 2.

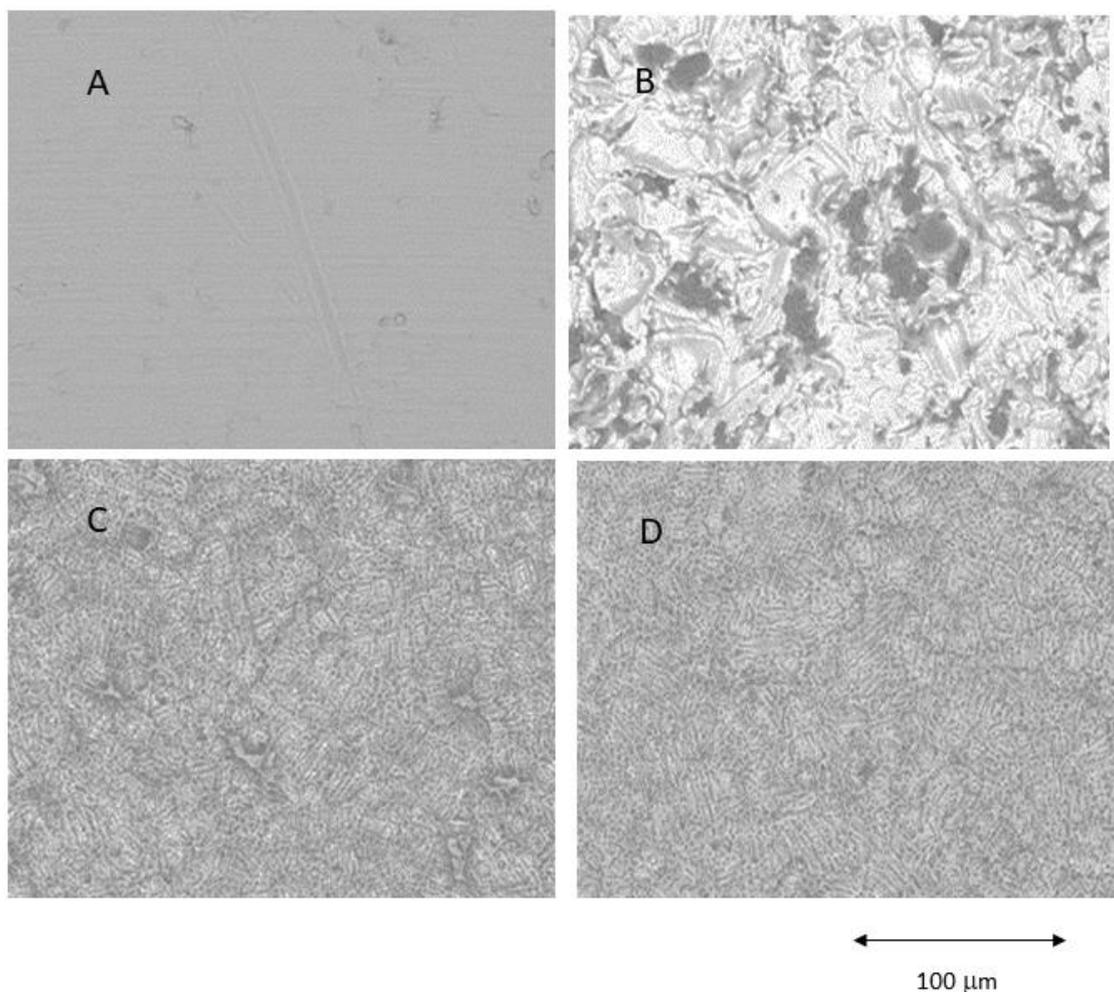


Figure 1. Different surfaces observed by Scanning Electron Microscope. (A) Machined (MACH), (B) Grit Blasting (GBLAST), (C) Grit Blasting and Acid Etching (GBLAST + AE), (D) Acid Etched (AE).

Table 1. Description of surface roughness (S_a), roughness ratio (r), and contact angle are shown in mean \pm standard deviation. Asterisks mean statistical difference significance with $p < 0.001$. The values of the contact angle were modified following the Wenzel equation.

Surfaces	Roughness		Contact Angle ($^\circ$)	
	(S_a) (μm)	r	H ₂ O	Formamide
MACH	$0.22 \pm 0.09^*$	$1.09 \pm 0.09^*$	$53.4 \pm 6.1^*$	$31.6 \pm 4.3^*$
GBLAST	$2.06 \pm 0.20^{**}$	$1.66 \pm 0.32^{**}$	$89.5 \pm 9.9^{**}$	$63.2 \pm 10.3^{**}$
AE	$1.28 \pm 0.17^*$	$1.27 \pm 0.25^*$	$59.4 \pm 2.2^*$	$36.6 \pm 6.2^*$
GBLAST + AE	$2.22 \pm 0.19^{**}$	$1.76 \pm 0.27^{**}$	$92.3 \pm 4.9^{**}$	$70.2 \pm 12.3^{**}$

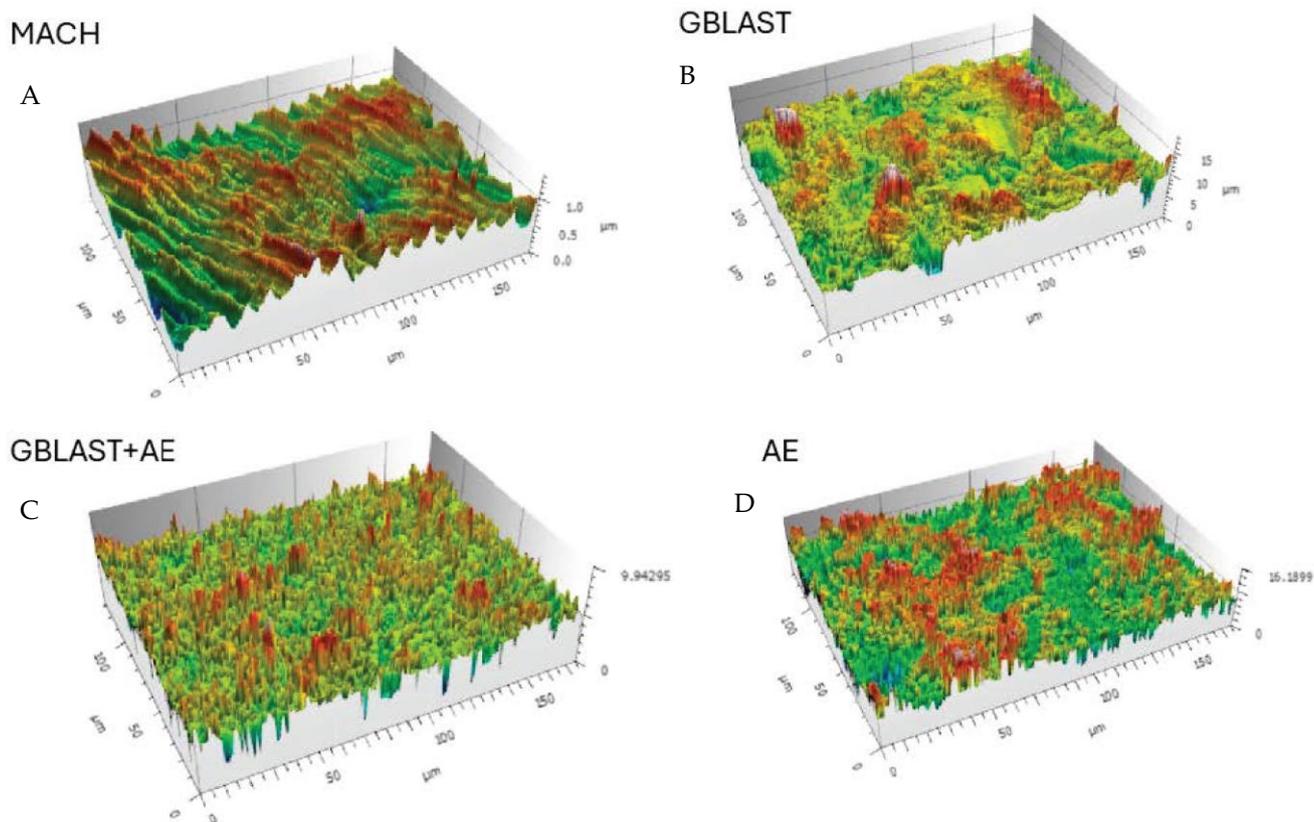


Figure 2. Surfaces of the different treatments observed by Confocal Laser Scanning Microscopy images. (A) Machined (MACH), (B) Grit Blasting (GBLAST), (C) Grit Blasting and Acid Etching (GBLAST + AE), (D) Acid Etched (AE).

In Table 2 can be observed the values of the free surface energy with the two components: polar and dispersive.

Table 2. Water contact angle, surface free energy and its components for the different Ti surfaces. Values are mean \pm standard error of the mean. Statistical differences vs. smooth surfaces for each column are indicated by single and double asterisk symbols ($p < 0.05$).

