https://jpis.org
J Periodontal Implant Sci. 2019 Dec;49(6):366-381
https://doi.org/10.5051/jpis.2019.49.6.366
pISSN 2093-2278·eISSN 2093-2286

Características bioactivas de la superficie de un implante recubierto con un agente amortiguador de pH: un estudio in vitro

Hyung-Chul Pae 1 , Su-Kyoung Kim2, Jin-Young Park 1, Young Woo Song 1, Jae-Kook Cha 1, Jeong-Won Paik 1, Seong-Ho Choi 1,*;

1 Departamento de Periodoncia, Instituto de Investigación para la Regeneración Periodontal, Yonsei Facultad Universitaria de Odontología, Seoul, Korea;

2 Centro de Investigación y Desarrollo de Implantes, Osstem Implant Co., Ltd., Busan, Korea.

Recibido Jul 22, 2019
Revisado Sep 15, 2019
Aceptado Oct 11, 2019

Seong-Ho Choi
Department of Periodontology, Research Institute for Periodontal Regeneration, Yonsei University College of Dentistry, 50 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 03722, Korea.
E-mail: shchoi726@yuhs.ac
Tel: +82-2-22283185
Fax: +82-2-3920398

Copyright© 2019.
Academia Coreana de Periodoncia.
Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia no comercial Creative Commons Attribution (creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0)

ORCID iDs
Hyung-Chul Pae
https://orcid.org/0000-0002-6365-3557
Jin-Young Park
https://orcid.org/0000-0002-6408-1618
Young Woo Song
https://orcid.org/0000-0003-1835-5646
Jae-Kook Cha
https://orcid.org/0000-0002-6906-7209
Jeong-Won Paik
https://orcid.org/0000-0002-5554-8503
Seong-Ho Choi
https://orcid.org/0000-0001-6704-6124

ABSTRACT

Propósito

El propósito de éste estudio fue evaluar la efectividad de una superficie convencional arenada con grano grueso, grabada al ácido (SLA®) recubierta con una solución tampón de pH basada en la humectabilidad de la superficie, la adhesión de proteínas sanguíneas, la afinidad osteoblástica y la adhesión y activación plaquetaria.

Métodos

Se prepararon discos e implantes de titanio con superficie de SLA® convencional (SA), superficie de SLA® en una solución acuosa de cloruro de calcio (CA) y superficie de SLA® con un agente tampón de pH (SOI®). La velocidad de humectación se midió por el número de hilos humedecidos por la sangre durante un intervalo de tiempo. La adsorción de albúmina sérica se probó mediante el ensayo de ácido bicinconínico y midiendo la intensidad de fluorescencia. También se realizaron ensayos de actividad osteoblástica (adhesión, proliferación, diferenciación, mineralización y migración osteoblástica) y ensayos de adhesión y activación plaquetaria.

Resultados

Tanto en la prueba de velocidad de humectación como en el ensayo de adsorción de albúmina sérica, la superficie SOI® mostró una velocidad de humectación significativamente mayor que la superficie SA (P = 0,000 y P = 0,000, respectivamente). En las pruebas de adhesión, proliferación, diferenciación y mineralización osteoblástica, los valores medios de SOI© fueron todos superiores a los de SA y CA. En las pruebas de migración osteoblástica, adhesión plaquetaria y activación, el SOI® también mostró valores significativamente más altos que el AS (p = 0,040, p = 0,000 y p = 0,000, respectivamente).

Conclusiones

El SOI® mostró mayor hidrofilicidad y afinidad por las proteínas, células y plaquetas que el SA. Dentro de los límites de este estudio, se puede concluir que el recubrimiento de un implante con un agente amortiguador del pH puede inducir la unión de plaquetas, proteínas y células a la superficie del implante. Se deben realizar más estudios para comparar directamente el SOI®- con otras superficies convencionales con respecto a su seguridad y eficacia en entornos clínicos.

Palabras clave

Materiales recubiertos biocompatibles; Implantes dentales; Inmunoanálisis; Propiedades de la superficie.

