



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS Y COMUNITARIAS
LABORATORIO DE NANOBIO MATERIALES**

**“PREPARACIÓN DE RECUBRIMIENTOS NANOESTRUCTURADOS PARA LA
OSEOINTEGRACIÓN DE SUPERFICIES DE TITANIO”.**

Débora Alejandra Inzunza Araya.

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Cristian Covarrubias Gallardo.

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 11100495.
Santiago - Chile
2012.**

DEDICATORIA

**A mi familia que de una u otra forma
buscaron siempre ayudarme en esta ardua tarea.**

¡Hoy se cumple una meta y cierra una etapa!

AGRADECIMIENTOS

**Al Padre Celestial, ya que sin su ayuda
no estaría donde me encuentro hoy.**

“Pero el Señor estuvo a mi lado y me dio fuerzas...”

2 Ti 4:22a.

**A mi novio Chris, por su paciencia y
apoyo incondicional durante todos estos años.**

ÍNDICE

1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN	7
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	19
4. MATERIAL Y MÉTODO	20
5. RESULTADOS	25
6. DISCUSIÓN	38
7. CONCLUSIÓN	44
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1. RESUMEN.

Introducción.

El éxito de los implantes depende del grado de oseointegración en la interfase metal tejido óseo. La nanotopografía (rugosidad y porosidad) y la composición química de la superficie del implante, son algunos de los factores que determinan el proceso de oseointegración. Estas propiedades pueden ser controladas mediante técnicas que ofrece la nanotecnología.

En este trabajo se sintetizan recubrimientos de sílice con una estructura nanoporosa ordenada sobre titanio con el objetivo de obtener propiedades de oseointegración más favorables.

Material y método.

Los recubrimientos fueron sintetizados mediante técnica sol-gel/EISA, utilizando dos surfactantes (P123, PEG) como agente modeladores de poros. Se prepararon adicionalmente recubrimientos dopados con iones calcio y fosfato; además de una película de sílice no porosa utilizada como control. Las películas fueron caracterizadas a través de difracción de rayos-X (DRX), microscopías SEM y TEM y sortimetría de N₂. Se realizaron pruebas de mineralización en fluido fisiológico simulado (SBF) y adsorción de proteínas extracelulares. Sobre cada superficie se evaluó la viabilidad, proliferación y adhesión celular, utilizando células tipo osteoblastos (Saos-2), así como la diferenciación osteogénica con células madres mesenquimales de médula ósea (hBMSCs).

Resultados.

El método EISA permitió sintetizar recubrimientos de sílice sobre las superficies de titanio, con una estructura nanoporosa altamente ordenada. Se determinó que esta estructura corresponde a un arreglo de nanoporos hexagonales con un diámetro de poro de ~4 nm y con una alta área superficial de 400 m²/g.

Los resultados mostraron que las superficies nanoporosas favorecen la formación de hidroxiapatita y la adsorción de proteínas extracelulares, en comparación a la superficie de titanio sin modificar.

Las superficies nanoestructuradas favorecieron también notablemente la proliferación y adhesión de células Saos2, lo cual se atribuye a la mayor adsorción de proteínas extracelulares que produce la alta área superficial del recubrimiento. Estas superficies nanoporosas también promueven la diferenciación osteogénica de las células hBMSCs, provocando la formación espontánea de nódulos de mineralización en condiciones basales, particularmente el recubrimiento dopado con calcio y fosfato (CaP). Este estímulo osteogénico se puede atribuir a señales mecánicas determinadas por la nanotopografía y a la composición química del recubrimiento CaP.

Conclusión.

Los recubrimientos nanoporosos preparados mediante la técnica sol-gel/EISA incrementan la formación de hidroxiapatita y la adhesión de osteoblastos, así mismo, producen la diferenciación osteogénica de las células madres. Las propiedades bioactivas exhibidas por los recubrimientos de sílice nanoporosa podrían contribuir a mejorar la oseointegración de los implantes de titanio.

2. INTRODUCCIÓN.

Desde tiempos remotos el hombre ha intentado reemplazar los dientes perdidos por traumatismos, caries o enfermedad periodontal. Actualmente devolver funcionalidad y estética es uno de los principales desafíos de la odontología. Dentro de las alternativas para resolver esta problemática, surgen los intentos por reemplazar los dientes perdidos a través de implantes.

Los primeros implantes dentales colocados *in vivo*, de los que tenemos evidencia, son los realizados en la cultura Maya. Se encontró en Honduras, un cráneo que presentaba tres trozos de concha de molusco en los alveolos de los incisivos mandibulares [1]. Este hallazgo arqueológico data del años 600 d.C. Estudios radiográficos que evidenciaron hueso compacto alrededor de los implantes, es lo que hace pensar que estos fragmentos de concha fueron introducidos en vida.

A principios del siglo XIX se utilizaron los primeros implantes metálicos intraalveolares. Destaca Maggiolo [2] quien introdujo un implante de oro en el alvéolo de un diente recién extraído. Varios dentistas a finales del siglo XIX y principios del XX, imitando las prácticas de cirujanos que utilizaban diversos elementos para tratar fracturas, intentaron utilizar distintos metales como platino y plata [2], sin embargo el problema radicaba en encontrar el metal adecuado.

En Europa, distintas escuelas intentaron desarrollar implantes con diversas técnicas, diseños y materiales, pero recién en una conferencia celebrada en Harvard en 1979, se presentaron los estudios experimentales de un grupo sueco dirigido por P.I. Brånemark y T. Albrektson, estos resultados marcan un hito fundamental en el desarrollo de la implantología moderna. Estas investigaciones datan de los años '50 con los estudios clásicos realizados por Brånemark acerca de la microvascularización post traumatismo [3,4], quien al intentar retirar cámaras ópticas de titanio introducidas en el espesor del hueso peroné de conejos, no las

pudo extraer ya que la estructura del titanio se había incorporado completamente al hueso. Con estas observaciones Brånemark acuñó el término **oseointegración**, definiéndolo como una conexión directa estructural y funcional entre hueso vivo, ordenado y la superficie de un implante sometido a carga funcional.

A partir de este hito la implantología se ha difundido como una disciplina quirúrgica dentro de la odontología; con base científica cuyo objetivo es la recuperación de tejidos perdidos, introduciendo biomateriales en el espesor del hueso humano.

En las últimas décadas, la utilización de prótesis sobre implantes de titanio se ha convertido en un tratamiento ampliamente aceptado para la rehabilitación oral de los pacientes parcial o totalmente desdentado [5]. A pesar del alto porcentaje de éxito mostrado por estudios de larga data, todavía existe un considerable número de fracasos en el tratamiento con implantes [6]. Dichos fracasos están relacionados con la pérdida temprana o tardía del implante. Diversos factores deben ser valorados para minimizar las probabilidades de la pérdida prematura del dispositivo, entre ellos: calidad ósea [7], factores sistémicos, hábito tabáquico, riesgos ocasionados por trauma quirúrgico, la contaminación bacteriana durante la inserción e incluso una mala distribución de fuerzas que generen sobrecarga. Por otro lado, hay factores que se relacionan con la pérdida tardía de los implantes, entre ellos se encuentran: el medioambiente de la cavidad oral y la capacidad del propio individuo para mantener el equilibrio con el implante [8].

Sin embargo, el éxito está determinado por el grado de oseointegración en la interfase metal tejido óseo. En muchos casos la falta de oseointegración es atribuida a una deficiente formación de tejido óseo en la interfase [9], como consecuencia de la predominante formación de tejido fibroso; lo cual resulta en micromovimientos que provocan una eventual inflamación y/o fatiga y por consiguiente la falla del implante.

El proceso de oseointegración, hoy en día, se encuentra muy bien descrito a nivel histológico y celular [10,11]. Durante el procedimiento quirúrgico de inserción de un implante dental es común que se presente sangrado, debido a la lesión causada sobre los tejidos blandos (encía) y los tejidos duros (hueso alveolar). El sangrado es el punto de partida de la serie de eventos biológicos que concluyen con la oseointegración de la interfase hueso – implante, gracias a la formación inicial del coágulo. La posterior degradación de este coágulo, permite la recuperación de las estructuras vasculares y la formación de una nueva red fibrilar de tejido conectivo primario, denominado tejido de granulación. Es en este tejido de granulación donde comienza la migración y diferenciación de las células osteoprogenitoras que finalmente restauran la matriz ósea mineralizada [12].

El proceso de oseointegración está determinado por una serie de eventos que ocurren en una escala nano y micrométrica. Inmediatamente después de la inserción del implante, se produce la adsorción de moléculas de agua e iones; posteriormente ocurre la adsorción de diferentes proteínas extracelulares tales como fibronectina, vitronectina y laminina (ECM) [13]. Dominios específicos de éstas proteínas (RGD = Arginina – Glicina-Ac. Aspártico) permiten la posterior adhesión de células osteogénicas, unidas a su vez, mediante proteínas transmembranas (integrinas). Las células adheridas sobre el biomaterial proliferan, se diferencian y secretan matriz extracelular para la posterior formación de tejido mineralizado (hueso).

Debido a que estos eventos tempranos ocurren a una escala nanométrica, actualmente se busca controlar estos procesos produciendo modificaciones de la estructura del implante a esa misma escala.

El titanio y sus aleaciones son los materiales más comúnmente utilizados para la fabricación de implantes dentales. Estos materiales poseen excelentes propiedades mecánicas, de biocompatibilidad y resistencia a la corrosión [14]. Aún así, el titanio no posee la capacidad de establecer la formación de un íntimo enlace químico con el tejido óseo.

Varios investigadores han descrito los efectos de las superficies de los implantes, con topografías específicas, sobre el comportamiento de adhesión de células osteoblásticas [15,16]. La topografía de un material puede ser definida por el conjunto de características morfológicas que distinguen su superficie, tales como rugosidad, textura o porosidad. Esta característica es importante debido a que el proceso de formación de hueso es atribuido, en última instancia, a la acción de los osteoblastos que interactúan con la superficie del implante. En conjunto, esas investigaciones han mostrado que mejorando la topografía de la superficie de un implante, se puede obtener una respuesta de oseointegración más rápida y confiable [17,18]

Durante los primeros 10 ó 20 años de experiencia en la aplicación de implantes endoóseos, predominaba en el pensamiento clínico, el concepto de que los implantes comerciales de titanio puro y de superficie “lisa” biocompatible, ayudaban al éxito de la oseointegración. Posteriormente, investigaciones que experimentaron con diferentes topografías y composiciones químicas de los materiales, llevaron a nuevas consideraciones con el fin de mejorar la capacidad de formación de hueso sobre la superficie del implante. Algunos investigadores han descrito los efectos específicos de la topografía, rugosidad o porosidad de la superficie del titanio en la adhesión de células osteoblásticas [17,19]. Se ha demostrado que el incremento de superficie específica, aumenta la eficacia de la síntesis de matriz extracelular de las células adhesivas y proporciona una respuesta de oseointegración más rápida y fiable [20,21,22]. La importancia de la topografía para la oseointegración ha llevado al estudio de la superficie de los implantes endo-óseos, focalizando los esfuerzos en mejorar la actividad de las células formadoras de hueso en la interfase hueso – implante.

Los implantes dentales de titanio cuya superficie presenta modificaciones topográficas a una escala micrométrica, son aceptados y se encuentran disponibles en el mercado [23,24]. Sin embargo, este tipo de implante es considerado como dispositivos biocompatibles con limitada capacidad de afectar directamente el destino de los tejidos circundantes (como estimular la aposición ósea, limitar la formación de tejido fibroso o prevenir la reabsorción).

Recientemente, debido al desarrollo de la **nanotecnología**, la investigación se ha focalizado en producir modificaciones topográficas a **escala nanométrica**; con el propósito de interactuar de forma distinta con el tejido vivo en comparación a los materiales tradicionales que se encuentran en la escala micrométrica.

La nanotecnología ha sido definida como la: “creación y utilización de materiales, dispositivos y sistemas, a través del control de sus propiedades en escala de dimensión nanométrica (1-100 nm)” (N.A.S.A National Aeronautics and Space Administration). La aplicación de la nanotecnología a la superficie de implantes dentales, involucra una asociación bi-dimensional de las características de la superficie (a través y a lo largo del plano principal de la superficie). Estas nano-características pueden ser dispuestas de manera ordenada (isotrópica) y con formas definidas (hexagonal, cúbicas etc.) o de manera no ordenada (anisotrópica); lo que a menudo depende de la técnica utilizada y de la naturaleza del material.

Cuando estos conceptos son aplicados a la superficie de los implantes, se busca dotar a la superficie con una estructura de escala nanométrica que genera un comportamiento fisicoquímico (unión química con el hueso) o bioquímico (alteración de la adsorción de proteínas o adhesión de células formadoras de hueso) diferente de la superficie del implante.