Surface	Surface Free Energy (mJ/m ²)		
	Total Surface Free Energy	Dispersive Component	Polar Component
MACH	49.6 \pm 3.3 *	30.20 \pm 4.32 *	19.40 \pm 2.88 *
GBLAST	38.8 \pm 4.0 **	14.20 \pm 2.21 *	24.60 \pm 1.50 **
AE	46.5 \pm 3.5 *	30.99 \pm 0.85 *	15.51 \pm 2.90 **
GBLAST + AE	39.3 \pm 2.7 **	12.10 \pm 2.34 *	27.20 \pm 5.15 *

The results showed that the acid-etched surfaces produce a higher roughness than machined samples. The discs treated with GBLAST show higher roughness than AE and MACH. GBLAST surfaces presented sharper valleys and peaks and some residues of the aluminum oxide used for abrasive particle projection. GBLAST followed by AE showed that the GBLAST roughness is maintained, but the sharp angles of the roughness are reduced due to the etching acid. A microroughness produced by AE is observed in the macroroughness obtained by sandblasting.

X-ray energy dispersive microanalysis studies for all GBLAST and GBLAST + AE samples indicate that the amount of alumina is lower than 4% on the titanium surfaces. No other contamination was detected on any of the other surfaces.

The microhardness results indicate values for MACH surfaces of 178 HVN (sd 23), for AE surfaces of 188 HVN (sd 17), for abrasive spray-treated GTBLAST of 265 (sd 23), and for GBLAST + AE of 268 (sd 23). These results indicate significant differences between the MACH and AE surfaces with respect to the GBLAST and GBLAST + AE. This can be explained by the co-pressure exerted on the projection of the abrasive particles. Between MACH and AE, as well as between GBLAST and GBLAST + AE, the differences were not statistically significant ($p < 0.001$).

2.2. Biological Characterization of Titanium Disc Surfaces

2.2.1. Cell Viability

HAMSCs and hAECs were cultured on titanium surfaces for 1, 7, and 14 days. A significant increase in cell viability was observed in hAMSCs on GBLAST surfaces after culturing for 7 days, measured by MTT assay. After 14 days of culture, cell viability increased in MACH, GBLAST, and GBLAST + AE surfaces compared with the control of day 1 (Figure 3A). Similar results were observed when hAECs were cultured on the different Ti disc surfaces (Figure 3B).

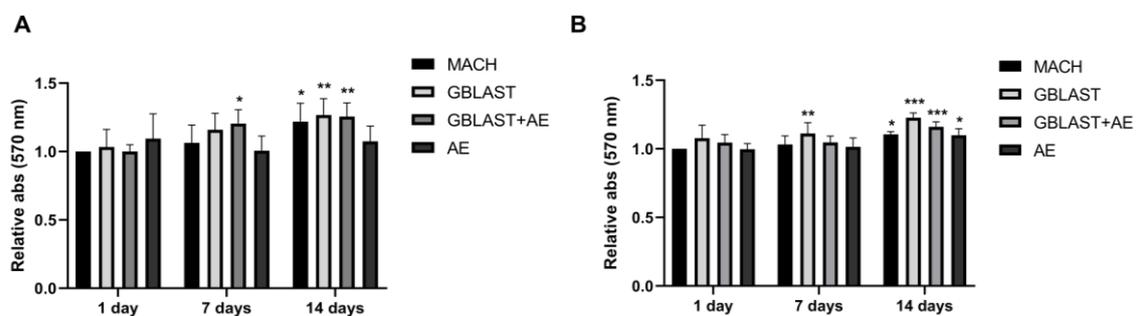


Figure 3. Cell viability of (A) hAMSCs and (B) hAECs cultured on different titanium surfaces. Data are presented as mean \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control day 1.

2.2.2. Alkaline Phosphatase Activity

ALP activity serves as a marker for monitoring the early stages of osteoblasts. The enzyme activity was measured to investigate the osteogenic differentiation of human amnion stem cells cultured on the different Ti disc surfaces. At day 14, ALP activity was significantly enhanced in hAMSCs cultured on GBLAST and GBLAST + AE-treated surfaces compared to the MACH disc of day 1 (Figure 4A). On the contrary, when evaluating ALP activity in hAECs culture, there were no significant differences on any of the surfaces studied (Figure 4B).

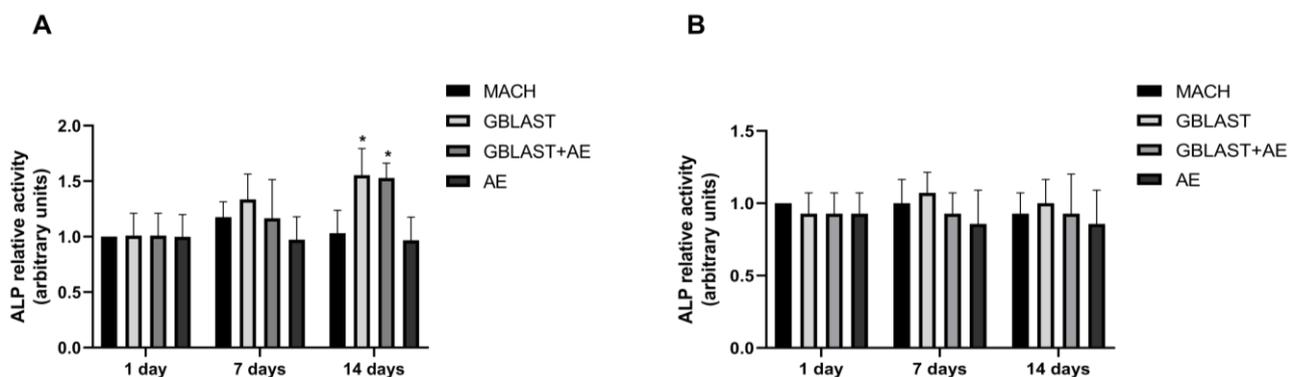


Figure 4. ALP activity in (A) hAMSCs and (B) hAECs cultured on different surfaces for 1, 7 and 14 days. Data are presented as mean \pm SD. * $p < 0.05$ vs. control day 1.

2.2.3. Calcium Intake

The calcium intake, indicative of the late-stage osteogenic differentiation expressed by mature osteoblasts during bone formation, was determined in culture media from hAMSCs and hAECs at 1, 7, and 14 days. As shown in Figure 5A, the calcium intake from hAMSCs was significantly increased in GBLAST, GBLAST + AE, and AE-treated surfaces at 14 days of culture. No statistically significant differences in calcium levels were found in hAEC cultures (Figure 5B).

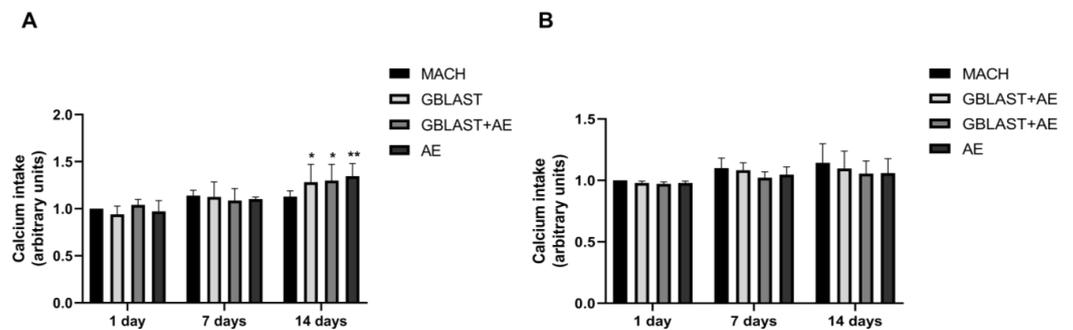


Figure 5. Calcium intake from (A) hAMSCs and (B) hAECs cultured on different surfaces for 1, 7 and 14 days. Data are presented as mean \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control day 1.

2.2.4. Osteogenic Gene Expression

Expression of osteogenic markers, such as OSTERIX, runt-related transcription factor 2 (RUNX2), alkaline phosphatase (ALP), and osteopontin (OPN), was evaluated by qRT-PCR in hAMSCs at 1 and 14 days of culture. In Figure 6, there is a significant increase in the expression levels of OSTERIX, RUNX2, ALP, and OPN in hAMSCs that were cultured on GBLAST surfaces for 14 days. In addition, the combination of both GBLAST and AE treatments induces a significant increase in OSTERIX and ALP expression (Figure 6A,C).