Contribuciones de los autores

Conceptualización
Su-Kyoung Kim;

Análisis formal
Jin Young Park, Young Woo Song;

Investigación
Su-Kyoung Kim;

Metodología
Seong-Ho Choi;

Administración de proyecto
JaeKook Cha, Seong-Ho Choi;

Escrito - diseño original
Hyung Chul Pae;

Escrito - revisión y edición
Jin Young Park, Young Woo Song, Jae-Kook Cha, Jeong-Won Paik.

Conflicto de intereses

Su-Kyoung Kim es miembro del personal e investigador de Osstem Implant Co., Ltd. y participó en los experimentos in vitro y en el proceso de escritura. Todos los demás autores declaran no tener ningún conflicto de intereses asociado con este estudio. Hyung-Chul Pae 1, Su-Kyoung Kim2, Jin-Young Park 1, Young Woo Song 1, Jae-Kook Cha 1 , Jeong-Won Paik 1, Seong-Ho Choi 1,*.

1 Departamento de Periodoncia, Instituto de Investigación para la Regeneración Periodontal, Yonsei Facultad Universitaria de Odontología, Seoul, Korea.

2 Centro de Investigación y Desarrollo de Implantes, Osstem Implant Co., Ltd., Busan, Korea.

INTRODUCCIÓN

El uso de implantes dentales de titanio ha mejorado con respecto a la rápida osteointegración y carga protésica, así como una mayor tasa de éxito de los implantes. En particular, las modificaciones en la superficie de los implantes han desempeñado un papel importante en estas mejoras [1-6]. Se ha demostrado que las modificaciones topográficas y químicas de la superficie del implante mejoran la hidrofilicidad y el contacto hueso-implante [5,7-9]. Las superficies de implantes arenadas con grano grueso y grabadas al ácido (SLA®), que tienen una microestructura y una macroestructura, han mostrado buenos resultados clínicos en estudios previos [1,2,4,7].

Además, se han desarrollado modificaciones químicas de las superficies de SLA®. SLActive® (Straumann®, Basilea, Suiza) consiste en una superficie de implante de SLA® que se ha sumergido en una solución isotónica de cloruro de sodio para evitar la contaminación por carbono de la atmósfera. Según un estudio anterior, se cree que esta superficie promueve la formación ósea en etapa temprana [10]. También se ha desarrollado una superficie de SLA® modificada con calcio activada químicamente (Osstem Implant Co., Ltd., Busan, Korea); Esta superficie se sumerge en una solución de cloruro de calcio en lugar de una solución de cloruro de sodio. Esta superficie modificada con calcio mostró un contacto óseo-implante similar al de la superficie SLActive® en un estudio reciente utilizando un modelo de conejo [11].

Las interacciones con las células sanguíneas y las moléculas en la superficie del implante podrían afectar las propiedades de la superficie [12]. Las proteínas, como los factores de crecimiento y diferenciación, son atraídas por las superficies de los implantes hidrofílicos. En muchos estudios, las características bioquímicas de la superficie del implante, como la viabilidad celular, la proliferación, la unión y la diferenciación, se probaron a través de experimentos in vitro utilizando células o citoquinas, y se encontró que estas propiedades influyen en las actividades celulares [12-14].

La formación de un coágulo de fibrina suficiente ofrece un enlace directo y estable en la interfaz hueso-implante; por lo tanto, juega un papel importante en las respuestas trombogénicas y la osteointegración [15]. Cuando se observaron los coágulos de fibrina en diferentes superficies del implante, se encontró una relación entre la superficie del implante y la extensión del coágulo de fibrina [16].

En el proceso de perforación antes de la colocación del implante, el tejido óseo sufre un traumatismo similar a una fractura. El sitio se vuelve relativamente hipóxico y el pH extracelular se vuelve ácido. En condiciones ácidas, las células estromales de la médula ósea exhiben baja actividad de fosfatasa alcalina (ALP) y baja síntesis de colágeno, 2 factores que son importantes en la formación ósea [17]. Se ha informado que la actividad de ALP disminuyó de un pico a un pH de 7,4 a casi cero por debajo de un pH de 7,0 [18]. Otro estudio encontró que la actividad de ALP y la síntesis de colágeno, así como la glucólisis y la síntesis de ADN de los osteoblastos, también se ven afectadas por las condiciones ácidas [19]. Además, la agregación plaquetaria también se redujo por la acidosis extracelular, mediada por la vía de entrada de iones de calcio [20].