Las modificaciones a escala nanométrica de las superficies de implantes endoóseos pueden afectar sus características topográficas así como su composición química. Algunos investigadores (Alberketsson y Wennerberg [23]), dividen las propiedades de las superficies de los implantes en tres categorías: (1) Propiedades Mecánicas, (2) Propiedades Topográficas y (3) Propiedades Fisicoquímicas. Ellos indican que estas características están relacionadas, y que, cambiando una de ellas, las otras también se verán afectadas. Esta importante observación parece ser aún más relevante en la discusión de modificaciones de la topografía a nivel nanométrico.

La **nanotopografía** ha mostrado influir en la adhesión, proliferación, diferenciación y adhesión específica de las células [25]. Estos cambios están relacionados con la estructura de la superficie y dan lugar a importantes cambios y relaciones biomiméticas entre la superficie del material aloplástico del implante y el tejido vivo. Una superficie con nanotopografía parece afectar la interacción y el comportamiento celular cuando se compara con el tamaño de la topografía de superficie convencional (micrométrica) [26].

Los efectos específicos de la nanotopografía en el comportamiento celular han sido demostrados utilizando un amplio rango de tipos celulares [27,28,29]. Las superficies nanoestructuradas poseen propiedades únicas que alteran la adhesión celular directa (interacción célula-superficie) e indirectamente (interacción proteína-superficie). Se cree que los cambios en la interacción inicial entre la superficie, las proteínas extracelulares y las proteínas que componen la célula, controlan la adhesión de los osteoblastos [25]. Este es un aspecto crítico en el proceso de osteointegración: cuando un implante entra en contacto con un ambiente biológico, la adsorción de proteínas que ocurre inmediatamente, guiará el proceso subsecuente de adhesión y proliferación celular.

La rugosidad de la superficie a escala nanométrica es un factor importante en la interacción de las proteínas que afectarán directamente la actividad celular, para controlar la formación de tejido óseo en la superficie del implante [30]. Independientemente de la adsorción de proteínas en la superficie, las células tienen la habilidad de reconocer la nanoestructura. Adicionalmente a este efecto de adhesión celular, se ha encontrado también que las superficies nanoestructuradas pueden afectar la proliferación celular [31,32] y la diferenciación de las células [33]. El mecanismo de cómo afectan las superficies nanoestructuradas en la modulación de la adhesión y proliferación de los osteoblastos no ha sido completamente dilucidado, y es una temática de actual interés.

Actualmente existen algunas técnicas para producir modificaciones nanométricas en superficies de implantes de titanio, mientras que diversos métodos están bajo investigación [9]. Una de las técnicas involucra el método físico de compactación de nanopartículas de TiO_2 que llevan a superficies con granulometría nanométrica [34]. Una ventaja de este método es que conserva la química de la superficie entre diferentes tipos de topografía. Un segundo método es el tratamiento químico de superficies del material al exponerlas a reactivos tales como ácidos o álcalis [35] y, así, crear una topografía nanométrica. Dicho método es muy popular actualmente en el campo de los implantes dentales. Se usan también tratamientos químicos con H_2O_2 [36] o con HF [37] para crear nanoestructuras discretas, con el fin de mejorar el proceso de mineralización en la superficie del implante. Otra ruta para crear estructuras nanométricas en una superficie de titanio, es la aplicación de métodos ópticos (litografía), los cuales se basan en el uso de una longitud de onda de dimensiones específicas para lograr una modificación a escala apropiada [36].

Sin embargo, estos enfoques requieren métodos intensivos de preparación y requieren un desarrollo mayor antes de ser trasladados al área clínica. Adicionalmente la mayoría de éstos métodos no permite un control preciso de la nanoestructura, resultando complejo la obtención de una nanotopografía uniforme sobre toda la superficie del implante. Por otro lado, el uso de láseres para promover una topografía en la superficie del titanio brinda solo modificaciones a nivel micrométrico, no alcanzando la escala nanométrica [38]. Todas estas técnicas son en general complejas y requieren de un alto nivel de inversión en cuanto a energía, equipos y/o tiempo.

Una estrategia alternativa para crear modificaciones en la superficie de materiales para implantes consiste en recubrirlos con películas de materiales de naturaleza y propiedades distintas. Un tipo de recubrimiento estudiado para los implantes de titanio es el recubrimiento con un spray de plasma de hidroxiapatita. Sin embargo, a pesar de la bioactividad y biocompatibilidad de la hidroxiapatita, esta técnica ha sido cuestionada últimamente debido a que las altas temperaturas del proceso de spray (3000°C) [39], alteran la hidroxiapatita convirtiéndola en una

fase con propiedades bioactivas limitadas y el recubrimiento no presenta una estructura uniforme sobre la superficie del implante.

Por otro lado, existen los recubrimientos de sílice, que han demostrado ser capaces de prevenir la corrosión en aleaciones de titanio (Ti-6Al-4V) y acero quirúrgico (316L) en un medio fisiológico [40,41]. La sílice también se conoce por ser un catalizador natural para la formación de hidroxiapatita, mostrando bioactividad en estudios *in vitro* [40,42] y en estudios *in vivo* [43,44]. En todos estos estudios, los recubrimientos de sílice han sido preparados usando una técnica conocida como “**sol-gel**”. Este es un método adecuado para lograr películas protectoras y biocompatibles sobre superficies de implantes metálicos [43,44,45,46]. Mediante este proceso se obtiene un gel o una mezcla de sol/gel (dependiendo de las condiciones de preparación), el cual puede ser utilizado para recubrir la superficie de titanio utilizando procedimientos de “slip, spin o dip-coating”.

Un “sol” es una suspensión coloidal de partículas sólidas en un líquido. Un coloide es una suspensión en la cual la fase dispersa es tan pequeña (entre 1-1000 nm) que las fuerzas de gravedad son nulas y las interacciones están dominadas por fuerzas de corto alcance. Un “gel” es una sustancia que contiene un esqueleto sólido y continuo encerrando un líquido ó fase líquida continua. La continuidad de la estructura sólida provee de elasticidad al gel [47]. Los geles pueden también estar formados por soles particulados cuando fuerzas atractivas de dispersión causan que las partículas permanezcan juntas en un tipo de conexión que asemeja una red.

El **proceso sol-gel**, como lo dice su nombre, envuelve la evolución de redes inorgánicas a través de la formación de una suspensión coloidal (sol) y la gelación del sol para formar una red en una fase continua de líquido (gel).

La **técnica sol-gel** es una de las técnicas que permite preparar materiales con un alto control de su nanoestructura porosa.

Mediante la técnica sol-gel se producen estructuras porosas de materiales tales óxido de silicio (sílice) y óxido de titanio, mediante reacciones de hidrólisis y polimerización de hidróxidos metálicos, alcóxidos y/o sales inorgánicas [47,48,49,50,51]. Esta técnica sol-gel también facilita la incorporación de moléculas orgánicas y biológicas activas e incluso células dentro de matrices de sílice [52]. Por otra parte, este método puede ser combinado con la química supramolecular de los surfactantes, dando como resultado una nueva generación de **materiales nanoporosos altamente ordenados**; que pueden ser usados en aplicaciones biomédicas.

Las superficies nanoestructuradas poseen propiedades únicas que modifican la respuesta de las células de adhesión mediante un mecanismo directo (interacciones célula-superficie) y un mecanismo indirecto (afectando las interacciones proteína-superficie) [43,44,45,46]. Uno de los métodos sol-gel introducidos por Brincker y col. para producir películas con nanoestructura ordenada es el proceso conocido como “**Auto-ensamblaje Inducido por Evaporación**” **EISA (Evaporation Induced Self-Assembly)** [52,53]. En este procedimiento se utiliza un compuesto orgánico surfactante, que sirve de molde para la formación nanoporos organizados como una estructura altamente ordenada.

Los surfactantes son moléculas que contienen una parte apolar, que consta de una larga cadena hidrocarbonada y otra polar que consta de una parte o “cabeza” polar soluble en agua. Los surfactantes pueden ser iónicos o no-iónicos, esta clasificación depende de la disociación en el medio en el que se encuentran. Las moléculas de surfactante forman espontáneamente, en solución, cierto grado de agrupación o agregación que dan lugar a estructuras conocidas como micelas. La forma de las micelas depende del tipo de surfactante que se utilice, pudiendo existir micelas esféricas o laminar entre otras. La formación de las micelas es fundamental para las aplicaciones en las que se combina el proceso sol-gel con la química de surfactantes, debido a que la estructura micelar es la que da forma y define los poros. Esto se debe a la organización espontánea o auto-ensamblaje de las micelas.

Una definición general de **autoensamblaje** es la organización espontánea de un material a través de interacciones no covalentes sin intervención externa. El autoensamblaje emplea típicamente estos surfactantes que están pre-programados para organizarse dentro de un agrupamiento supramolecular bien definido. En 1992 los investigadores de Mobile [54] descubrieron que el auto-ensamblaje de surfactantes conducido en una solución acuosa de especies solubles de sílice resultaba en un co-ensamblaje espontáneo de sílice-surfactante.

La remoción del surfactante crea poros sólidos periódicos, que son esencialmente los fósiles de agrupaciones de sílice líquida y cristalina. En los últimos años, este trabajo pionero ha sido ampliado para producir una variedad de materiales nanoporosos, que dependiendo del surfactante y las condiciones presentan diámetros de poro entre 1-10 nm. Esta habilidad de crear materia organizada a nivel micro y nano ha significado un gran avance tecnológico [54,55]. Estos novedosos materiales presentan un alto grado de versatilidad en términos de estructura, textura y funcionalidad [56].

La introducción del proceso EISA, brinda la posibilidad de una rápida producción de películas porosas sobre un material [52,53]. En este método, los sustratos son introducidos en un sistema sílice/surfactante/solvente. Bajo estas condiciones, el sistema sílice-surfactante sufre nucleación sobre el sustrato, dando paso a la formación de poros hexagonales o cúbicos altamente ordenados orientados preferentemente (aunque no únicamente) de manera paralela al plano de la superficie.

Durante el proceso de recubrimiento por inmersión de las superficies de titanio en el sistema “**sol-gel/EISA**” se produce la evaporación preferencial del solvente (etanol), lo cual concentra sobre la superficie el depósito de la película, el surfactante no volátil y las especies de sílice en agua (**Figura 1**). El progresivo aumento de la concentración del surfactante lleva el auto-ensamblaje de la micela de sílice-surfactante y su posterior organización en una mesofase cristalina. El resultado es la rápida formación de una fina y delgada película de sílice constituida de una nanoestructura altamente ordenada y orientados con respecto a la

superficie del sustrato. Las películas depositadas son además continuas y transparentes a la vista.

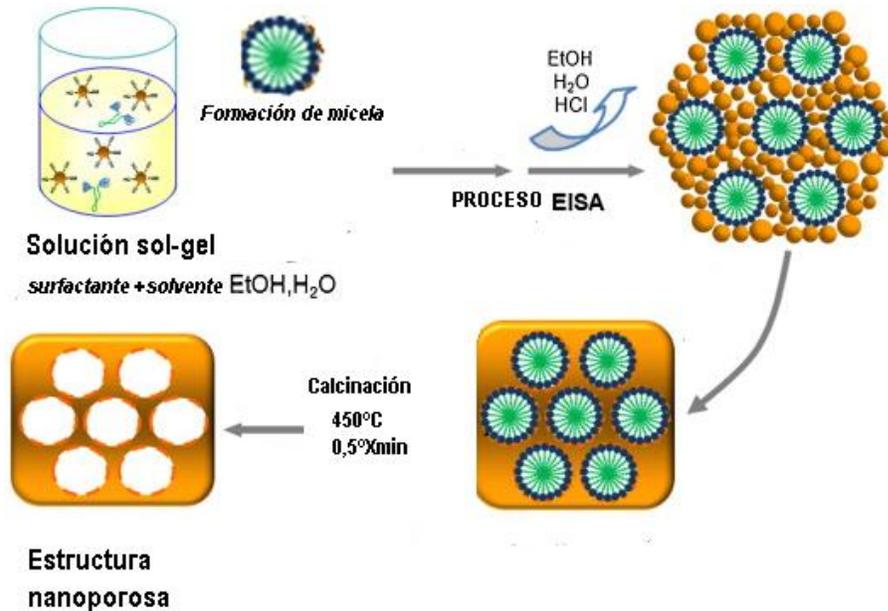


Figura 1: Esquema del proceso sol-gel/EISA.