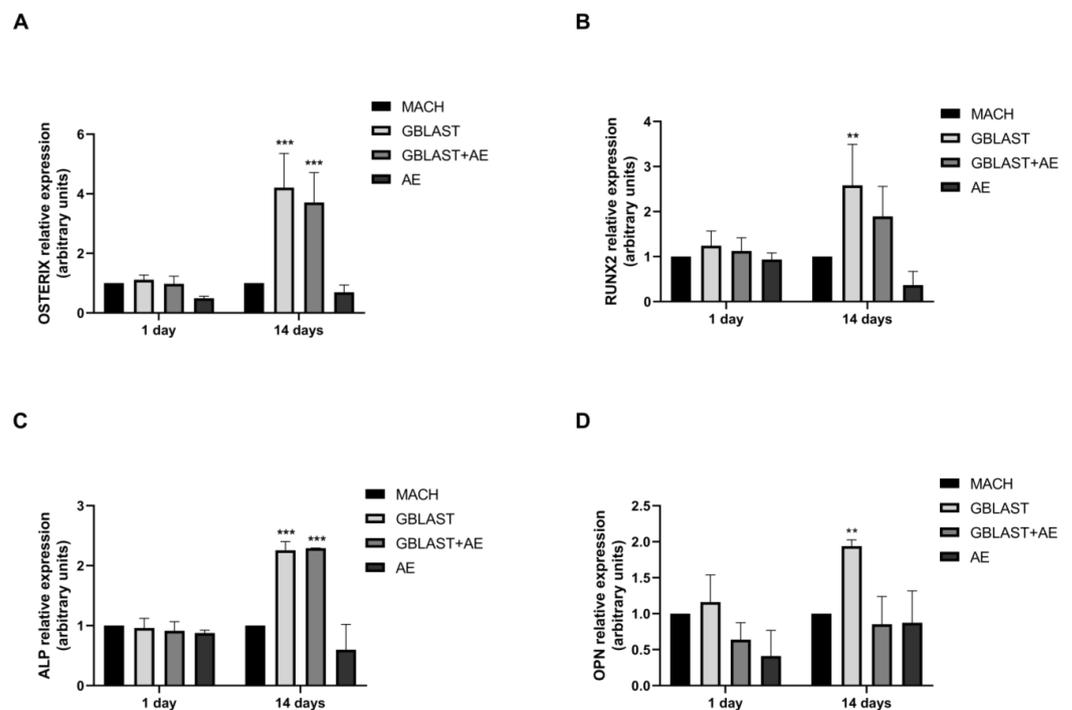


Figure 6. Quantitative RT-PCR results of mRNA osteogenic gene expression in hAMSCs, (A) OSTERIX, (B) RUNX2, (C) ALP and (D) OPN. Data are presented as mean \pm SD. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. respective control.

2.2.5. α and β Integrin Subunit Gene Expression

Integrins play a crucial role in the attachment of cells to proteins that are adsorbed on the surface of an implant (Figure 7). To further investigate the interaction mechanisms between hAMSCs and GBLAST surface, we analyzed the gene expression of α and β integrin subunits, measured by qRT-PCR. Figure 7A,D showed that only $\alpha 2$ and $\beta 1$ integrin subunits were upregulated in hAMSCs at 14 days on the GBLAST surface, compared to the machined acting surface.

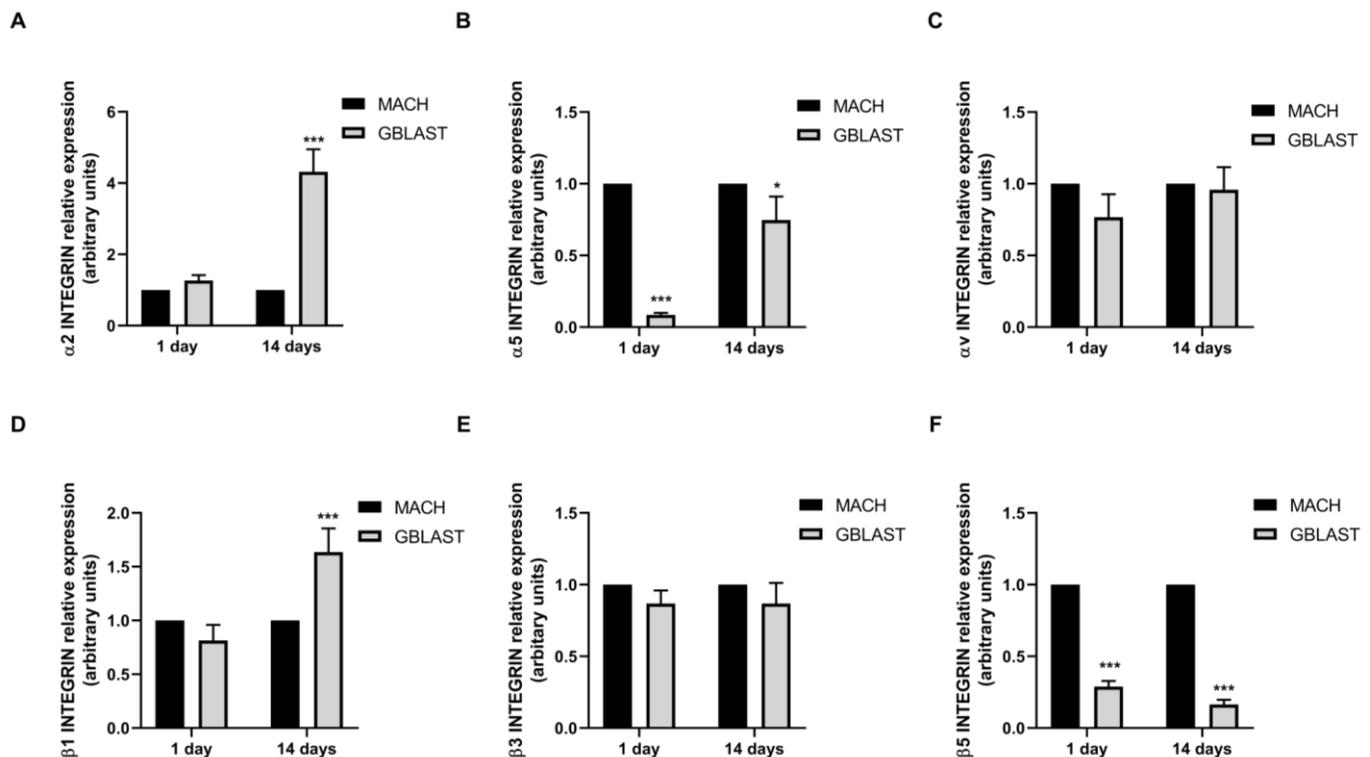


Figure 7. Quantitative RT-PCR results of mRNA integrin α and β subunit gene expression in hAMCs, (A) $\alpha 1$, (B) $\alpha 5$, (C) αv , (D) $\beta 2$, (E) $\beta 3$, and (F) $\beta 5$. Data are presented as mean \pm SD. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. respective control.

3. Discussion

The present study reports the impact of four different titanium surfaces on the biological behavior of human amniotic membrane-derived stem cells. Our findings indicate that Ti surface implants with different surface treatments affect the proliferation and differentiation of hAMSCs and hAECs. These treatments of titanium surfaces, which bring about modifications of topography, hydrophilicity, and chemical properties, positively affect hAMSCs and hAECs responses. We found that GBLAST surfaces could enhance osteoblast differentiation of hAMSCs, benefiting osseointegration.

The surface topography and physiochemical properties of Ti implants are crucial characteristics for osseointegration. The microscopic topography features can increase osseointegration by direct bone-to-implant contact and resistance to functional loads on titanium surfaces. Moreover, modifications to the surface, affecting both topography and surface chemistry, have been reported to be an important influence regarding adhesion, proliferation, and differentiation of specific cells (i.e., osteoblasts) via a direct interaction between cells and the implant surface [5,9,13]. In fact, several surface treatments (i.e., sandblasting, acid-etching,) have been developed to improve a better and faster bone formation in experimental and clinical studies [14,17,38].

The results of this study demonstrated by the topography are observed via the use of a Scanning Electron Microscope and confirmed by Confocal Scanning Microscopy. The

different profiles show that the highest roughness surface was obtained by the grit blasting treatment; however, the analysis showed that acid etching slightly reduces the surface roughness. According to several reports, the roughness levels obtained by GBLAST and GBLAST + AE treatments are in the range of optimal roughness for osteoblast cell adhesion [17,19,25]. Our results show higher cell viability for GBLAST and GBLAST + AE surfaces compared to machine-made and acid-etched surfaces. This can be explained by the fact that surfaces with high surface energy promote cell adhesion. In this regard, it has been observed that osteoblasts cultured in rough surfaces such as GBLAST + AE interact with this type of surface through filopodia [39,40].

This study also shows that roughness produces higher contact angle values on surfaces treated by grit blasting, indicating higher hydrophobicity.

The values of the rough surfaces have been angle-corrected according to the Wenzel equation [41–43]. The surface energy can be an aspect that will favor osteoblastic cell activity. Surface energy/wettability indicates the balance between the intermolecular interactions when a solid surface and a liquid are brought into contact. Higher surface energy/wettability is known to promote the differentiation of mesenchymal stem cells to an osteogenic lineage as well as facilitate implant-to-bone contact. The modifications of surface morphology by roughening can change the surface charge and energy and, in this way, promote the biological response of cells. Several reports indicate that implant surfaces having higher surface energy/wettability are more suitable for cell adhesion and proliferation compared to surfaces presenting lower surface energy [44,45].