Se investigó la nueva superficie de SLA© activada químicamente que está recubierta con una solución tampón de pH. Se cree que esta superficie muestra una alta afinidad por las proteínas, las células y las plaquetas, lo que promueve una coagulación y trombogénesis sanguíneas rápidas y estables. Por lo tanto, el propósito de este estudio fue evaluar la efectividad de una superficie de SLA© recubierta con una solución tampón de pH in vitro en comparación con una superficie de SLA© convencional y una superficie de SLA© modificada con calcio activada químicamente en función de la humectabilidad de la superficie, la adhesión de proteínas sanguíneas, la afinidad osteoblástica y la adhesión y activación plaquetaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de discos, implantes y reactivos de titanio

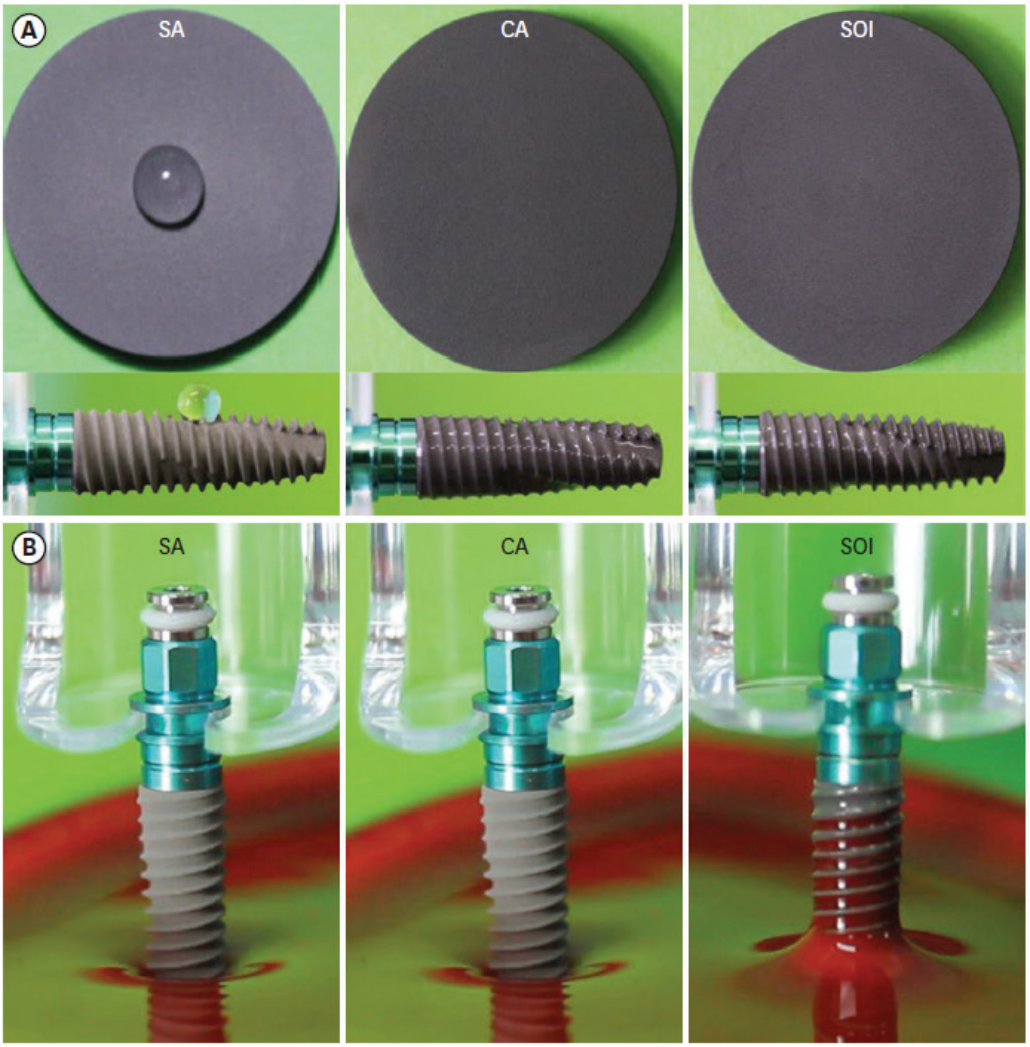


Figura 1.

Medición de la humectabilidad de la superficie. (A) Ángulo de contacto entre una gota de líquido y una superficie sólida. (B) Medición de la velocidad de humectación. Después de 40 segundos, la superficie SOI® mostró la mayor cantidad de hilos humedecidos por la sangre. SA: superficie de arenado convencional con grano grueso, grabada con ácido, CA: superficie grabada con grano grueso, grabada con ácido en solución acuosa de cloruro de calcio, SOI®: superficie grabada con grano grueso, grabada con ácido recubierta con solución tampón de pH.

Osstem Implant Co., Ltd. proporcionó tres tipos de discos e implantes de titanio: 1) una superficie de SLA® convencional (SA, que sirve como grupo de control negativo), 2) una superficie de SLA® en solución acuosa de cloruro de calcio (CA, que sirve como grupo de control positivo) y 3) una superficie de SLA© recubierta con una solución tampón de pH (SOI©, sirviendo como grupo de prueba).

(Figura 1A). Los valores de Ra de las superficies fueron de 2,5±0,5 µm, según la información del fabricante. Los artículos de plástico para cultivos celulares se compraron a Becton-Dickinson Falcon (Franklin Lakes, NJ, EE. UU.). El suero fetal bovino (FBS), la tripsina/ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), la penicilina y la estreptomicina, y el medio de águila modificado de Dulbecco (DMEM) se compraron a HyClone (Salt Lake City, UT, EE. UU.), y la solución salina tamponada con fosfato (PBS)