La formación de los nanoporos es un proceso espontáneo y que ocurre progresivamente, a medida que se produce la evaporación del solvente. La posterior descomposición del surfactante mediante un tratamiento térmico, genera un patrón de poros altamente ordenado en la estructura de la película. La sílice es un material reconocido como un catalizador natural para la formación de hidroxiapatita, el principal componente inorgánico del hueso; y ha demostrado tener una alta actividad biológica en estudios *in vitro* [41,42] e *in vivo* [43,44]. Adicionalmente, los recubrimientos de sílice han demostrado prevenir la corrosión de aleaciones metálicas de titanio (Ti-6Al-4V) y acero inoxidable (316L) en medios fisiológicos [40,46].

La respuesta de oseointegración no sólo depende de la micro y nano topografía de la superficie del implante, sino también de sus propiedades químicas. Modificaciones químicas de la superficie del implante pueden también

inducir una mejor respuesta del tejido óseo. La incorporación de elementos inorgánicos como calcio y fosfato en las superficies nanoestructuradas, podría estimular el intercambio bioquímico entre la matriz ósea y la superficie del implante de titanio. Este intercambio puede verificarse a través de la mineralización de hidroxiapatita sobre la superficie del implante [57].

De este modo la nanotecnología puede brindar nuevas oportunidades para crear superficies de implantes de titanio que mejoren sus propiedades de oseointegración, disminuyendo así las tasas de fracaso y aumentando de este modo el éxito clínico de la rehabilitación mediante implantes dentales.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

3.1 Hipótesis.

Recubrir la superficie del titanio con una película de sílice de nanoestructura altamente ordenada; mejora las propiedades de oseointegración *in vitro* del material.

3.2 Objetivo General.

Modificar superficies de titanio mediante recubrimientos de sílice con estructura nanoporosa ordenada.

3.4 Objetivos Específicos.

- 3.4.1 Sintetizar recubrimientos nanoporosos ordenados sobre superficies de titanio mediante técnica sol-gel/ EISA.
- 3.4.2 Caracterizar la nanoestructura de las películas formadas sobre las superficies de titanio.
- 3.4.3 Evaluar la capacidad de los recubrimientos para inducir la formación de hidroxiapatita desde suero fisiológico simulado (SBF).
- 3.4.4 Evaluar la adsorción de proteínas extracelulares en la superficie de los recubrimientos.
- 3.4.5 Evaluar la adhesión y viabilidad de células osteoblásticas sobre las superficies nanoestructuradas.
- 3.4.6 Evaluar la diferenciación osteogénica de células madres sobre las superficies nanoestructuradas.

3. MATERIAL Y MÉTODO.

4.1 Preparación de las láminas de titanio (Ti6Al4V).

Para la preparación de los recubrimientos se usaron láminas de la aleación de titanio Ti6Al4V (Zimmer Dental Inc.), utilizada comercialmente en la fabricación de implantes dentales. Las láminas fueron cortadas de 1,5 x 1,5 x 0,1 cm para los ensayos de SBF y adsorción de proteína. Para los ensayos de adhesión y proliferación celular, se utilizaron láminas de 1 x 1 x 0,1 cm; dimensiones más apropiadas para los medios de incubación celular. Las láminas de titanio fueron pulidas en un pulidor metalográfico (BuehlerEcomet 6) (**Figura 2**), utilizando papel de carburo de silicio número 600 y 800. Posteriormente las láminas pulidas fueron lavadas con acetona y etanol.

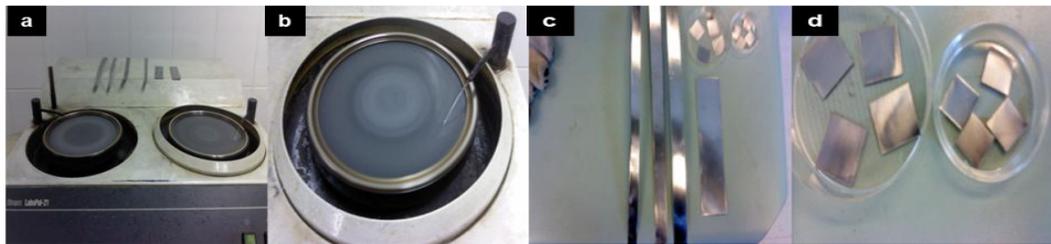


Figura 2: Preparación de las láminas de titanio. (a) y (b) Pulidor metalográfico, (c) Láminas pulidas, (d) Láminas de 1,5 y 1 cm respectivamente.

4.2 Síntesis de soluciones sol-gel.

La preparación de las soluciones sol-gel necesarias para sintetizar los recubrimientos se realizó mezclando apropiadas cantidades de:

- Surfactantes: Pluronic 123 (P123) y polietilenglicol(PEG)
- Precursor de sílice: tetraetilortosilicato $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$. (TEOS)
- Catalizador: Ácido clorhídrico 0.1 M (HCl)
- Etanol 95%
- Agua destilada.

La solución de síntesis sol-gel presentó la siguiente composición molar:

$$8,6 \times 10^{-3} \text{ P123} : 1 \text{ TEOS} : 8,3 \text{ H}_2\text{O} : 0,0028 \text{ HCl} : 17,2 \text{ EtOH}.$$

Siguiendo el procedimiento que a continuación se detalla:

Sobre una mezcla de 10 ml de etanol 95% y 0.5 ml HCl 1M en agitación magnética, se agregó 4 ml de TEOS, manteniéndolo en agitación por 20 minutos (ajustando el pH a 2). Con esto se logró la hidrólisis del TEOS y se obtuvo un sol transparente. Al mismo tiempo se disolvió 2 g de surfactante (**P123** o **PEG**) en 10 ml de etanol 95% con agitación magnética por 20 minutos. Sobre el TEOS hidrolizado y en continua agitación, se vertió la solución de surfactante y se mantuvo en agitación por 3 horas (**Figura 3**). Se dejó envejecer por 24 horas a 35 °C. De esta forma, se obtuvo la solución sol/gel para los recubrimientos.

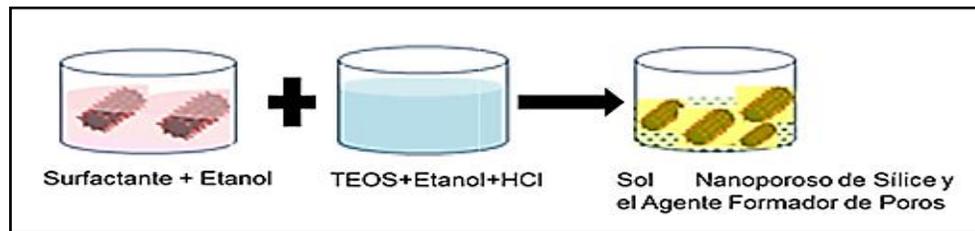


Figura 3: Síntesis de solución sol-gel.

Se sintetizaron también soluciones sol-gel dopadas con iones calcio y fósforo (**CaP**), según el procedimiento descrito anteriormente pero adicionando 0.34 g de trietil fosfato (TEP) y 0.49 g. de nitrato de calcio tetra hidratado. Se sintetizó además un recubrimiento de sílice no porosa (**NPS**) que se utilizó como control (negativo), el cual se preparó según el procedimiento antes descrito pero sin la adición de surfactante. De esta manera se prepararon 6 soluciones sol-gel de recubrimiento denominadas: **P123**, **CaP -P123**, **PEG**, **CaP-PEG**, **NPS** y **CaP-NPS**.

4.3 Síntesis de los recubrimientos sobre las superficies de titanio.

Para crear los recubrimientos sobre la superficie de las láminas de titanio, se utilizó el método EISA, mediante técnica de “slip-coating” o recubrimiento por deslizamiento, el cual se describe a continuación

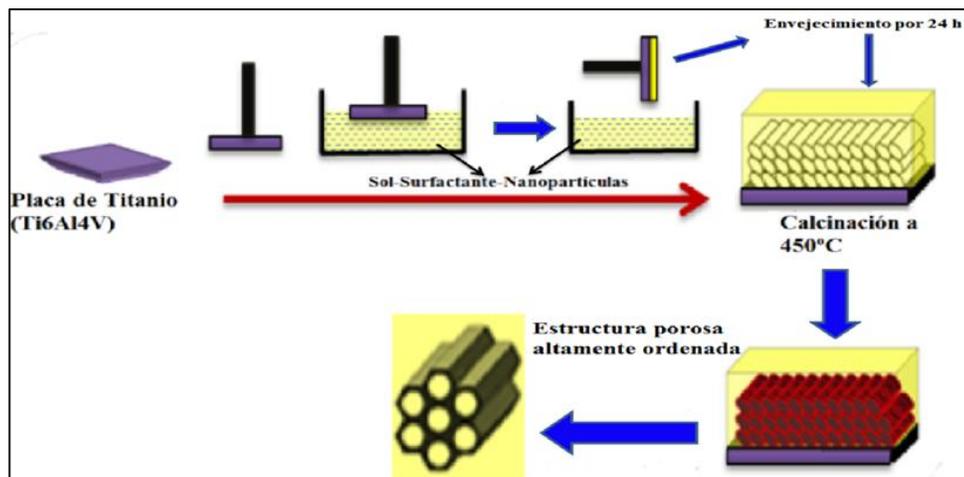


Figura 4: Esquema del proceso EISA y del procedimiento de Slip-Coating utilizado para recubrir las superficies de titanio.

En una placa de Petri se depositó la solución sol-gel de sílice. La lámina de titanio se fijó a un soporte móvil que permite un movimiento tipo péndulo y se dispuso la superficie de titanio paralela a la superficie del sol (**Figura 4**). Luego, se puso en contacto la superficie de titanio con la superficie del sol, sin sumergir la placa, de manera tal que solo la superficie de titanio quedara en contacto con el sol

Después de 10 segundos en contacto con el sol, la placa de titanio se retiró mediante un movimiento rápido, continuo, tipo péndulo, dejando la lámina levemente por sobre un ángulo de 90° con respecto a la superficie del sol. Al mismo tiempo que la lámina se retira del sol se va evaporando el solvente para dejar una delgada película sobre la superficie de la lámina de titanio. Esta película se dejó envejecer por 24 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de envejecimiento, las láminas se llevaron a una mufla y se inició el

proceso de calcinación, con una velocidad de calentamiento de 0.5 °C/min hasta llegar a 450°C. Una vez alcanzada esta temperatura, se mantuvo así por 4 horas y el proceso de enfriamiento se llevó a cabo lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente, proceso que tomó alrededor de 12 horas. La baja tasa tanto de calentamiento como de enfriamiento se usa con el propósito de evitar defectos en la película por efectos de expansión térmica de la película y el metal.

4.4 Caracterización de los recubrimientos.

Las láminas sin modificar así como aquellas modificadas con los recubrimientos fueron examinadas por microscopia electrónica de barrido (SEM) (Zeiss, DMS 940) en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Esto con el propósito de determinar la presencia, continuidad y nivel de fractura de los recubrimientos. Para esto, las muestras se metalizaron con una mezcla de oro/platino, para finalmente ser observadas.

Para la determinación de la estructura ordenada de las películas se realizó un análisis de difracción de rayos X (DRX) de bajo ángulo, en la cual se posicionaron las láminas directamente en el porta muestras del equipo, y se hizo un barrido desde 1,0 hasta 5° (2θ), para así obtener los patrones de difracción para cada muestra. El difractómetro (Siemens D 5000) se utilizó con radiación CuK α a una velocidad de barrido de 0,2 ° / min. Este análisis fue realizado en el Dpto. de Física de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la U. de Chile. Este análisis es utilizado en cristalografía y permite evidenciar la estructura ordenada y uniforme de un material.

La estructura ordenada de los recubrimientos se examinó también mediante microscopia de transmisión electrónica de alta resolución (HR-TEM) (Philips Tecnai 12 Bio), realizada en la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Católica de Chile. A través de la microscopía HR-TEM es posible visualizar el tamaño, orden y orientación de los poros de tamaño nanométrico.

Los recubrimientos fueron también pulverizados para realizar su análisis textural mediante sortometría de N_2 . Este análisis fue realizado en el Dpto. de Ing. Química de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la U. de Chile. Este análisis se basa en la adsorción de un gas, en este caso, nitrógeno, sobre la superficie del material, y la obtención de las correspondientes isothermas de adsorción-desorción. A partir de estos resultados se obtienen parámetros texturales tales como: área superficial específica (S_g), tamaño (d_p), distribución y volumen de poros (V_p).