The microhardness levels are also higher on surfaces treated with grit-blasting because the projection of abrasive particles causes a plastic deformation of the titanium generating a state of residual compressive stress. This residual stress improves the mechanical properties of fatigue as it inhibits the formation of cracks on the metal surface [13,39].

The surface properties of titanium implants such as topography, roughness, wettability, and chemistry have a significant impact on cell activity [5,6,9]. Wang et al. [46] demonstrated that the gradient nanostructured Ti surfaces promoted the adhesion and proliferation of hAMSCs *in vitro*. Moreover, the morphology of hAMSC on the surfaces exhibited robust spreading and extended pseudopods. Our study reported that hAMSCs and hAECs were successfully cultured on titanium surfaces for 1, 7 and 14 days. A significant increase in cell viability was observed in hAMSCs on GBLAST surfaces after culturing for 7 days. After 14 days of culture, cells viability increased in MACH, GBLAST and GBLAST + AE treated surfaces. Similar results were observed when hAECs were cultured on different surfaces.

This study analyzed the effects of Ti-surface implants with different surface treatments on the proliferation and differentiation of hAMSCs and hAECs. Our *in vitro* results confirm that the treatment of the titanium surface, which brings about modifications to the topography, hydrophilicity, and chemical properties of the titanium implants, is positive for hAMSCs and hAECs responses. These biological findings are noteworthy as we have demonstrated the robust cell viability of amniotic stem cells over all analyzed surfaces.

In fact, numerous *in vitro* studies confirmed the effect of the modifications of topography and physiochemical properties of titanium surfaces on stem cell behavior and osteogenesis [28–30,46]. Several surfaces (i.e., sandblasting, acid-etching, zirconia) have demonstrated improved osseointegration through the direct stimulation of the microenvironment of stem cells. It has been recently reported that titanium implants with different surface roughness, nanostructures, and wettability, fabricated by the modification of sandblasted and acid-etched titanium by H₂O₂ treatment, significantly enhance cell adhesion spreading and proliferation [28]. Furthermore, early cell adhesion, migration, and efficient differentiation of stem cells to osteoblasts are key to colonizing the surface of dental implants. In addition, all the above-mentioned cell events prevent biofilm formation and implant-associated infection. Moreover, micro–nano-roughness of titanium results in faster maturation of osteoblasts/osteocytes and osteogenic differentiation of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) [29].

We evaluated mRNA expression levels of certain master regulator genes of osteoblast differentiation (RUNX2 and OSTERIX) in hAMSCs at 14 days of culture. RUNX2 and OSTERIX are transcription factor genes for osteogenic differentiation. It has been demonstrated that RUNX2 is essential for the MSC differentiation into preosteoblasts, and OSTERIX is an osteoblast-specific transcription factor for the differentiation of preosteoblasts into mature osteoblasts [45]. In this context, our study shows that GBLAST and GBLAST + AE surfaces produced an increase in RUNX2 and OSTERIX expression by 4,2-fold and 3,7-fold, respectively, compared to the control surface. These findings indicate that a surface with GBLAST modification is effective in initiating the first step in the osteogenesis-related cascade of hAMSCs, promoting the upregulation of critical bone-specific transcription factors. We also quantified the mRNA expression of some phenotype marker genes that indicate the stages of early (ALP) and mature (OPN) osteoblast differentiation. After 14 days of incubation, we observed an increased expression of ALP in GBLAST and GBLAST + AE surfaces, indicating early osteoblastic differentiation on both treated surfaces. However, it appears that the late stages of osteoblastic differentiation, detected by OPN expression, only occur on GBLAST surfaces at 14 days of culture. This result suggests a potential delay in the progression of osteoblast differentiation on surfaces treated with GBLAST + AE, possibly requiring a prolonged culture period for completion. None of the evaluated osteoblast genes were detected in hAECs during the 14 days of culture.

Alkaline phosphatase (ALP) is a commonly used marker of osteoblast differentiation. This enzyme plays a role in extracellular matrix formation, maturation, and mineralization by enhancing the concentration of phosphate ions and inhibiting phosphoric ester action [47,48]. Our results show that after 14 days of hAMSCs culture, ALP activity significantly increased on GBLAST- and GBLAST + AE-treated surfaces. The absence of ALP enzyme activity in the supernatant of hAEC cultures indicates that these cells did not differentiate into osteoblasts on any of the treated surfaces used in our study. The fact that only hAMSCs showed osteogenic differentiation when cultured on the treated surfaces can be explained by the differences in osteogenic differentiation capacity already reported between these cells and hAECs. Si et al. [49] found that although hAECs displayed osteoblastic differentiation capacity, hAMSCs showed a higher osteoblastic phenotype when cultured under osteogenic stimulation. These authors reported lower ALP activity and extracellular mineralization of hAECs compared to hAMSCs. Based on this previous evidence, it is possible that hAECs do not respond to the different surfaces by changing their phenotype to a more osteoblastic one as observed by hAMSCs.

Mineralization activity is a fundamental late-phase sign of osteogenic differentiation [50]. Yin et al. [51] showed that hAMSCs accelerated mineralized deposition rates on implant surfaces injected into rabbit maxillary sinus floor elevation models. Moreover, hAMSCs improved bone formation differentiating into osteoblast cells. As we expected, calcium intake from hAMSCs was significantly increased at day 14 in GBLAST, GBLAST + AE, and AE-treated surfaces. In line with the previous results on ALP activity, calcium levels were not detected in hAEC cultures.

It is known that surface roughness influences the concentration and biological activity of adsorptive proteins and subsequent cell behavior [52]. Integrins are the links between cells and the extracellular matrix and play a crucial role in signal transducers for regulating cell growth, differentiation, and motility [53]. Olivares-Navarrete et al. [54] demonstrated that $\alpha 2 \beta 1$ integrin, which binds to sites on type I collagen, mediates the osteoblast response to micro and nanostructured Ti implant surfaces in MSCs. Similarly, the introduction of titanium surface microroughness decreased the proliferation and enhanced osteogenic differentiation in osteoblast cells mediated by integrin $\alpha 2 \beta 1$. Moreover, the silencing of $\alpha 2$ or $\beta 1$ subunits resulted in an increment of cell proliferation and a reduction in cell differentiation comparable to wild-type cells on smoother Ti surfaces [55]. Our results indicate that GBLAST surfaces could enhance the osteoblastic differentiation of hAMSCs. In this context, we examined the differences in $\alpha 2$, $\alpha 5$, αv , $\beta 1$, $\beta 3$, and $\beta 5$ integrin subunit gene expression in hAMSCs between GBLAST and MUCH surfaces. We found an increased

expression of $\alpha 2$ and $\beta 1$ hAMSCs on the GBLAST surface. These results suggest that the Ti surface treated by grit blasting modulates the osteogenic differentiation of hAMSCs via $\alpha 2/\beta 1$ integrin interaction. Further studies need to be performed to reveal the mechanism of osteogenic differentiation of hAMSCs on the GBLAST surface.

Human amniotic stem cells are well-recognized for their advantages, particularly their immunomodulatory capacity and immunoprivileged status, over other types of stem cells for applications in cell therapy [56]. In this regard, hAMSCs have been used in various studies, demonstrating their immunomodulatory and bone regenerative potential [57]. Our results demonstrated the osteogenic differentiation capability of hAMSCs when cultured on a titanium GBLAST surface. This new finding could be employed in a novel therapeutic strategy to improve the osseointegration of dental implants. In vivo studies will be needed to elucidate the effect of hAMSCs on the local microenvironment of tissue regeneration and osseointegration of Ti GBLAST implants to be used as a potential combined therapy in the implantology field.

4. Materials and Methods

4.1. Sample Preparation

Figure 8 shows the flowchart of the tests realized and the number of samples.