se obtuvo de Invitrogen Corporation (Paisley, Reino Unido). Se compraron Alizarin Red S, Triton X-100, p-nitrofenilfosfato (p-NPP), cloruro de magnesio y violeta de cresilo de Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.), y se obtuvo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-gl)-5-(3-carboximetoximetoxilfenil)-2-(4-sulfofenil-2H)- sal interna de tetrazolio (MTS) de Promega (Madison, WI, EE. UU.). Se utilizaron tres discos de cada superficie de titanio (SA, CA y SOI©) para cada prueba.

Medición de la humectabilidad de la superficie (medición de la velocidad de humectación)

Sangre de oveja efibrinada (MB-S1876; MB Cell, Seúl, Corea) se colocó en un plato (diámetro, 10 cm) a una profundidad de 2-3 cm. Los implantes con superficies SA, CA y SOI® (diámetro, 4,5 mm; longitud, 13 mm) se sumergieron en la sangre hasta 2 mm del ápice (Figura 1B). Se probaron nueve implantes para cada superficie. Para el cálculo de la velocidad de humectación se contó el número de hilos humedecidos por la sangre en 40 segundos.

Adsorción de albúmina sérica

Ensayo de ácido bicinconínico

Se añadió albúmina sérica bovina purificada (BSA, 1 mg/mL, 1 mL) a las superficies de los discos de titanio. Después de la incubación a 37 °C durante 1 hora, el plasma no adsorbido se lavó. Los discos tratados con BSA se eluyeron durante 30 minutos utilizando un tampón de lisis (0,2% Triton X-100 en PBS, pH 7,4) a 37 °C. Los sobrenadantes se analizaron mediante ensayos comparativos de ácido bicinconínico (BCA) (BCA Protein Assay Kit No. 23227) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el proveedor (Pierce, Rockford, IL, EE. UU.). La detección de proteínas se realizó a una longitud de onda de 560 nm utilizando un lector de microplacas multimodo (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Alemania). Se probaron nueve discos de titanio de cada superficie.