4.5 Ensayos de Bioactividad.

4.5.1 Ensayos de mineralización en SBF.

La bioactividad de un material se evalúa preliminarmente por su capacidad para inducir la formación o mineralización de hidroxiapatita, o alguna fase previa, como fosfato tricálcico $Ca_3(PO_4)_2$, sobre su superficie y en un ambiente fisiológico. Este método fue desarrollado por Kokubo y se conoce como ensayo SBF (Simulated Body Fluid) [60]. El método Kokubo utiliza una solución preparada a partir de sales inorgánicas con una concentración de iones y pH similar al encontrado en el plasma sanguíneo humano. La capacidad del recubrimiento para inducir la formación de hidroxiapatita (bioactividad) en la superficie de titanio se evaluó sumergiendo las superficies en suero fisiológico simulado (SBF). La solución de SBF, utilizada en este estudio, se preparó mediante el método y composición reportada en 1990 por Kokubo *et al* [58]. Para este ensayo, las láminas fueron depositadas en tubos de polipropileno de 60 ml, en el que se adicionaron 50 ml de SBF, sumergiendo completamente la lámina de titanio. Las láminas se dejaron en incubación por 7 días en un baño termoregulado a 37°C con agitación leve y constante.

La caracterización de las muestras tratadas en SBF se llevó a cabo mediante microscopía SEM en la Universidad de Santiago. Este microscopio (Jeol JSM 5410) está equipado con Espectroscopia Dispersiva de rayos X (EDX) que permite realizar el análisis elemental de las muestras.

4.5.2 Ensayo de adsorción de proteínas.

Para este ensayo se utilizaron 2 proteínas como modelo de estudio, el Fibrinógeno (Merck) y Albúmina (Merck). Estas proteínas se encuentran en altos porcentajes en el fluido extracelular y sirven como modelo de las proteínas que participan en el proceso de adhesión de las células formadoras de hueso (osteoblastos). Para este propósito, se pusieron en contacto las láminas de titanio y 1,5 ml de una solución acuosa de proteínas con una concentración de 400 ppm y se incubaron por 6 horas a 37°C. Una vez transcurrido este periodo de tiempo, las láminas se retiraron y se lavaron 3 veces con agua destilada para remover las proteínas depositadas en la superficie y que no estaban adheridas.

Para remover las proteínas adsorbidas de la lámina, en un vial de vidrio cada muestra fue puesta en contacto con 1,5 ml con una solución del surfactante dodecil sulfato al 2% p/v, e incubada en un baño termoregulado a 37°C por 12 horas. Una vez transcurrido este periodo se retiró la lámina de titanio y se obtuvo una solución con las proteínas desorbidas desde la lámina de titanio. Para determinar la concentración y la cantidad de proteínas desorbidas de la lámina se utilizó el "Micro BCA™ Protein Assay Kit". Este ensayo se basa en un método colorimétrico para cuantificar las proteínas, mediante la formación de un complejo purpura-violeta, cuya absorbancia medida a 652 nm es directamente proporcional a la cantidad de proteínas.

4.5.3 Cultivos con células osteoblásticas.

La viabilidad y adhesión de células osteoblásticas sobre las superficies se evaluó en cultivos celulares de osteoblastos. En las láminas de titanio esterilizadas mediante exposición con luz UV. Se sembraron 10.000 células tipo osteoblastos de osteosarcoma humano (Saos-2) en un volumen de 1 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM). Este medio contiene suero fetal bovino (FBS) 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 mg/ml. Las células fueron incubadas a 37°C con 5 % de CO₂. Las células que se adhirieron en las superficies después de 2 horas de incubación se examinaron por SEM. Para este propósito, las células adherentes se fijaron en glutaraldehído al 2,5 %. Luego las muestras fueron deshidratadas mediante una serie graduada de soluciones de etanol y posteriormente secadas por punto crítico para preservar la integridad de las células.

La viabilidad celular fue cuantificada utilizando la prueba MTS (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) 5 - (3-carboximetoxifenil) -2 - (4-sulfonil)-2H-tetrazolio), que corresponde a una prueba de colorimetría que permite evaluar la actividad mitocondrial de las células. Los ensayos de MTS se realizaron por cuadruplicado 2 días después de la siembra de células. Después de 2 horas de incubación con el reactivo MTS en una atmósfera humidificada con 5% CO₂, se recogió el medio a partir de las muestras y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm utilizando un lector de microplacas ELISA (Tecan Infinito F-50).

4.5.4 Cultivos con células mesenquimales.

La citocompatibilidad, diferenciación celular y actividad osteogénica en los recubrimientos fue evaluada en presencia de células madres mesenquimales de la médula ósea (hBMSCs). Estos experimentos se realizaron en colaboración con el laboratorio de Biología Celular del INTA-Universidad de Chile, como se detalla a continuación.

Se dispusieron las láminas de titanio sobre placas de cultivo de 24 posillos. Luego se sembraron 10.000 células en un volumen 1 cm³. Se mantuvieron en medio de cultivo basal (DMEM suplementado con FBS al 10%, 100 IU / ml de penicilina, 100 ug/ml de estreptomina) o medio osteogénico que consiste en medio basal suplementado con 100 nMdexametasona, 10 mM β-glicerofosfato, y 50 ug / ml de ácido ascórbico. El medio se cambió cada 3-4 días. Después de 10 días de cultivo, las células adheridas fueron fijadas para microscopía SEM mediante el procedimiento antes descrito para células osteoblásticas. En este caso también se realizó el análisis de la composición química mediante EDX, de posibles nódulos de mineralización ósea asociados a las células cultivadas sobre cada superficie.

La actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) de las células diferenciadas de hBMSCs se midió después de 7 días de incubación. Las células cultivadas en las superficies de titanio se fijaron con etanol al 90% y 10%, y formaldehído al 37% durante 1 minuto, luego se lavó con buffer PBS. Las células fijadas se incubaron con 5 mM de p-nitrofenol fosfato (Sigma) durante 20 min a 37 °C. El p-nitrofenol generado se cuantificó mediante la lectura de la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas de ELISA (Tecan Infinito F-50).

4.6 Análisis de error de los ensayos MTS y ALP.

Los valores finales de MTS y actividad ALP para cada muestra se expresaron como un Promedio (\bar{X}) de los valores de cada ensayo y con el correspondiente valor de varianza estadística (σ). Estos valores también se informan a través de gráficos de barra, indicando la correspondiente Barra de Error calculada mediante la función del programa Excel.

5. RESULTADOS.

5.1. Caracterización de los recubrimientos.

En la **Figura 5** se muestran las imágenes SEM de los recubrimientos sintetizados sobre las láminas de titanio. Se puede apreciar la presencia y continuidad de las películas de sílice formadas sobre las superficies de titanio. Con todas las soluciones sol-gel se formaron películas delgadas de material sin microdefectos. En la sección transversal (Fig. 5f) se estimó el grosor de los recubrimientos en aproximadamente $1,5\ \mu\text{m}$.

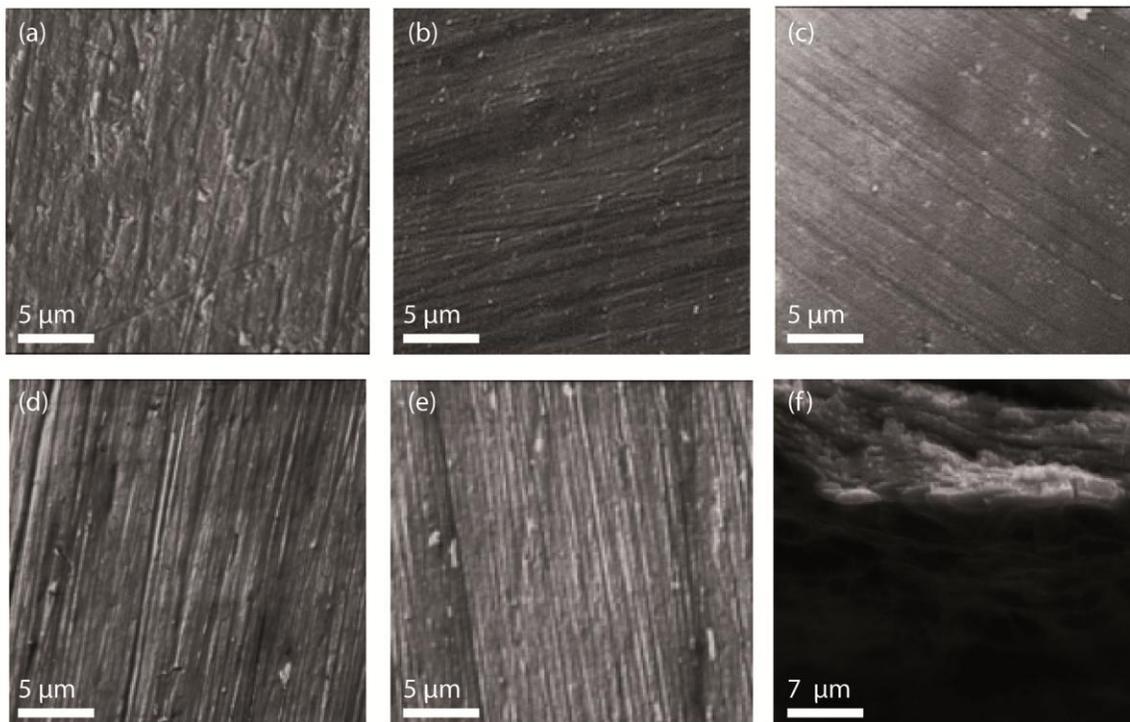


Figura 5: Imágenes obtenidas de microscopio electrónico de barrido (SEM): a) Titanio recubrimiento. Recubrimientos b) NPS; c) PEG; d) P123; e) CaP- P123; f) Sección transversal de P123.

Se realizó el análisis DRX para comprobar la estructura ordenada de las películas formadas sobre las láminas de titanio. En la **Figura 6** se muestra los patrones de difracción de los distintos recubrimientos. Las muestras P123 presentaron patrones de reflexión característicos de una estructura de sílice porosa altamente ordenada, que se manifiesta como un peak bien definido alrededor de $1,8^\circ$ en un plano 2θ (Fig.6 e,f). En cambio recubrimientos PEG y NPS no presentaron patrones de reflexión compatible con una estructura ordenada (Fig.6b,d).

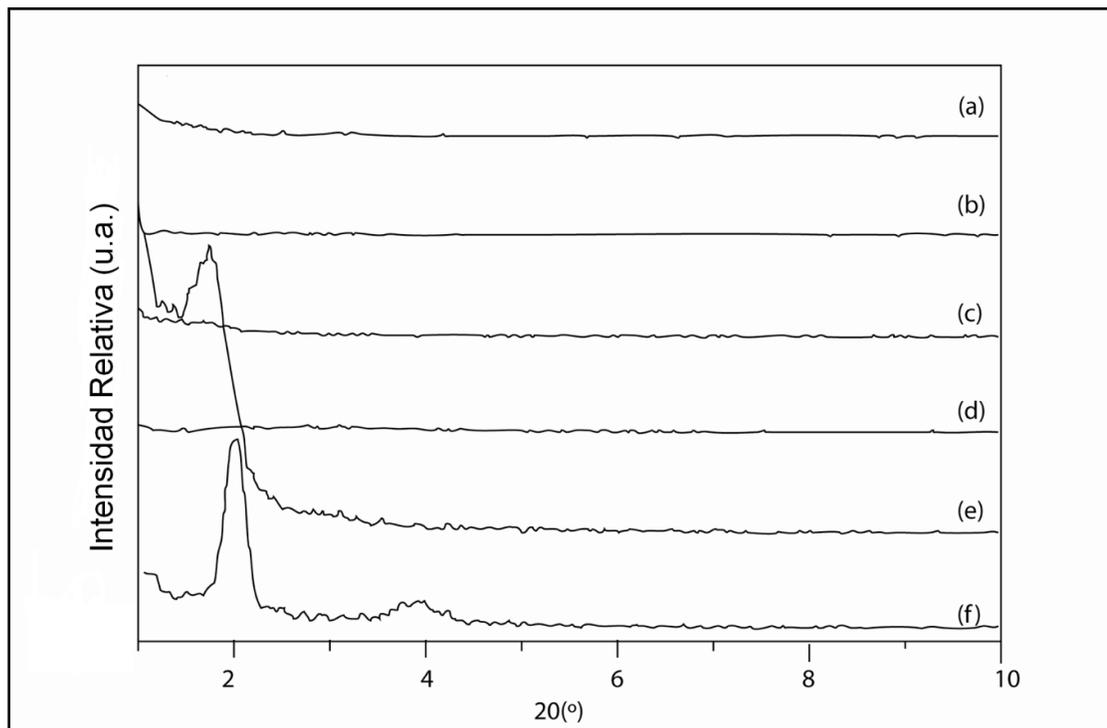


Figura 6: Patrón DRX (a) CaP-NPS, (b) NPS, (c) CaP-PEG, (d) PEG, (e) CaP-P123, y (f) P123.