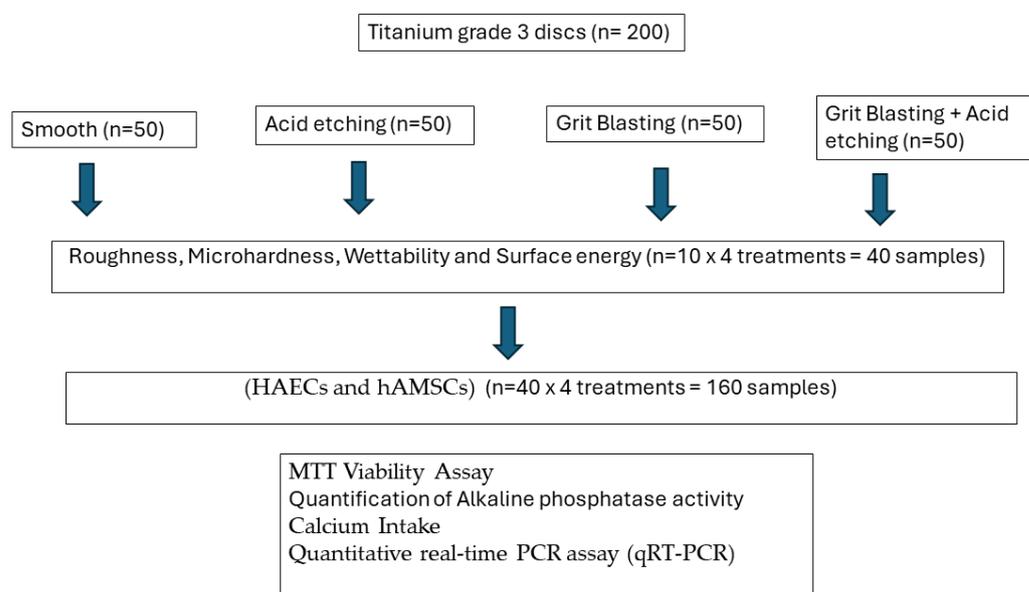


Figure 8. Flowchart of the experiments realized.

Two-hundred titanium discs (5 mm in diameter and 2 mm in width) with different surface treatments were provided by Galimplant[®] (Sarria, Lugo, Spain). The commercially pure titanium was grade 3 (Ti: 99.5%, O: 0.3%, Fe: 0.1%, C: 0.05%, N: 0.05%). The surfaces were prepared as follows:

- Machined (MACH). The discs show the mechanical abrasion typical of the machining of dental implants without subsequent surface treatment ($n = 50$).
- Grit Blasted (GBLAST). The roughness was obtained by spraying aluminum oxide (Al_2O_3) abrasive particles on the titanium surface at a pressure of 2.5 bars and a gun-sample separation of 100 mm ($n = 50$).
- Acid Etching (AE). Acid etching was performed with a mixture of 1:1 concentrated HCl and HNO_3 acids for 45 s ($n = 50$).
- Grit Blasted and Acid Etching (GBLAST + AE). The discs were blasted with alumina particles of 250 to 450 μm at a pressure of 2.5 bar and at a gun-surface distance of 100 mm. They were then washed with distilled water and treated by immersion in a 1:1 acid mixture of concentrated HCl and HNO_3 for 45 s ($n = 50$).

These types of topography were developed because they are the most commonly used in titanium hard tissue substitute implants. The machined titanium was the one used as the control. For some applications, especially orthopedic ones, slightly rough titanium obtained by acid etching is used. In this case, there is a double objective to give the titanium a little roughness to facilitate the osteoblastic activity and the generation of a passivation layer to increase the resistance to corrosion and decrease the release of titanium ions to the physiological environment.

The titanium treated by grit blasting with alumina particles generates a higher roughness and also causes a compressive residual stress state on the titanium surface that improves fatigue resistance. This type of treatment is very common in dental implants since a good osseointegration is necessary to cause a biological fixation of the dental implant. It has also been determined that the residual stresses improve the hydrophilicity of the surface, thus improving the protein adsorption activity on the surface, which will facilitate the biological activity on the surface of the implant [5,58,59].

Finally, the combination of grit blasting and acid etching generates a surface suitable for bone tissue growth with good long-term mechanical behavior and also presents a passivation layer that improves its compatibility with chemical degradation.

For the surface characterization studies (roughness and machinability), the samples were cleaned by incubating in methyl alcohol for 15 min in ultrasound and in acetone for 5 min. The materials were dried with hot air flow.

Microhardness tests were performed by Vickers hardness with a high-precision Matsuzawa microhardness tester (Tokyo, Japan), applying a 1 kg load for 15 s. The indenter was a diamond pyramid.

4.2. Characterization of Titanium Disc Surfaces

The SEM (Jeol 6400, Jeol, Tokyo, Japan) was used to observe the topography, and the evaluation of surface roughness was performed by means of Confocal Laser Scanning Microscopy, obtaining the different profiles of the different surfaces (CLSM; OLS Olympus Lext 3000, Shinjuku, Japan). First, the equipment was verified with the use of a reference sample (Mitutoyo SR 15, Elgoibar, Spain "Precision Reference Specimen": $S_a = 0.10 \mu\text{m}$). A total of 3 measurements in 3 samples of each surface were calculated [60]. The surfaces observed by Scanning Electron Microscopy are shown in Figure 1.

The contact angle analysis was performed with ultrapure distilled water (Millipore Milli-Q, Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Germany) and formamide (Contact Angle System OCA15plus—Dataphysics, Filderstadt, Germany), and the corresponding data were analyzed with SCA20 (Dataphysics, Filderstadt, Germany). Contact angle measurements were made with the sessile drop method. Drops were generated with a micrometric syringe and were deposited over discs. A total of 3 μL of distilled water and 1 μL of formamide were deposited on each sample at 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. Wettability is studied by measuring the contact angle follows Young's equation and describes the balance at the three-phase line between solid (s), liquid (l) and vapor (v):

$$\gamma_{sv} = \gamma_{sl} + \gamma_{lv} \cos \Theta_Y$$

The interfacial tensions, γ_{sv} , γ_{sl} and γ_{lv} , form the equilibrium contact angle of wetting, referred to as Young's contact angle Θ_Y . Young's equation assumes that the surface is chemically homogenous and topographically smooth. The relationship between roughness and wettability was corrected by Wenzel, who stated that adding surface roughness will enhance the wettability caused by the chemistry of the surface. Wenzel's statement can be described by:

$$\cos \Theta_m = r \cos \Theta_Y$$

where Θ_m is the measured contact angle, Θ_Y is Young's contact angle, and r is the roughness ratio. The roughness ratio (r) is defined as the ratio between the actual/real and geometric/nominal solid surface area ($r > 1$ for a rough surface). The Wenzel equation

is an approximation that becomes more accurate as the drop becomes larger compared to the scale of the roughness. Our experimental values were modified using the Wenzel equation [61].

Finally, surface energy was determined by applying the Owens, Wendt, Rabel and Kaelble (OWRK) equation to the wettability values obtained with the distilled water and formamide [8,9]. This energy is calculated based on the two surface tensions: a disperse component and a polar component of the surface free energy.

4.3. Isolation and Culture of Human Amniotic Epithelial and Mesenchymal Stem Cells

Human placentas at term were obtained following written informed consent from healthy mothers after normal cesarean deliveries. All procedures used in this study were considered by the ethics committees of the Universitat Internacional Catalunya, and patient consent was signed for the research. All tested methods were conducted in accordance with relevant guidelines and regulations.

The amnion was mechanically separated from the chorion and washed with sterile physiological saline to remove blood and residual connective tissue. The tissue was cut into approximately 6 fragments of 8 cm x 8 cm and sterilized in a laminar flow through successive washing in sterile Phosphate Buffered Saline (PBS) containing penicillin/streptomycin 50 U/mL, amphotericin 50 U/mL, and cephalexin 50 U/mL. Subsequently, the amnion was digested with 0.25% trypsin-EDTA at 37 °C for 20 min. Amniotic epithelial cells (hAECs) were specifically released by this digestion. The remaining cells were centrifuged for 10 min at 1300 rpm. The cell pellet was resuspended and filtered through a sterile 100 µm filter (BD Falcon) to eliminate tissue aggregates. Then, the cell solution was centrifuged for 10 min at 1300 rpm.

To isolate human amniotic mesenchymal stromal cells (hAMSCs), following the separation of hAECs, membrane fragments were digested with 0.75 mg/mL of collagenase II for 90 min at 37 °C with vigorous agitation. The cell suspension was centrifuged for 10 min at 1500 rpm and then filtered. Finally, hAECs and hAMSCs were cultured separately for 24 h in fresh IMDM containing 10% FBS. At the end of each procedure, the total number of isolated cells was determined,

Isolated cells were cultured in IMDM medium containing 10% FBS 4 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 50 U/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin, and 1 mM non-essential amino acids (Invitrogen, Waltham, MA, USA) at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Medium was changed twice per week.

4.4. MTT Viability Assay

HAECs and hAMSCs were seeded in 24-well plates with different titanium discs (2×10^5 cells per well). After the different time incubation, the cells were washed with PBS, and 80 µL of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (final concentration 1 mg/mL) in 400 µL of DMEM-F12 medium containing 10% FBS was added. The cells were incubated for 30 min at 37 °C. In metabolically active cells, the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase converts MTT into formazan, a blue compound. To quantify the blue color generated, the medium was removed, and the formazan was dissolved in 200 µL of 100% ethanol, followed by incubation at room temperature for 5 min. The absorbance at 570 nm was measured using a DR-200Bs Microplate Reader spectrophotometer (Diatek, South Dumdum, India).