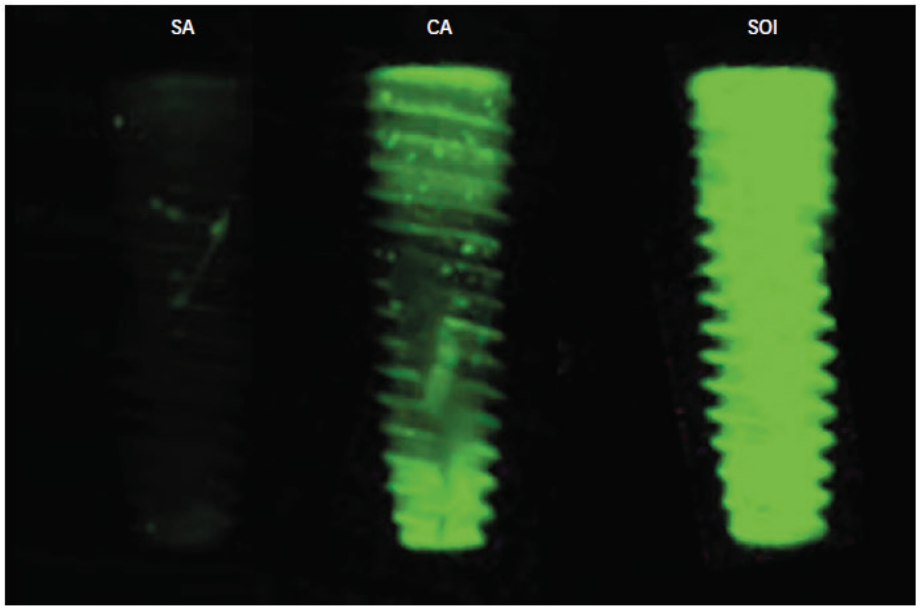


Figura 2.

Imagen que muestra la presencia de BSA marcada con FITC en cada superficie del implante. La intensidad de fluorescencia de la superficie SOI® fue la más fuerte, mientras que la de la superficie SA fue la más débil. FITC: isotiocianato de fluoresceína, BSA: albúmina de suero bovino, SA: superficie convencional arenada con grano grueso, grabada con ácido, CA: superficie arenada con grano grueso, grabada con ácido en solución acuosa de cloruro de calcio, SOI®: superficie arenada con grano grueso, grabada con ácido recubierta con solución tampón de pH.

BSA marcada con isotiocianato de flurescéina (FITC)

Para la prueba de adsorción de proteínas se utilizó BSA (Sigma) marcada con FITC en PBS. La adsorción se midió mediante intensidad de fluorescencia. Se añadió albúmina sérica conjugada con FITC para examinar la adsorción de proteínas plasmáticas por los implantes SA, CA y SOI®. Después de la incubación, el exceso de albúmina sérica conjugada con FITC se eliminó de las superficies del implante. Tres implantes de cada superficie se trataron con albúmina sérica conjugada con FITC, se examinaron con un dispositivo Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare Life Sciences, Chicago IL, EE. UU.) y se analizaron con el software Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD, EE. UU.) (Figura 2).

Observación de la morfología osteoblástica

Cultivo celular (cultivo osteoblástico)

La línea celular MG-63 (ATCC, Manassas, VA, EE. UU.), establecida a partir de células humanas de osteosarcoma, es una línea celular no transformada. Estas células se cultivaron de forma rutinaria en DMEM con 10% de FBS y 0,1 mg/ml de penicilina y estreptomicina. Las células se subcultivaron en tripsina/EDTA dos veces por semana y el medio se cambió cada 2 días.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para las observaciones SEM, las células MG-63 se incubaron en los discos de titanio y se fijaron con una solución de glutaraldehído al 2,5%. Después de la deshidratación, las muestras se recubrieron con Pt-Pd para su examen morfológico con SEM (JSM-6480LV, Tokio, Japón) (Figura 3).