En la **Figura 7** se observan las imágenes HR-TEM de los recubrimientos P123 y CaP-P123. Estos recubrimientos están conformados por poros de tamaño nanométrico (diámetro de poro fue estimado en 4 nm.) dispuestos de forma altamente ordenada, formando un arreglo de nanoporos de canales uniformes. Estos canales se ordenan preferentemente paralelos a la superficie del titanio, pero también se encontraron canales perpendiculares, los que se observaron especialmente en los recubrimientos CaP-P123 (Fig.7b)

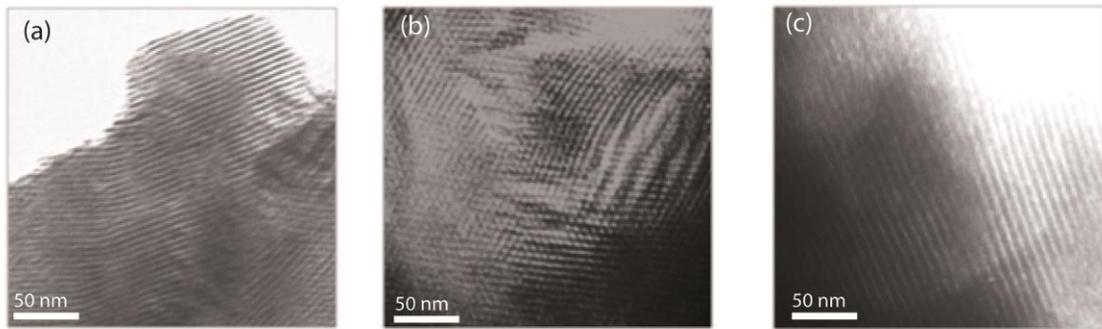


Figura 7: Imágenes obtenidas de un microscopio electrónico de transmisión (HRTEM). a) Arreglo de nanoporos altamente ordenados correspondiente a recubrimiento de P123;(b y c) recubrimiento CaP-P123

En la **Tabla1** se encuentran resumidos los datos correspondientes a las características texturales de los distintos recubrimientos; obtenidos mediante la sortimetría de N_2 . Es de gran relevancia el área superficial específica, donde destaca el área (de alrededor $400 \text{ m}^2/\text{g}$) alcanzada por los recubrimientos porosos; tanto los sintetizados con los surfactantes P123 y PEG. Esta característica es atribuida a su porosidad. El diámetro de poro del recubrimiento P123 es de alrededor de 3,8 nm, lo cual está de acuerdo con el valor estimado mediante microscopía HRTEM. Aunque el recubrimiento de sílice no ordenado PEG tiende a poseer una superficie específica mayor que la de P123, el diámetro de poro de PEG es de 2,3 nm. El área superficial del recubrimiento NPS es casi

despreciable y no se detecta porosidad, lo que confirma su estructura esencialmente no porosa.

Tabla 1: Propiedades texturales de los diferentes recubrimientos.

RECUBRIMIENTO	S_g (m^2/g)	D_p (nm)	V_p (cm^3/g)	V_o (cm^3/g)	V_m (cm^3/g)
NPS	1,7	-----	-----	-----	-----
CaP-NPS	0,4	-----	-----	-----	-----
P123	422,8	3,7	0,42	0,18	0,24
CaP-P123	411,2	4,7	0,5	0,18	0,38
PEG	466,8	2,3	0,19	0,19	0
CaP-PEG	687,6	2,3	0,32	0,3	0,03

S_g = área superficial específica; D_p = diámetro poro; V_p = volumen total poro;
 V_o = volumen microporos; V_m = volumen mesoporos.

5.2. Ensayos de bioactividad.

5.2.1. Bioactividad en SBF.

La primera de las pruebas para la evaluación de la bioactividad que se realizó fue el ensayo de mineralización en SBF. La **Figura 8** muestra las imágenes SEM de las superficies luego de 7 días de inmersión en SBF pero de tamaño pequeño (Fig. 8c). En estas imágenes se observa tanto la cantidad de mineral precipitado como la forma y tamaño de estos cristales. En la superficie de titanio sin modificar como en el recubrimiento NPS se observó escasa mineralización, con cristales aislados y pequeños (Fig. 8a, b).

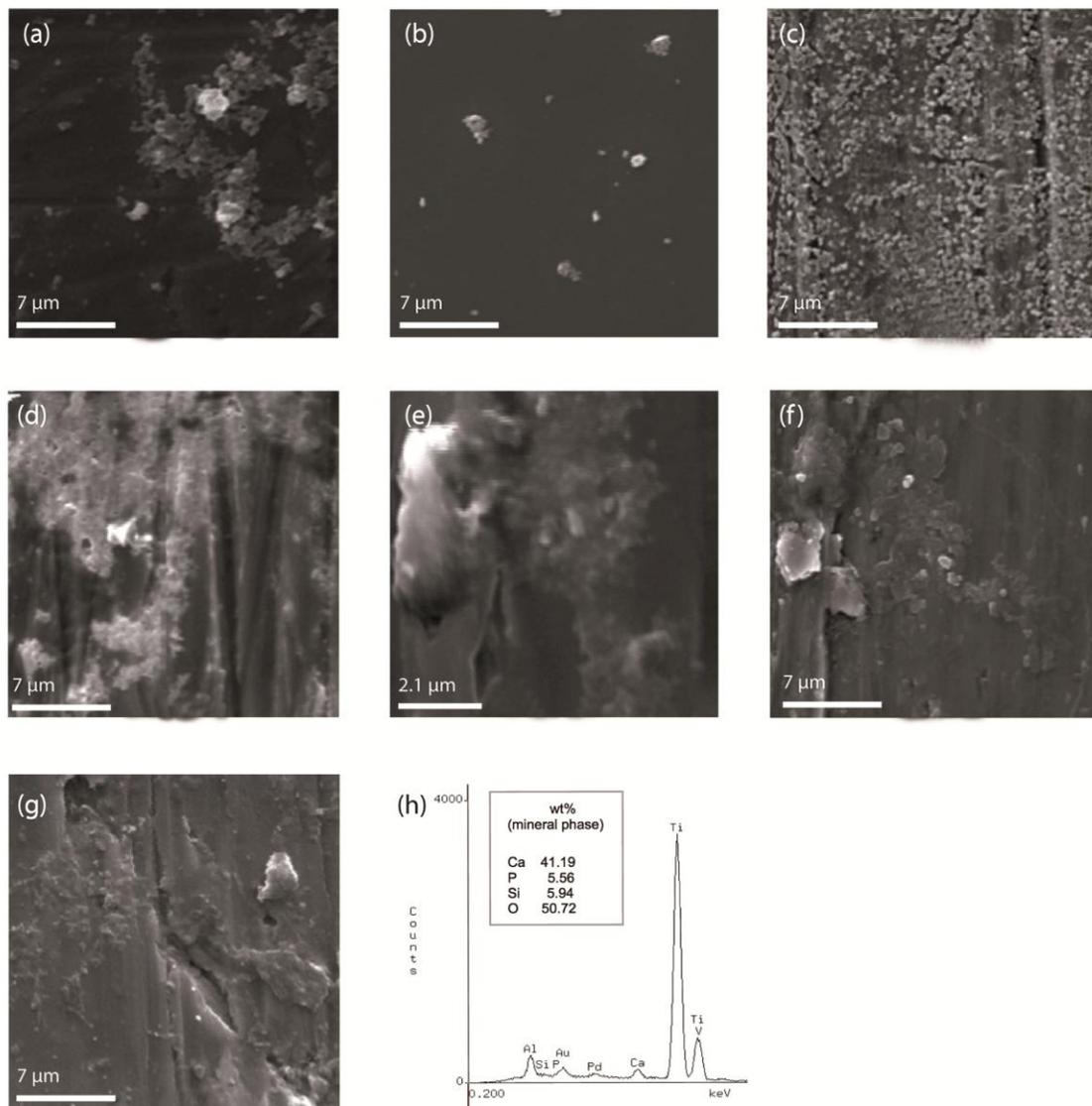


Figura 8: Imágenes SEM de los superficies de titanio después de 7 días de inmersión en SBF: a) Ti sin modificar; Recubrimientos b) NPS; c) CaP-NPS; d) P123; e) CaP-P123; f) PEG. g) CaP-P123 después de 30 días en SBF. h) Análisis elemental EDX del recubrimiento CaP-P123 después de 7 días en SBF.

Al adicionar calcio y fosfato (CaP-NPS) se encontró mayor número de cristales. La mineralización se vio notablemente incrementada sobre las superficies recubiertas de sílice nanoporoso (Fig. 8d,f). Nuevamente al evaluar los recubrimientos con Ca y P (CaP-P123 y CaP-PEG) la mineralización se ve estimulada. Al realizar el análisis EDX (Fig. 8h) del recubrimiento CaP-P123 se pudo verificar que estos cristales están compuestos de Ca y P en proporciones compatibles con cristales de hidroxiapatita, componente de tejido óseo. En la

superficie de CaP-P123 que estuvo un tiempo prolongado en SBF se pudo observar la presencia no tan solo cristales aislados sino de una densa capa de mineral cubriendo toda la superficie (Fig. 8g).

5.2.2. Cultivos con células Saos-2.

La viabilidad y el comportamiento adhesivo de las células tipo osteoblastos se evaluó cultivando células Saos-2 sobre todas las superficies estudiadas.

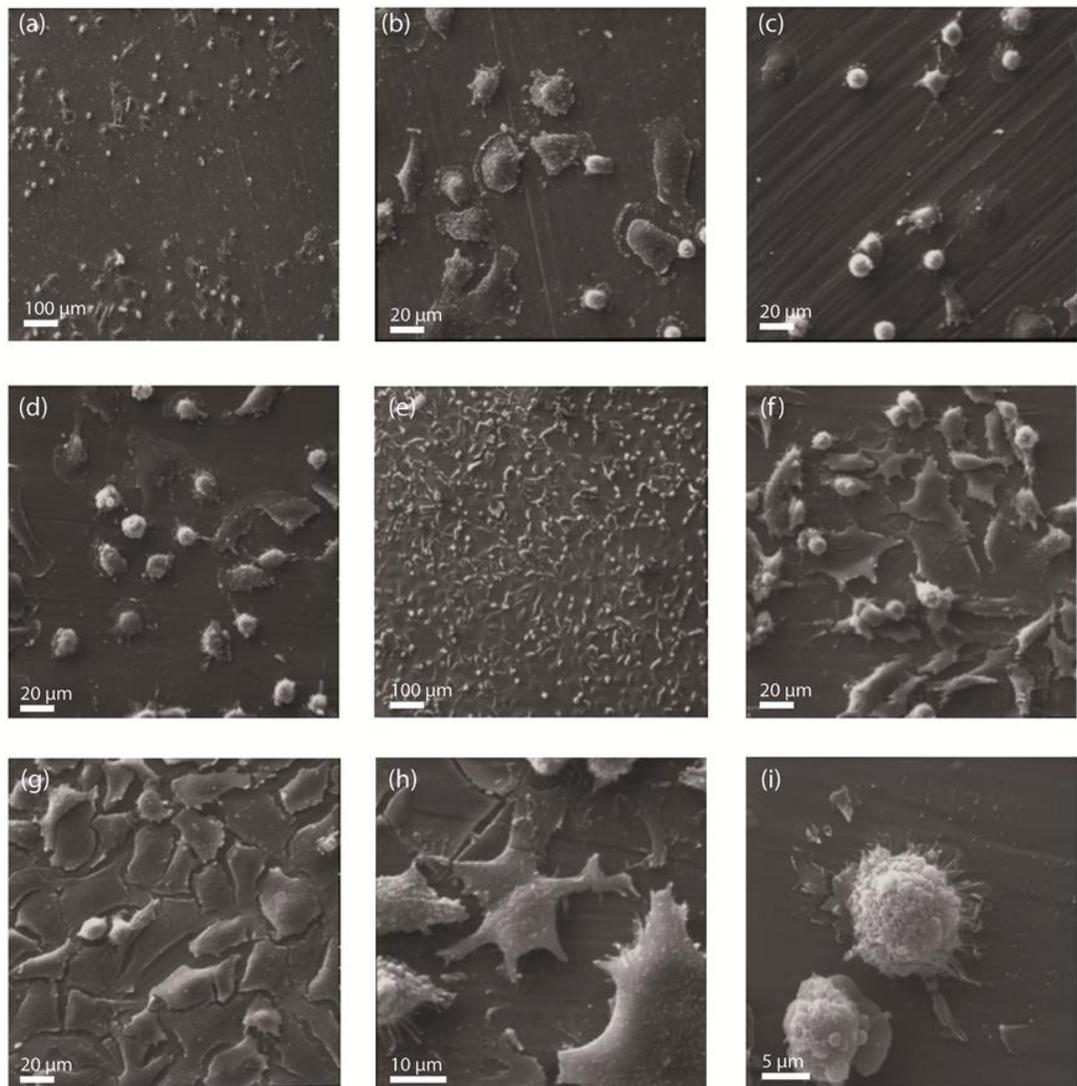


Figura 9: Imágenes SEM de células tipo osteoblastos adherida a las diferentes superficies. a-b) titanio sin modificar; Recubrimientos c) NPS; d) PEG; e-f) P123, g) CaP-P123. Imágenes de mayor magnificación: h) P123; i) NPS.