4.5. Quantification of Alkaline Phosphatase Activity

Alkaline phosphatase (ALP) activity in hAEC and hAMSC supernatants was quantified with Sensolyte pNPP alkaline phosphatase colorimetric assay (Anaspec, Fremont, CA, USA). The ALP activity was measured at 405 nm in a conventional ELx800 microplate reader (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

4.6. Calcium Intake

hAMSC and hAEC supernatants were collected (1 mL) and stored at -80°C . Calcium ion (Ca^{2+}) concentrations were determined using the Calcium Assay Kit (Abcam, ab102505) in accordance with the manufacturer's protocol. In brief, supernatants were centrifuged at top speed for 5 min at 4°C to eliminate any insoluble material. The resulting supernatants were then transferred to clean tubes. To each sample, 90 μL of the chromogenic reagent was added. The chromogenic complex formed between calcium ions and 0-cresolphthalein was quantified by measuring absorbance at 575 nm using a microplate reader. The absorbance values obtained for each standard were plotted against their final calcium concentration to create a standard curve. The calcium concentrations in the samples were determined by extrapolating from the standard curve. Finally, the calcium intake was calculated by subtracting the calcium concentration of each sample from the total control calcium concentration.

4.7. Quantitative Real-Time PCR Assay (qRT-PCR)

To investigate gene expression in both untreated and treated hAECs and hAMSCs, total RNA was isolated using TRISURE reagent following the manufacturer's instructions (Bioline GmbH, Berlin, Germany). The concentration and purity of the isolated RNA were determined spectrophotometrically at wavelengths of 260 nm and 280 nm in a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DC, USA).

For complementary DNA (cDNA) synthesis, 5 μg of total RNA was subjected to reverse transcription at 50°C for 1 h, employing the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Subsequently, a qRT-PCR reaction was carried out using forward and reverse primers designed specifically for the gene of interest: ALP (F:5'-ACTCCACTTCATCTGGA ACC-3', R:5'-CCTGTTACAGCTCGTACTGCAT-3'), RUNX2 (F:5'-GTCTCACTGCCTCTCAC TTG-3', R:5'-CACACATCTCCTCCCTTCTG-3'), OSTERIX (F:5'-TGAGGAGGAAGTTCCT ATGG-3', R:5'-TTCTTTGTGCCTGCTTTGC-3'), OPN (F:5'-CAGAATGCTGTGTCCTCTGA A-3', R:5'-GTCAATGGAGTCCTGGCTGT-3'), $\alpha 2$ INTEGRIN (F:5'-CCTACAATGTTGGTCT CCCAGA-3', R:5'-AGTAACCAGTTGCCTTTTGGATT-3'), $\alpha 5$ INTEGRIN (F:5'-GGCTCAA CTTAGACGCGGAG-3', R:5'-TGGCTGGTATTAGCCTTGGGT-3'), αv INTEGRIN (F:5'-ATCTGTGAGGTGCGAAACAGGA-3', R:5'-TGGAGCATACTCAACAGTCTTTG-3'), $\beta 1$ IN-TEGRIN (F:5'-CCTACTTCTGCACGATGTGATG-3', R:5'-CCTTTGCTACGGTTGGTTAC ATT-3'), $\beta 3$ INTEGRIN (F:5'-TCCTCATCACCATCCACGA-3', R:5'-TTATCAGCCTGTG CCACGA-3'), $\beta 5$ INTEGRIN (F:5'-TCTCGGTGTGATCTGAGGG-3', R:5'-TGGCGAACCTG TAGCTGGA-3'), CYCLOPHILIN (F:5'-CTTCCCCGATACTTCA-3', R:5'-TCTTGGTGCTACC TC-3'), and GAPDH (F:5'-TCCCTGAGCTGAACGGGAAG-3', R:5'-GGAGGAGTGGGTGTC GCTGT-3'). Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analysis was conducted using a SYBR Premix Ex Taq kit (Takara BIO Inc., Shiga, Japan), and the PCR reactions were executed on an Applied Biosystems 7500 RT-PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Each standard reaction consisted of 1 μM of both forward and reverse primers, 9 μL of SYBR Green master mix 2X, 1 μL of cDNA and water, resulting in a final reaction volume of 15 μL . The thermal cycling process consisted of 95°C for 10 min, 95°C for 30 s, 60°C for 10 min for 40 amplification cycles, and annealing/extension at 60°C for 1 min. The Opticon Monitor 3 Program was employed to determine the threshold cycle (CT) for each well. Relative quantification was determined using the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ technique. In the case of treated samples, the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ value indicated the fold change in gene expression, normalized against housekeeping genes (CYCLOPHILIN and GAPDH).

4.8. Statistical Analysis

Results are presented as the average \pm the standard error of the average (SEM) for a minimum of four independent experiments. Statistical comparisons among the data were performed using two-way analysis of variance (ANOVA). Statistical significance was defined as having a $p \leq 0.05$.

5. Conclusions

Dental implants treated by grit blasting show a higher roughness as well as a higher contact angle and lower surface energy when compared to chemically treated or machined surfaces. The projection of alumina on the titanium surface increases the surface hardness due to the compressive loads on the surface. We have shown that amnion mesenchymal stem cells have higher cell viability and a higher degree of osteogenic differentiation at 1, 7 and 14 days for surfaces treated with grit blasting compared to acid-etched and machined surfaces. HAECs does not seem to differentiate into osteoblastic cells given that we have not observed osteoblastic gene expression or mineralization signs. Therefore, hAMSCs but not hAECs would be suitable for the osseointegration process. Further in vitro and in vivo studies are required to assess the impact of hAMSCs on implant osseointegration. Nevertheless, this novel study offers new insights into the behavior of amniotic stem cells on different Ti surfaces. These findings will enable further research into new therapeutic strategies and applications in oral implantology.

Author Contributions: Conceptualization, R.R., E.V.-O. and A.P.-P.; methodology, J.G., L.C.-Z. and S.P.-A.; software, R.R. and L.C.-Z.; validation, J.G. and L.C.-Z.; formal analysis, J.M. and V.S.-M.; investigation, E.V.-O., I.O.-G. and A.J.-G.; resources, L.M.-G.; data curation, J.G.; writing—original draft preparation, J.G., L.C.-Z. and S.P.-A.; writing—review and editing, R.R., J.M., V.S.-M., E.V.-O., L.M.-G. and A.J.-G.; visualization, A.P.-P.; supervision, L.M.-G., I.O.-G. and A.J.-G.; project administration, J.M. and V.S.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The work was supported by the Spanish Government and the Ministry of Science and Innovation of Spain through research projects CONCEPTO PDC2022-133628-C22 (co-funded by the European Regional Development Fund (ERDF), a way to build Europe) and research project MINECO (PID2022-137496OB-I00).

Institutional Review Board Statement: All procedures used in this study were considered by the ethics committees of the Universitat Internacional Catalunya.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The authors can provide details of the research upon request by letter and commenting on their needs.

Acknowledgments: The authors are grateful to Galimplant for the Oral Implantology Chair with the Universidad de Sevilla.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Albrektsson, T.; Wennerberg, A. On osseointegration in relation to implant surfaces. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* **2019**, *21* (Suppl. S1), 4–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Blatt, S.; Pabst, A.M.; Schiegnitz, E.; Hosang, M.; Ziebart, T.; Walter, C.; Al-Nawas, B.; Klein, M.O. Early cell response of osteogenic cells on differently modified implant surfaces: Sequences of cell proliferation, adherence and differentiation. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* **2018**, *46*, 453–460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Albrektsson, T.; Branemark, P.I.; Hansson, H.A.; Lindstrom, J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop. Scand.* **1981**, *52*, 155–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Pellegrini, G.; Francetti, L.; Barbaro, B.; Del Fabbro, M. Novel surfaces and osseointegration in implant dentistry. *J. Investig. Clin. Dent.* **2018**, *9*, e12349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Velasco-Ortega, E.; Alfonso-Rodriguez, C.A.; Monsalve-Guil, L.; Espana-Lopez, A.; Jimenez-Guerra, A.; Garzon, I.; Alaminos, M.; Gil, F.J. Relevant aspects in the surface properties in titanium dental implants for the cellular viability. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2016**, *64*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Pegueroles, M.; Aparicio, C.; Bosio, M.; Engel, E.; Gil, F.J.; Planell, J.A.; Altankov, G. Spatial organization of osteoblast fibronectin matrix on titanium surfaces: Effects of roughness, chemical heterogeneity and surface energy. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 291–301. [[CrossRef](#)]
7. Lange, R.; Luthen, F.; Beck, U.; Rychly, J.; Baumann, A.; Nebe, B. Cell-extracellular matrix interaction and physico-chemical characteristics of titanium surfaces depend on the roughness of the material. *Biomol. Eng.* **2002**, *19*, 255–261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

8. Annarelli, C.C.; Fornazero, J.; Cohen, R.; Bert, J.; Besse, J. Colloidal Protein Solutions as a New Standard Sensor for Adhesive Wettability Measurements. *J. Colloid. Interface Sci.* **1999**, *213*, 386–394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Lukaszewska-Kuska, M.; Wirstlein, P.; Majchrowski, R.; Dorocka-Bobkowska, B. Osteoblastic cell behaviour on modified titanium surfaces. *Micron* **2018**, *105*, 55–63. [[CrossRef](#)]
10. Aparicio, C.; Gil, F.J.; Fonseca, C.; Barbosa, M.; Planell, J.A. Corrosion behaviour of commercially pure titanium shot blasted with different materials and sizes of shot particles for dental implant applications. *Biomaterials* **2003**, *24*, 263–273. [[CrossRef](#)]
11. Ferraris, S.; Truffa Giachet, F.; Miola, M.; Bertone, E.; Varesano, A.; Vineis, C. Nanogrooves and keratin nanofibers on titanium surfaces aimed at driving gingival fibroblasts alignment and proliferation without increasing bacterial adhesion. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2017**, *76*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Zhang, J.; Liu, J.; Wang, C.; Chen, F.; Wang, X.; Lin, K. A comparative study of the osteogenic performance between the hierarchical micro/submicro-textured 3D-printed Ti6Al4V surface and the SLA surface. *Bioact. Mater.* **2020**, *5*, 9–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Velasco, E.; Monsalve-Guil, L.; Jimenez, A.; Ortiz, I.; Moreno-Munoz, J.; Nunez-Marquez, E.; Pegueroles, M.; Pérez, R.A.; Gil, F.J. Importance of the Roughness and Residual Stresses of Dental Implants on Fatigue and Osseointegration Behavior. In Vivo Study in Rabbits. *J. Oral. Implantol.* **2016**, *42*, 469–476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Gil, J.; Perez, R.; Herrero-Climent, M.; Rizo-Gorrita, M.; Torres-Lagares, D.; Gutierrez, J.L. Benefits of Residual Aluminum Oxide for Sand Blasting Titanium Dental Implants: Osseointegration and Bactericidal Effects. *Materials* **2021**, *15*, 178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Gil, F.J.; Herrero-Climent, M.; Lazaro, P.; Rios, J.V. Implant-abutment connections: Influence of the design on the microgap and their fatigue and fracture behavior of dental implants. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2014**, *25*, 1825–1830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Gil, F.J.; Planell, J.A.; Padros, A.; Aparicio, C. The effect of shot blasting and heat treatment on the fatigue behavior of titanium for dental implant applications. *Dent. Mater.* **2007**, *23*, 486–491. [[CrossRef](#)]
17. Cervino, G.; Fiorillo, L.; Iannello, G.; Santonocito, D.; Risitano, G.; Cicciu, M. Sandblasted and Acid Etched Titanium Dental Implant Surfaces Systematic Review and Confocal Microscopy Evaluation. *Materials* **2019**, *12*, 1763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Velasco-Ortega, E.; Ortiz-Garcia, I.; Jimenez-Guerra, A.; Nunez-Marquez, E.; Moreno-Munoz, J.; Rondon-Romero, J.L.; Cabanillas-Balsera, D.; Gil, J.; Muñoz-Guzón, F.; Monsalve-Guil, L. Osseointegration of Sandblasted and Acid-Etched Implant Surfaces. A Histological and Histomorphometric Study in the Rabbit. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8507. [[CrossRef](#)]
19. Zareidoost, A.; Yousefpour, M.; Ghaseme, B.; Amanzadeh, A. The relationship of surface roughness and cell response of chemical surface modification of titanium. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, *23*, 1479–1488. [[CrossRef](#)]
20. Godoy-Gallardo, M.; Guillem-Marti, J.; Sevilla, P.; Manero, J.M.; Gil, F.J.; Rodriguez, D. Anhydride-functional silane immobilized onto titanium surfaces induces osteoblast cell differentiation and reduces bacterial adhesion and biofilm formation. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2016**, *59*, 524–532. [[CrossRef](#)]
21. Guillem-Marti, J.; Cinca, N.; Punset, M.; Cano, I.G.; Gil, F.J.; Guilemany, J.M.; Dosta, S. Porous titanium-hydroxyapatite composite coating obtained on titanium by cold gas spray with high bond strength for biomedical applications. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *180*, 245–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Pereira, R.; Maia, P.; Rios-Santos, J.V.; Herrero-Climent, M.; Rios-Carrasco, B.; Aparicio, C.; Gil, J. Influence of Titanium Surface Residual Stresses on Osteoblastic Response and Bacteria Colonization. *Materials* **2024**, *17*, 1626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Dutta, S.R.; Passi, D.; Singh, P.; Atri, M.; Mohan, S.; Sharma, A. Risks and complications associated with dental implant failure: Critical update. *Natl. J. Maxillofac. Surg.* **2020**, *11*, 14–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Bardis, D.; Agop-Forna, D.; Pelekanos, S.; Chele, N.; Dascalu, C.; Torok, R.; Török, B.; Cristea, I.; Bardi, P.M.; Forna, N. Assessment of Various Risk Factors for Biological and Mechanical/Technical Complications in Fixed Implant Prosthetic Therapy: A Retrospective Study. *Diagnostics* **2023**, *13*, 2341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Perrotti, V.; Palmieri, A.; Pellati, A.; Degidi, M.; Ricci, L.; Piattelli, A.; Carinci, F. Effect of titanium surface topographies on human bone marrow stem cells differentiation in vitro. *Odontology* **2013**, *101*, 133–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Barone, A.; Toti, P.; Bertossi, D.; Marconcini, S.; De Santis, D.; Nocini, P.F.; Iurlaro, A.; Alfonsi, F.; Covani, U. Gene Expression of Human Mesenchymal Stem Cells Cultured on Titanium Dental Implant Surfaces. *J. Craniofac. Surg.* **2016**, *27*, 712–717. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Choi, H.; Park, K.H.; Jung, N.; Shim, J.S.; Moon, H.S.; Kim, H.J.; Ku, S.Y.; Park, Y.B. In Vivo Study for Clinical Application of Dental Stem Cell Therapy Incorporated with Dental Titanium Implants. *Materials* **2021**, *14*, 381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Li, H.; Huang, J.; Wang, Y.; Chen, Z.; Li, X.; Wei, Q.; Liu, X.; Wang, Z.; Wen, B.; Zhao, Y.; et al. Nanoscale Modification of Titanium Implants Improves Behaviors of Bone Mesenchymal Stem Cells and Osteogenesis In Vivo. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2022**, *2022*, 2235335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Long, E.G.; Buluk, M.; Gallagher, M.B.; Schneider, J.M.; Brown, J.L. Human mesenchymal stem cell morphology, migration, and differentiation on micro and nano-textured titanium. *Bioact. Mater.* **2019**, *4*, 249–255. [[CrossRef](#)]
30. Tseng, K.F.; Shiu, S.T.; Hung, C.Y.; Chan, Y.H.; Chee, T.J.; Huang, P.C.; Lai, P.C.; Feng, S.W. Osseointegration Potential Assessment of Bone Graft Materials Loaded with Mesenchymal Stem Cells in Peri-Implant Bone Defects. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 862. [[CrossRef](#)]
31. Saito, S.; Lin, Y.C.; Murayama, Y.; Hashimoto, K.; Yokoyama, K.K. Human amnion-derived cells as a reliable source of stem cells. *Curr. Mol. Med.* **2012**, *12*, 1340–1349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Magatti, M.; Vertua, E.; Cargnoni, A.; Silini, A.; Parolini, O. The Immunomodulatory Properties of Amniotic Cells: The Two Sides of the Coin. *Cell Transplant.* **2018**, *27*, 31–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Luan, F.; Ma, K.; Mao, J.; Yang, F.; Zhang, M.; Luan, H. Differentiation of human amniotic epithelial cells into osteoblasts is induced by mechanical stretch via the Wnt/ β -catenin signalling pathway. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *18*, 5717–5725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Wang, Q.; Wu, W.; Han, X.; Zheng, A.; Lei, S.; Wu, J.; Chen, H.; He, C.; Luo, F.; Liu, X. Osteogenic differentiation of amniotic epithelial cells: Synergism of pulsed electromagnetic field and biochemical stimuli. *BMC Musculoskelet. Disord.* **2014**, *15*, 271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
35. Hendrijantini, N.; Hartono, P. Phenotype Characteristics and Osteogenic Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Amnion Membrane (HAMSCs) and Umbilical Cord (HUC-MSCs). *Acta Inform. Medica* **2019**, *27*, 72–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
36. Xing, Y.; Zhang, M.S.; Xiao, J.H.; Liu, R.M. Galangin induces the osteogenic differentiation of human amniotic mesenchymal stem cells via the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **2022**, *935*, 175326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Chen, P.; Lu, M.; Wang, T.; Dian, D.; Zhong, Y.; Aleahmad, M. Human amniotic membrane as a delivery vehicle for stem cell-based therapies. *Life Sci.* **2021**, *272*, 119157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Balshi, T.J.; Wolfinger, G.J.; Balshi, S.F.; Bidra, A.S. A 30-Year Follow-Up of a Patient with Mandibular Complete-Arch Fixed Implant-Supported Prosthesis on 4 Implants: A Clinical Report. *J. Prosthodont.* **2019**, *28*, 97–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Zhao, G.; Schwartz, Z.; Wieland, M.; Rupp, F.; Geis-Gerstorfer, J.; Cochran, D.L.; Cochran, B.D. Boyan. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2005**, *74*, 49–58. [[CrossRef](#)]
40. Velasco-Ortega, E.; Fos-Parra, I.; Cabanillas-Balsera, D.; Gil, J.; Ortiz-Garcia, I.; Giner, M.; Jiménez-Guerra, Á. Osteoblastic Cell Behavior and Gene Expression Related to Bone Metabolism on Different Titanium Surfaces. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 3523. [[CrossRef](#)]
41. Nicolas-Silvente, A.I.; Velasco-Ortega, E.; Ortiz-Garcia, I.; Monsalve-Guil, L.; Gil, J.; Jimenez-Guerra, A. Influence of the Titanium Implant Surface Treatment on the Surface Roughness and Chemical Composition. *Materials* **2020**, *13*, 314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Palmquist, A.; Omar, O.M.; Esposito, M.; Lausmaa, J.; Thomsen, P. Titanium oral implants: Surface characteristics, interface biology and clinical outcome. *J. R. Soc. Interface.* **2010**, *7* (Suppl. S5), S515–S527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Murphy, M.; Walczak, M.S.; Thomas, A.G.; Silikas, N.; Berner, S.; Lindsay, R. Toward optimizing dental implant performance: Surface characterization of Ti and TiZr implant materials. *Dent. Mater.* **2017**, *33*, 43–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Yin, L.; Chang, Y.; You, Y.; Liu, C.; Li, J.; Lai, H.C. Biological responses of human bone mesenchymal stem cells to Ti and TiZr implant materials. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* **2019**, *21*, 550–564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Park, J.W.; Tsutsumi, Y.; Park, E.K. Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Modulated by Surface Manganese Chemistry in SLA Titanium Implants. *Biomed. Res. Int.* **2022**, *2022*, 5339090. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Wang, W.; Wang, Z.; Fu, Y.; Dunne, N.; Liang, C.; Luo, X.; Liu, K.; Li, X.; Pang, X.; Lu, K. Improved osteogenic differentiation of human amniotic mesenchymal stem cells on gradient nanostructured Ti surface. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2020**, *108*, 1824–1833. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Sola-Ruiz, M.F.; Perez-Martinez, C.; Labaig-Rueda, C.; Carda, C.; Martin De Llano, J.J. Behavior of Human Osteoblast Cells Cultured on Titanium Discs in Relation to Surface Roughness and Presence of Melatonin. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 823. [[CrossRef](#)]
48. Vansana, P.; Kakura, K.; Taniguchi, Y.; Egashira, K.; Matsuzaki, E.; Tsutsumi, T.; Kido, H. The effect of AMP kinase activation on differentiation and maturation of osteoblast cultured on titanium plate. *J. Dent. Sci.* **2022**, *17*, 1225–1231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Si, J.; Dai, J.; Zhang, J.; Liu, S.; Gu, J.; Shi, J.; Shen, S.G.; Guo, L. Comparative investigation of human amniotic epithelial cells and mesenchymal stem cells for application in bone tissue engineering. *Stem Cells Int.* **2015**, *2015*, 565732. [[CrossRef](#)]
50. Park, B.H.; Jeong, E.S.; Lee, S.; Jang, J.H. Bio-functionalization and in-vitro evaluation of titanium surface with recombinant fibronectin and elastin fragment in human mesenchymal stem cell. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0260760. [[CrossRef](#)]
51. Yin, L.; Zhou, Z.X.; Shen, M.; Chen, N.; Jiang, F.; Wang, S.L. The Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells (hAMSCs) Improve the Implant Osseointegration and Bone Regeneration in Maxillary Sinus Floor Elevation in Rabbits. *Stem Cells Int.* **2019**, *2019*, 9845497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Yang, J.; Wang, J.; Yuan, T.; Zhu, X.D.; Xiang, Z.; Fan, Y.J.; Zhang, X.D. The enhanced effect of surface microstructured porous titanium on adhesion and osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2013**, *24*, 2235–2246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Humphries, M.J.; Travis, M.A.; Clark, K.; Mould, A.P. Mechanisms of integration of cells and extracellular matrices by integrins. *Biochem. Soc. Trans.* **2004**, *32 Pt 5*, 822–825. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Olivares-Navarrete, R.; Hyzy, S.L.; Hutton, D.L.; Erdman, C.P.; Wieland, M.; Boyan, B.D.; Schwartz, Z. Direct and indirect effects of microstructured titanium substrates on the induction of mesenchymal stem cell differentiation towards the osteoblast lineage. *Biomaterials* **2010**, *31*, 2728–2735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Lai, M.; Hermann, C.D.; Cheng, A.; Olivares-Navarrete, R.; Gittens, R.A.; Bird, M.M.; Walker, M.; Cai, Y.; Cai, K.; Sandhage, K.H.; et al. Role of $\alpha 2\beta 1$ integrins in mediating cell shape on microtextured titanium surfaces. *J. Biomed. Mater. Res. A.* **2015**, *103*, 564–573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Liu, Q.W.; Huang, Q.M.; Wu, H.Y.; Zuo, G.S.; Gu, H.C.; Deng, K.Y.; Xin, H.B. Characteristics and Therapeutic Potential of Human Amnion-Derived Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 970. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