En la **Figura 9** se presentan las imágenes SEM de estos cultivos, donde se pueden observar las diferencias en la densidad y morfología de células adheridas en relación a las diferentes texturas de recubrimientos y sobre el control. La superficie con recubrimiento P123 (Fig. 9 e, f) muestra una densidad de células adheridas significativamente mayor que las halladas en la superficie de titanio sin modificar, NPS y PEG (Fig. 9 a,b,c,d). Las células tipo osteoblastos se extendieron mejor en las superficies de P123, mientras que en las otras superficies las células presentaron en su mayoría forma redondeada. En las imágenes con mayor magnificación se puede apreciar con más detalle la morfología celular de las células osteoblásticas, destacan las prolongaciones celulares tipo lamelipodio, lo que indica la mayor afinidad con la superficie P123 (Fig. 9h). En cambio se observan células de morfología esférica en relación a la superficie NPS (Fig. 9i)

5.2.3. Ensayos de viabilidad celular MTS.

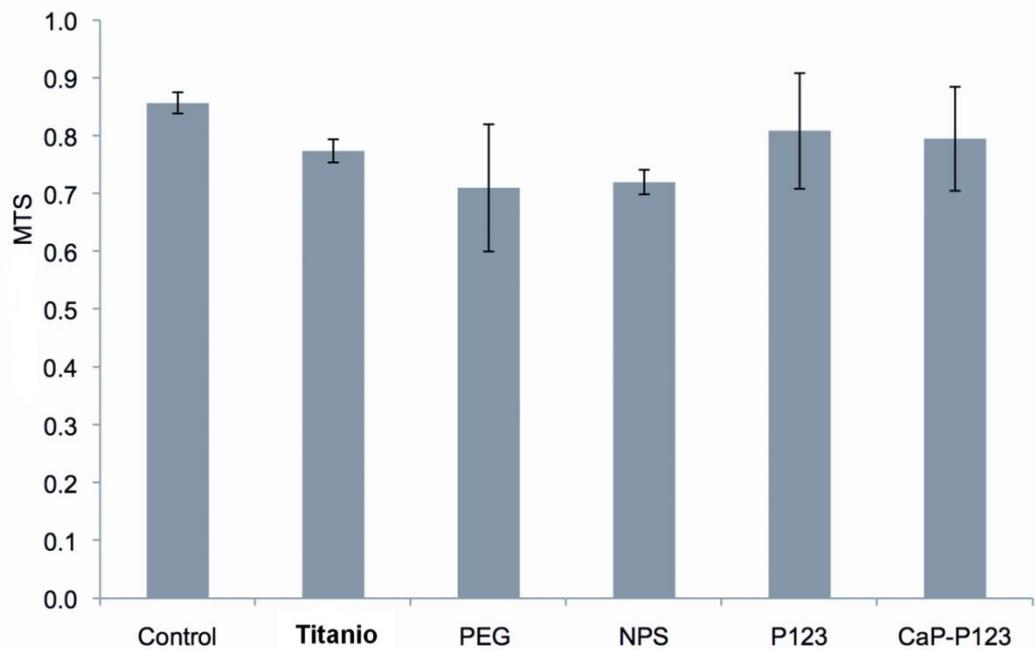


Figura 10: Análisis MTS de células Saos- 2 adheridas sobre las distintas superficies.

Mediante este ensayo se evaluó la actividad metabólica de las células cultivadas en las distintas superficies estudiadas. Los valores de absorbancia no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las superficies de sílice, el titanio y el control (células cultivadas en ausencia de biomateriales). Indicando que la viabilidad y la proliferación de las células tipo osteoblastos no se alteran en contacto con los recubrimientos de sílice sintetizados en este trabajo (NPS,PEG,P123).

5.2.4. Adsorción de proteínas.

En la **Figura 11** se muestran la cantidad de proteínas (albúmina y fibrinógeno) adsorbidas por las diferentes superficies. Se pudo apreciar que la capacidad de adsorción de ambas proteínas fue significativamente mayor en los recubrimientos nanoporos ordenados P123 y CaP-P123 que tienen un gran área superficial. A pesar que los recubrimientos PEG también tiene un alta área superficial la adsorción de las proteínas no fue proporcional con su área.

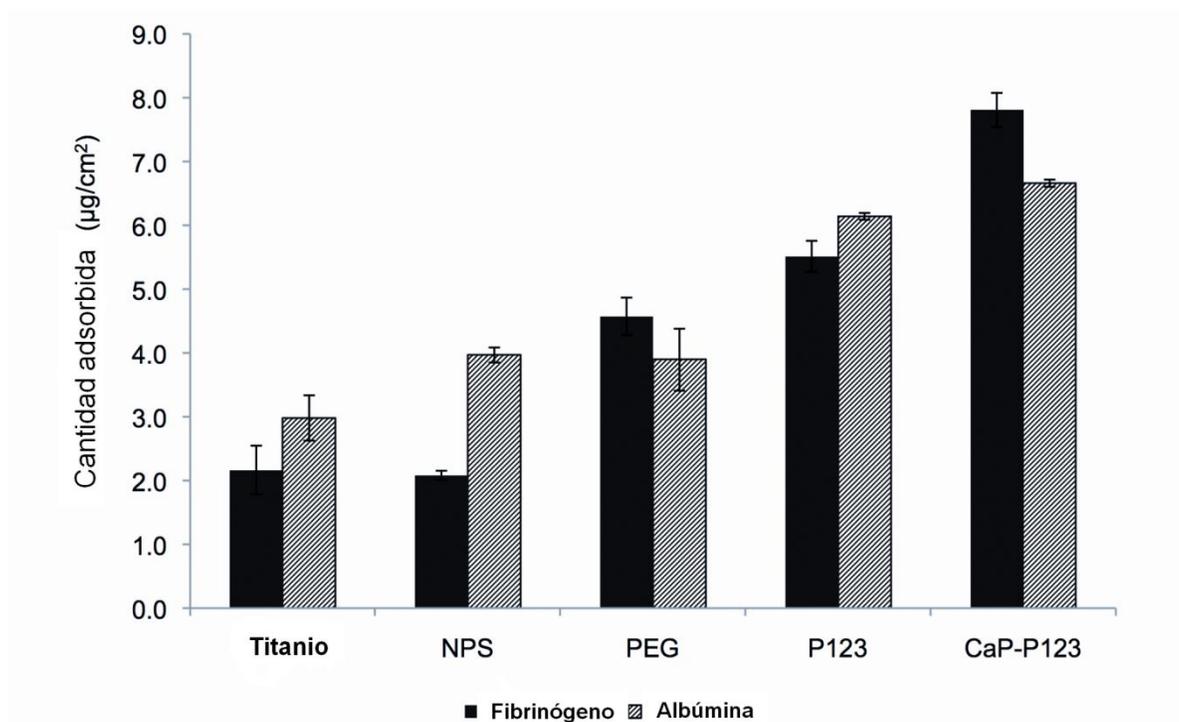


Figura 11: Adsorción de proteínas sobre cada superficie.

5.2.5. Cultivos con células madres mesenquimales de médula ósea humana (hBMSCs).

Se cultivaron células hBMSCs sobre las distintas superficies, durante 10 días sin adicionar suplementos osteogénicos.

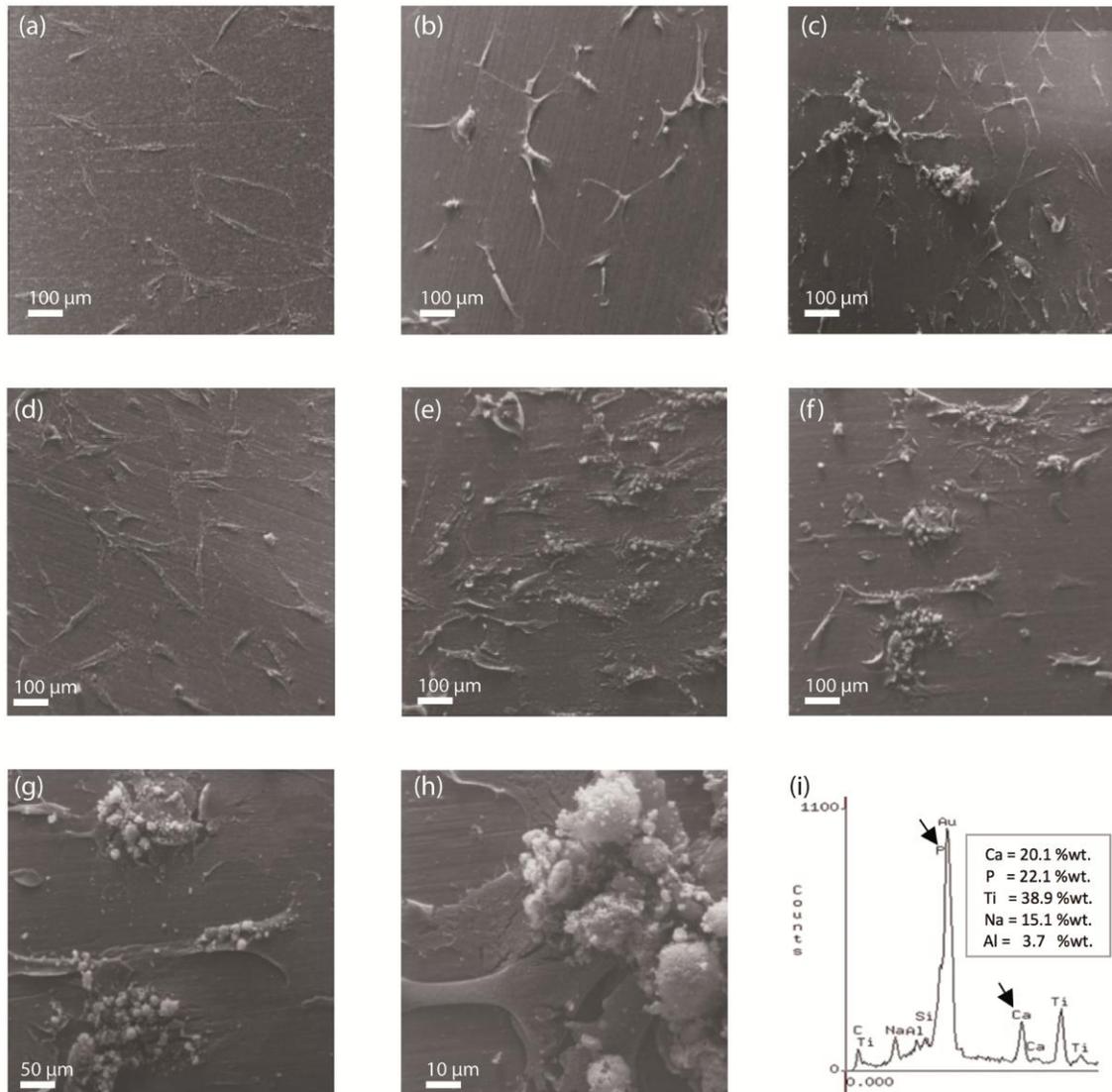


Figura 12: Imágenes SEM de cultivos de células madres de 11 días sobre las distintas superficies. a) titanio sin modificar; Recubrimientos b) NPS; c) PEG; d) P123 de 1 día de cultivo; e) P123 f) CaP-P123; g) y h) Imágenes de alta magnificación de los nódulos de mineralización en superficies CaP-P123; i) EDX de un nódulo de mineralización.

En la **Figura 12** se puede observar que las células hBMSCs cubren completamente todas las superficies formando una capa densa y continua. Se aprecian nódulos de mineralización en relación a los recubrimientos nanoporosos de sílice (Fig.12 c,e), pero especialmente se formaron en el recubrimiento nanoporoso altamente ordenado P123 (Fig.12 e,f). No se detectaron nódulos de mineralización en la superficie de titanio (Fig. 12a) y se formó algún nódulo aislado en el recubrimiento NPS (Fig.12b).

El EDX mostró que los nódulos de mineralización están compuestos de Ca y P (Fig.12i), que conforman el tejido óseo. En las imágenes con mayor magnificación se puede ver con más detalle los nódulos de mineralización asociados a las superficies (Fig.12 g,h). No se apreciaron nódulos después de un corto tiempo de cultivo (1 día) (Fig. 12d).

5.2.6. Actividad de Fosfatasa Alcalina (ALP).

En la **Figura 13** se presentan los valores de actividad de ALP medida para células crecidas sobre cada superficie en medio basal y presencia de suplementos de diferenciación osteogénica.

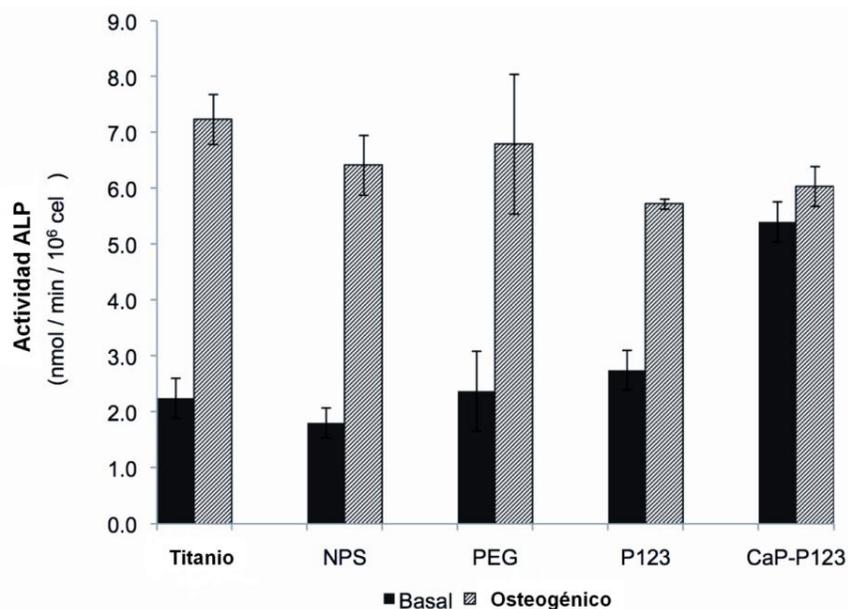


Figura 13: Actividad de Fosfatasa Alcalina de células hBMSCs cultivadas en medio basal y osteogénico sobre las láminas de titanio.

Como es de esperar, los niveles de actividad de ALP son mayores en medio osteogénico en relación a medio basal en todas las superficies. Por otro lado, los niveles de ALP medidos en medio basal en CaP-P123 fueron notoriamente mayores que los valores medidos en las otras superficies, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Por otro lado, al comparar la actividad de ALP en CaP- P123, medida en medio basal y medio osteogénico no se encontró diferencia estadísticamente significativa.

6. DISCUSIÓN.

6.1. Caracterización de los recubrimientos.

Mediante la técnica slip-coating fueron sintetizados películas delgadas de sílice sin microdefectos sobre las superficies de titanio (Figura 5). Estos recubrimientos exhibieron distintas características texturales (Tabla 1) según el surfactante utilizado (P123, PEG, o control sin surfactante NPS), destacando el gran área superficial (400-600 m²/g) exhibida por los recubrimientos nanoporosos (P123 y PEG).

Los patrones de DRX de los recubrimientos P123 presentan características de reflexión que corresponden a una estructura de sílice con nanoporos altamente ordenados [61]. La disposición ordenada de los nanoporos del recubrimientos P123 (diámetro poro 4nm) también fue evidenciada con HRTEM (Figura7) La incorporación de Ca y P en el recubrimiento P123 (CaP-P123) provoca que los poros se organicen especialmente perpendicular a la superficie de titanio (Fig. 7b).

A pesar que el recubrimiento nanoporoso PEG tiene un gran área superficial (467-688 m²/g) cuenta con un diámetro de poro muy pequeño (2.3 nm) y su estructura no es ordenada.

6.2. Ensayos de bioactividad.

6.2.1. Bioactividad en SBF.

A pesar que la fase no mineral no pudo ser detectada por DRX, el análisis químico EDX comprobó que el mineral precipitado es compatible con hidroxiapatita, que puede corresponder a una capa amorfa o presentarse como una fase de apatita cristalina. Este alto grado de mineralización encontrado sobre los recubrimientos nanoporosos de sílice (P123 y PEG) puede atribuirse a su gran área superficial. La alta energía superficial libre así como la concentración de grupos silanol en la superficie que presentan estos recubrimientos, son factores

conocidos que favorecen el proceso de nucleación de apatita y mayor precipitación de mineral en SBF [60]. Además la composición utilizada ($\text{Ca-PO}_4\text{-SiO}_2$) en CaP-P123, permite que este recubrimiento pueda comportarse como un material denominado vidriobiactivo (*bioglass*) [61] sobre la superficie del titanio, este material tiene la capacidad probada de inducir la formación de apatita en SBF a través de sus productos de disolución en contacto con el medio fisiológico.

6.2.2. Cultivos con células Saos-2.

Si bien el ensayo SBF es un método útil para la evaluación preliminar del potencial de un biomaterial para interactuar con el tejido óseo [62]. Los cultivos celulares brindan información más cercana a la bioactividad *in vivo*.

Según lo reportado Rajaraman y col. [63], la adhesión y la expansión de las células ocurre a través de cuatro eventos: adhesión, crecimiento filopodial, extensiones citoplasmáticas (expansión celular) y aplanamiento de la masa central de las células. La duración y superposición de estas fases puede variar entre los distintos sustratos [64]. En el presente estudio, el efecto de las estructuras nanoporosas en el comportamiento de adhesión celular puede ser evidenciado al comparar la morfología lamelipodial adoptada por las células en contacto con el recubrimiento P123 versus la forma redondeada de las células en la superficie NPS (Fig. 9h, i).

Estas observaciones indican que los recubrimientos de sílice nanoporosa ordenada (P123) parece acelerar el proceso de adhesión, extensiones citoplasmáticas y aplanamiento celular. La adhesión celular se ve aun más favorecida en contacto con el recubrimiento CaP-P123, esto puede deberse a su composición de vidriobiactivo. La alta densidad de células extendidas sobre los recubrimientos de P123 se puede atribuir también a su alta área superficial y su tamaño de poro que puede favorecer la adsorción de proteínas extracelulares, que es un paso conocido para que sea posible la adhesión y proliferación celular [65].

6.2.3 Análisis MTS.

Este análisis que permite evaluar la actividad mitocondrial de las células prueba que la viabilidad y la proliferación de las células tipo osteoblastos no se altera en contacto con los recubrimientos de sílice preparados en este trabajo (NPS,PEG,P123).Estos resultados confirman la citocompatibilidad de estas superficies de sílice.

6.2.4. Adsorción de proteínas.

Con el propósito de explicar el comportamiento adhesivo de las células se estudió la adsorción de proteínas extracelulares sobre las diferentes superficies. Los resultados mostraron de todas las superficies nanoporosas presentaron mayor adsorción de proteínas en comparación a la superficie de titanio sin modificar. La capacidad de adsorción relativamente baja exhibida por el recubrimiento NPS muestra que la presencia de porosidad sub-10 nm juega un rol importante en el proceso de adsorción de proteínas.

El proceso de adsorción de proteínas es favorecido por la elevada área superficial específica ($400 \text{ m}^2/\text{g}$) que presentan los recubrimientos nanoporosos. Si bien el recubrimiento PEG tiene una gran área superficial específica ($400\text{-}600 \text{ m}^2/\text{g}$), tiene un diámetro de poro más pequeño (2,1 nm) que probablemente limita la adsorción de la albúmina ($4 \times 4 \times 14 \text{ nm}$ [45]) y fibrinógeno ($6,5 \times 6,5 \times 46 \text{ nm}$) [66]).

Los resultados de la adsorción de proteínas concuerdan con el comportamiento adhesivo experimentado por las células tipo osteoblastos en contacto con las diferentes superficies. Lo que demuestra una correlación entre la cantidad de proteínas adsorbidas y la densidad de células adheridas. Se conoce que las células se adhieran a un sustrato usando complejos transmembrana (adhesión focal) con especificidad variable de las proteínas extracelulares [67]. Por lo tanto, la concentración de proteínas extracelulares en la superficie del implante

afecta en gran medida el comportamiento adhesivo de las células como se pudo apreciar en la Figura 9.

Los resultados de este trabajo muestran que el recubrimiento de sílice nanoporosa altamente ordenada (P123) con alta área superficial, aumenta la adsorción de proteínas de matriz extracelular y por consiguiente acelera la respuesta adhesiva de las células osteoblásticas sobre la superficie de titanio.

6.2.5. Cultivo células madres mesenquimales de médula ósea humana (hBMSCs).

Los recubrimientos P123 y CaP-P123 obtuvieron los resultados más favorables, observándose en su superficie nódulos de mineralización compatible con depósitos de apatita parcialmente cristalizada o vesículas de matriz mineralizada producidas por las células osteoblásticas durante la formación ósea [68,69].

A partir de las observaciones de los cultivos de las células hBMSCs y los resultados de la actividad de ALP, los recubrimientos de sílice con estructura nanoporosa ordenada promueven la diferenciación osteogénica en ausencia de suplementos osteogénicos.

La evidencia indica que señales mecánicas de superficies nanoestructuradas pueden ser transmitidos a través de las integrinas del citoesqueleto hacia el núcleo, creando un estímulo que afecta la transcripción de factores relacionados con la formación de hueso [70,71]. En el presente trabajo la nanotopografía (diámetro de poro ~ 4 nm) de los recubrimientos P123 estimularía de la misma manera la diferenciación osteogénica. Además, el recubrimiento de sílice CaP-P123 al contener calcio y fosfato en su estructura, adquiere la composición de un vidriobioactivo. Es conocido que el vidriobioactivo (*bioglass*), a través de disolución iónica, puede estimular químicamente a las células hBMSCs, mediante señales que afectan el proceso genético de diferenciación en células

osteoblásticas [72,73], explicando la mayor formación de nódulos de mineralización ósea observada en el recubrimiento CaP-P123.

Las propiedades exhibidas (alta área superficial, diámetro de poro, disposición ordenada de los nanoporos, su composición química) por los recubrimientos nanoestructurados estudiados en este trabajo, sugieren que estas superficies podrían representar una alternativa para mejorar la oseointegración de los implantes de titanio.

7. CONCLUSIÓN

- La técnica sol-gel/EISA permite la preparación de recubrimientos de sílice con una estructura nanoporosa altamente ordenada sobre superficies de titanio.
- La superficie de sílice nanoporosa ordenada (P123) acelera la respuesta adhesiva de las células osteoblásticas, lo que es atribuido a la alta adsorción de proteínas extracelulares sobre su gran superficie específica, pero también probablemente por la capacidad de la nanotopografía sub-10nm para producir un estímulo mecánico que afecta la adhesión celular.
- La superficie de sílice nanoporosa altamente ordenada, particularmente dopada con calcio y fosfato (CaP-P123) también promueve la diferenciación osteogénica de células hBMSCs, provocando la formación espontánea de nódulos de mineralización en condiciones basales. Este efecto se atribuye a señales mecánicas (nanoporos) y químicas (composición CaP) que estimulan la diferenciación.
- Las propiedades bioactivas exhibidas por los recubrimientos de sílice nanoporosa podrían utilizarse para mejorar la oseointegración de los implantes de titanio y/o tener un impacto en el futuro diseño a nanoescala de las superficies de los implantes de titanio.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Stefliv DE, McKinney RV (1993). Historia de la Implantología. Implantes dentales endoóseos. Barcelona: Mosby; 8-18.
- [2] Gómez M, Ávila R, Landa S (1988). Evolución histórica de la implantología dental. Rev Esp Estomatol. 36 (30):303-310.
- [3] Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A, (1969) Intra-osseus anchorage of dental prostheses, I. Experimental studies. Scand. J. Plastic Reconst. Surgery 3:81-100.
- [4] Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindstrom, J, Hallen (1977) Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period, Scand. J Recons. Surgery 16:1-132.
- [5]. Östman PO (2008) Immediate/early loading of dental implants. Clinical documentation and presentation of a treatment concept Periodontology 2000. 47:90-112.
- [6] Montes CC, Pereira FA, Thome G, Alves ED, Acedo RV, de Souza JR et al. (2007) Failing Factors Associated With Osseointegrated Dental Implant Loss. Implant Dentistry 16: 404-412.
- [7] Sánchez MA, Vilchez MA, Cortell I, Núñez S, Sala S, Gay Escoda C. (2010) Revisión bibliográfica de Implantología Bucofacial del año 2008. Primera parte. Adv Periodon Implantol. 22, 2: 91-107.
- [8] Franch F, Luengo F, Bascones A (2004). Evidencia microbiana de la periimplantitis, factores de riesgo coadyuvantes, diagnóstico y tratamiento según los protocolos científicos. Adv Periodon Implantol.; 16, 3:143-156.