57. Li, J.; Zhou, Z.; Wen, J.; Jiang, F.; Xia, Y. Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells Promote Endogenous Bone Regeneration. *Front. Endocrinol.* **2020**, *11*, 543623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Manero, J.M.; Gil, F.J.; Padros, E.; Planell, J.A. Applications of environmental scanning electron microscopy (ESEM) in biomaterials field. *Microsc. Res. Tech.* **2003**, *61*, 469–480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Gil, F.J.; Solano, E.; Pena, J.; Engel, E.; Mendoza, A.; Planell, J.A. Microstructural, mechanical and cytotoxicity evaluation of different NiTi and NiTiCu shape memory alloys. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2004**, *15*, 1181–1185. [[CrossRef](#)]
60. ISO 25178; Surface Roughness Standards. European Union: Maastricht, The Netherlands, 2001.
61. Wenzel, R.W. Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Ind. Eng. Chem.* **1936**, *20*, 988. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN CIENTÍFICA

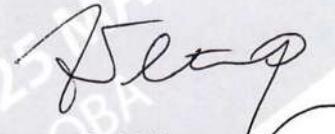
Cabo Zabala L, Ortiz García I, Jiménez Guerra A,
Matos Garrido N, Monsalve Guil L, Velasco Ortega E

han presentado la
COMUNICACIÓN ORAL

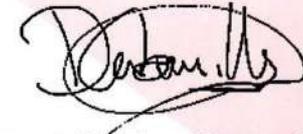
*Evaluación de la viabilidad de células madre
amnióticas cultivadas en distintos materiales
usados en implantología oral*



SOCIEDAD DE
IMPLANTOLOGÍA ORAL
LATINOAMERICANA
**XVI REUNIÓN INTERNACIONAL
DE IMPLANTOLOGÍA ORAL**
Córdoba, 24 - 25 de marzo de 2023



Eugenio Velasco Ortega
Presidente Comité Científico



Daniel Cabanillas Balsera
Secretario Comité Científico

CÓRDOBA, 24 - 25 MARZO 2023

www.siola.org



Sociedad Española de Implantes

XXXIII CONGRESO NACIONAL XXVI INTERNACIONAL

Costa Adeje, 24-25 de Noviembre de 2023

CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN CIENTÍFICA

a favor de

Monsalve Guil L, Cabo Zavala L, Perez Perez A,
Riedel R, Gil Mur J, Velasco Ortega E

por el póster presentado

La influencia de la superficie de los implantes dentales
en el comportamiento biológico de las células madre
de origen amniótico

D. Rafael Gómez Font
Presidente Comité Científico
Tenerife 2023

D. Iván Ortiz García
Secretario S E I





Sociedad Española de Implantes

XXXIII CONGRESO NACIONAL XXVI INTERNACIONAL

Costa Adeje, 24-25 de Noviembre de 2023

PREMIO AL MEJOR PÓSTER

concedido a

Monsalve Guil L, Cabo Zavala L, Perez Perez A, Riedel R,
Gil Mur J, Velasco Ortega E

por la comunicación presentada con el título

La influencia de la superficie de los implantes dentales
en el comportamiento biológico de
las células madre de origen amniótico

D. Rafael Gómez Font
Presidente Comité Científico
Tenerife 2023

D. Iván Ortiz García
Secretario S E I