- [9] Mendonca G, Mendonca DB, Aragao FJ, Cooper FL(2008). Advancing dental implant surface technology-From micron to nanotopography. *Biomaterials*. 29:3822-3835.
- [10] Masuda T, Salvi GE, Offenbacher S, Felton DA, Cooper L (1997).Cell and matrix reactions at titanium implants in surgically prepared rat tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants*.12: 472.-85.
- [11] Meyer U, Joos U, Mythili J, Stamm T, Hohoff A, Fillies T, et al (2004). Ultrastructural characterization of the implant/bone interface of immediately loaded dental implants.*Biomater*. 25: 1959-1967.
- [12] Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe (2003). De novo alveolar bone formation adjacent to endosseousimplants.*J. Clin Oral Implants Res* 14: 251–262
- [13] Hersel U,Dahmen C, Kessler H (2003) RGD modified polymers: biomaterials for stimulated celladhesion and beyond. *Biomaterials* 24 4385–4415.
- [14]Niinomi M (1998). Mechanical properties of biomedical titanium alloys. *Materials Science and Engineering* 243: 2231–2236.
- [15] Schneider GB, Perinpanayagam H, Clegg M, Zaharias R, Seabold D, Keller J, et al.(2003) Implant surface roughness affects osteoblast gene expression. *J Dent Res* 82:372-376.
- [16] Isa ZM, Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford CM (2006). Effects of fluoride-modified titanium surfaces on osteoblast proliferation and gene expression. *Int J Oral Maxillofac Implants* 21:203–211.
- [17] Ogawa T, Nishimura I(2006). Genes differentially expressed in titanium implant healing. *J Dent Res* 85:566–570.

- [18] Abron A, Hopfensperger M, Thompson J, Cooper LF(2001). Evaluation of a predictive model for implant surface topography effects on early osseointegration in the rat tibia model. *J. Prosthet. Dent.* 85:40–6.
- [19] Ogawa T, Nishimura I (2003). Different bone integration profiles of turned and acid-etched implants associated with modulated expression of extracellular matrix genes. *Int J Oral Maxillofac Implants.*18: 200–210.
- [20] Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL. (2004) Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res* 83:529–533.
- [21] Ellingsen JE, Johansson CB, Wennerberg A, Holmen A(2004) Improved retention and bone-to-implant contact with fluoride-modified titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 19: 659–666.
- [22] Gutwein LG, Webster TJ. (2004)Increased viable osteoblast cell density in the presence of nanophase compared to conventional alumina and titania nanoparticles. *Biomaterials* 25: 4175–4183.
- [23] Albrektsson T, Wennerberg A. (2004) Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them.*Int J Prosthodont* 17:536–543.
- [24] Albrektsson T, Wennerberg A (2004) Oral implant surfaces: Part 2--review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *Int J Prosthodont* 17:544–564.
- [25] Balasundaram G, Sato M, Webster TJ(2006). Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD.*Biomaterials*; 27:2798–2805.
- [26] Gutwein LG, Webster TJ (2004). Nano rough micron patterned titanium for directing osteoblast morphology and adhesion. *Biomaterials* 25:4175–4183.

- [27] Biggs MJP, Richards RG, Gadegaard , Wilkinson CDW, Dalby MJ(2007) The effects of nanoscale pits on primary human osteoblast adhesion formation and cellular spreading. *J Mat Sci: Mat Med* 18:399-404.
- [28] Cavalcanti-Adam EA, Volberg T, Micoulet A, Kessler H, Geiger B, Spatz JP. (2007) Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands. *Biophys J* 92:2964–2974.
- [29] Dalby MJ, Riehle MO, Johnstone HJH, Affrossman S, Curtis ASG(2003). Non adhesive nanotopography: fibroblast response to poly(n-butyl methacrylate)-poly(styrene) demixed surface features. *J Biomed Mater Res A* 67:1025-1032.
- [30] Park GE, Webster TJ(2005). A Review of Nanotechnology for the Development of Better Orthopedic Implants. *J Biomed Nanotechnol* 1:18–29.
- [31] Zhao G, Zinger O, Schwartz Z, Wieland M, Landolt D, Boyan BD(2006)Osteoblast-like cells are sensitive to submicron-scale surface structure. *Clin Oral Implants Res*;17:258–64.
- [32] Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R(2000). Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomater* 21:1803–10.
- [33] Webster TJ, Siegel RW, Bizios R (1999). Osteoblast adhesion on nanophase ceramic. *Biomater* 20:1221–1227.
- [34] Webster TJ, Eijofor JU (2004). Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo. *Biomater* 25:4731-4739.
- [35] Zhou J, Chang C, Zhang R, Zhang L (2007). Hydrogels prepared from unsubstituted cellulose in NaOH/Urea aqueous solution *Macromol. Biosci* 7:804-809.

- [36] Nanci A, Wuest JD, Peru L, Brunet P, Sharma V, Zalzal S, et al. (1998) Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J Biomed Mater Res* 40:324–35.
- [37] Cooper LF, Zhou Y, Takebe J, Guo J, Abron A, Holmen A, Ellingsen JE (2006). Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO₂ gritblasted c.p. titanium endosseous implants. *Biomaterials* 27:926-936.
- [38] Ricci JL, Charvet J, Frenkel SR, Chang R, Nadkarni J, Turner H (2000). Bone Response to Laser Microtextured Surfaces. *Bone Engineering* 25: 1-11.
- [39] Takamitsu M, Kunio I, Koji H *et al.* (2011) Comparison of apatite-coated titanium prepared by blast coating and flame spray methods. Evaluation using simulated body fluid and initial histological study. *Dental Materials Journal* 30 (4): 431–437.
- [40] Galliano P, de Damborenea JJ, Pascual MJ, Durán A (1998). Sol–gel coatings on 316L steel for clinical applications. *J Sol–Gel Sci Technol* 13: 723–727.
- [41] Gallardo J, Galliano PG, Durán A (2001). Bioactive and protective sol–gel coatings on metals for orthopedic prostheses. *J Sol–Gel Sci Technol* 21: 65–74.
- [42] Parkhill RL, Knobbe ET, Donley MS (2001). Application and evaluation of environmentally compliant spray-coated Ormosil films as corrosion resistant treatments for aluminum 2024-T3. *Prog. Org. Coat* 41: 261-265.
- [43] Duran A, Conde A, Gomez Coedo A, Dorado T, Garcia C, Cere S (2004). Sol–gel coatings for protection and bioactivation of metals used in orthopaedic devices. *J. Mater. Chem.* 14: 2282–2290.
- [44] Ballarre J, Manjubala I, Schreiner WH, Orellano JC, Fratzi P, Cere S (2010). Improving the osteointegration and bone-implant interface by incorporation of bioactive particles in sol-gel coatings of stainless steel implants. *Acta Biomaterialia* 6: 1601-1609.

- [45] Filiaggi M, Pilliar R, Abdulla D (1996). Evaluating sol-gel ceramic thin films for metal implant applications. II. Adhesion and fatigue properties of zirconia films on Ti-6Al-4V. *J. Biomed. Mater. Resear. (App. Biomater.)* 33: 239-256
- [46] Hosseinalipoura SM, Ershad-langroudib A, Hayatia AN, Nabizade-Haghighia AM (2010). Characterization of sol-gel coated 316L stainless steel for biomedical applications. *Progr Organic Coat* 67: 371–374.
- [47] Brinker CJ, Scherer GW (1990) *Sol-gel science*. San Diego, CA: Academic Press.
- [48] Hench LL, West JK (1990). The Sol-Gel Proces. *Chem Rev* 90: 33–72.
- [49] Zarzycki J (1997). Past and present of solgel science and *technology*. *J Sol-Gel Sci. 958 Technol*; 8:1–6.
- [50] Avnir D, Coradin T, Lev O, LivageJ(2006) Recent bio applications of sol-gelmaterials. *J Mater Chem*;16:1013–30.
- [51] Coradin T, Boissière M, Livage (2006). Sol-gel Chemistry in Medicine Science. *J. Curr Med Chem* 13: 99-108.
- [52] Lu Y, Gangull R, Drewlen CA, Anderson MT, Brinker CJ, Gong W, *et al* (1997). Continuous Formation of Supported Cubic and Hexagonal Mesoporous Films by Sol-Gel Dip-Coating. *Nature* 389: 364-368.
- [53] Brinker CJ, Lu Y, Sellinger A, Fan H (1999) Evaporation-induced self-assembly: nanostructures made easy. *Adv. Mater.*, 11: 579–585
- [54] Kresge C T, Leonowicz ME, Roth WJ, Vartuli JC, Beck JS (1992). Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature* 359:710 – 712.

- [55] Bagshaw SA, Prouzet E, Pinnavaia T (1995). Templating of mesoporous molecular sieves by nonionic polyethylene oxide surfactants. *Science* 269(5228):1242-1244.
- [56] Soler-Illia GJAA, Sanchez C, Lebeau B, Patarin J (2002). Chemical Strategies to Design Textured Silica and Metal Oxide-Based Organised Networks: From Nanostructured Networks to Hierarchical Structures *Chem. Rev.* 102: 4093-4138.
- [57] Buser D, Brogini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL. (2004) Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res*;83:529–33.
- [58] Kokubo T, Takadama H (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity. *Biomaterials* 27: 2907–2915.
- [59] Alberius PCA, Frindell KL, Hayward RC, Kramer WJ, Stucky GD, Chmelka BF (2002). General predictive syntheses of cubic, hexagonal, and lamellar silica and titania mesostructured thin films. *Chem Mater* 14: 3284-3294.
- [60] Miyaji F, Iwai M, Kokubo T, Nakamura T (1998). Effect of heat treatment on apatite-forming ability of Ti metal induced by alkali treatment. *J Mater Sci Mater Med* 9: 61-65.
- [61] Lopez-Noriega A, Arcos D, Izquierdo-Barba I, Sakamoto Y, Terasaki O, Vallet-Regi M (2006). Ordered mesoporous bioactive glasses for bone tissue regeneration. *Chem Mater* 18: 3137-3144.
- [62] Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T (1990). Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic. *Biomed. Mater. Res.* 24: 721-734.

- [63] Rajaraman R, Rounds DE, Yen SPS, Rembaum A (1974). A scanning electron microscope study of cell adhesion and spreading in vitro. *Exp Cell Res* 88: 327-39.
- [64] Balto H, Al-Nazhan S (2003). Attachment of human periodontal ligament fibroblasts to three different root-end filling materials. Scanning electron microscope observation. *Oral Surg* 95: 222-7.
- [65] Anselme K (2000). Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 21: 667-681.
- [66] Cacciafesta P, Humphries ADL, Jandt KD, Miles MJ (2000). Human plasma fibrinogen adsorption on ultraflat titanium oxide surfaces studied with atomic force microscopy. *Langmuir* 16: 8167-8175.
- [67] Nishimura T, Takeichi M (2009). Remodeling of the adherens junctions during morphogenesis. *Curr Top Dev Biol* 89: 33-54.
- [68] Boonrunsimana S, Gentlemana E, Carzanigad R, Evansa ND, McComba DW, Portera AE, Stevensa MM (2012). *PNAS* 109: 14170-14175.
- [69] Anderson HC (2003). Matrix vesicles and calcification. *Curr Rheuma Rep* 5: 222-226.
- [70] Guilak F, Cohen DM, Estes BT, Gimble JM, Liedtke W, Chen CS (2009). Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix. *Cell Stem Cell* 5(1): 17-26.
- [71] Kulangara K, Yang Y, Yang J, Leong KW (2012). Nanotopography as modulator of human mesenchymal stem cell function. *Biomaterials* 33: 4998-5003.
- [72] Tsigkou O, Jones JR, Polak JM, Stevens MM(2009). Differentiation of fetal osteoblasts and formation of mineralized bone nodules by 45S5 Bioglass

conditioned medium in the absence of osteogenic supplements. *Biomaterials* 21: 3542-50.

[73] Bielby RC, Christodoulou IS, Pryce RS, Radford WJ, Hench LL, Polak JM. (2004). Time- and concentration-dependent effects of dissolution products of 58S sol-gel bioactive glass on proliferation and differentiation of murine and human osteoblasts. *Tissue Eng* (7-8): 1018-26