Microscopía de barrido láser confocal (CLSM; tinción celular con inmunofluorescencia)

La morfología celular y la disposición citoesquelética de los osteoblastos se observaron con CLSM. Las células MG-63 se sembraron durante 24 horas en los discos de titanio y se observaron utilizando CLSM. Las células se fijaron en formol al 4% y se permeabilizaron en Triton X-100 al 0,1%. A continuación, las células se bloquearon en BSA al 7,5% que contenía PBS durante 1 hora. La tinción fluorescente se llevó a cabo con vinculina y F-actina utilizando Alexa Fluor 488 anti-vinculina (Bioscience, Allentown, PA, EE. UU.) y faloidina fluorescente anti-tinción 555 (Cytoskeleton Inc., Denver, CO, EE. UU.), respectivamente. Después de la incubación durante la noche a 4 °C, las muestras se observaron con CLSM (LSM 700, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) (Figura 4).

Adhesión osteoblástica

Con un kit de ensayo de proliferación celular no adiactiva CellTiter 96® AQueous (Promega), el ensayo de adhesión celular de las células MG-63 se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Antes del ensayo de adhesión celular, las células se cultivaron en los discos de titanio o en el material plástico utilizado para el cultivo en 24 placas de pocillos múltiples (Becton-Dickinson Falcon) a una densidad de 1×105 células durante 1 hora. Se probaron tres discos de titanio de cada superficie. Después de retirar y lavar los medios de cultivo, se añadieron 500 µL de mezcla de MTS/1-metoxi fenazino metosulfato (PMS)/medio a cada pocillo durante 2 horas. Las mediciones colorimétricas del colorante de formazano se realizaron utilizando un dispositivo DTX 880, y la densidad óptica (DO) se leyó a 490 nm.

Figura 3.

Imagen SEM tomada 30 minutos después de la incubación de células. MG-63 en cada superficie de implante. La cantidad de osteoblastos en las superficies CA y SOI® es más prominente que en la superficie SA, y las células en las superficies CA y SOI® parecen estar más diferenciadas.

SA: superficie de arenado convencional con grano grueso, grabada con ácido, CA: superficie arenada con grano grueso, grabada con ácido en solución acuosa de cloruro de calcio, SOI®: superficie arenada con grano grueso, grabada con ácido recubierta con solución tampón de pH.

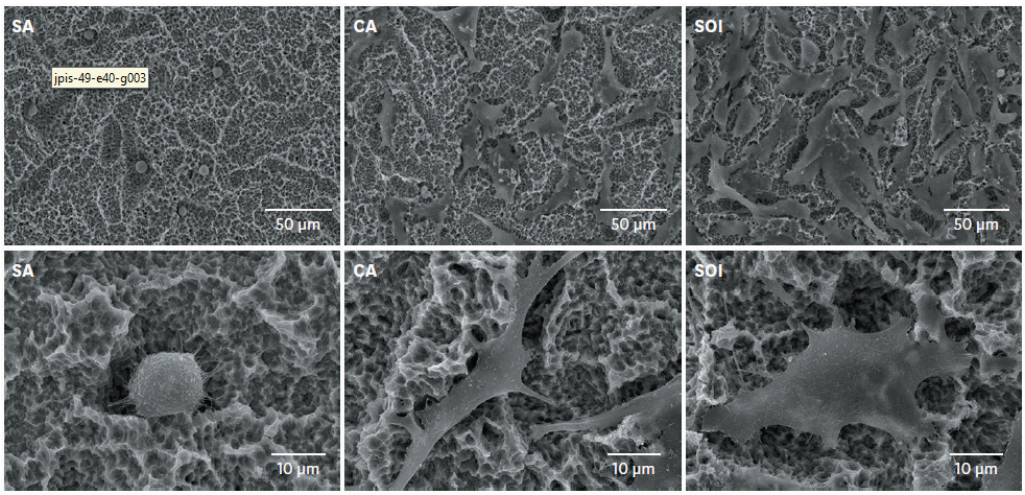
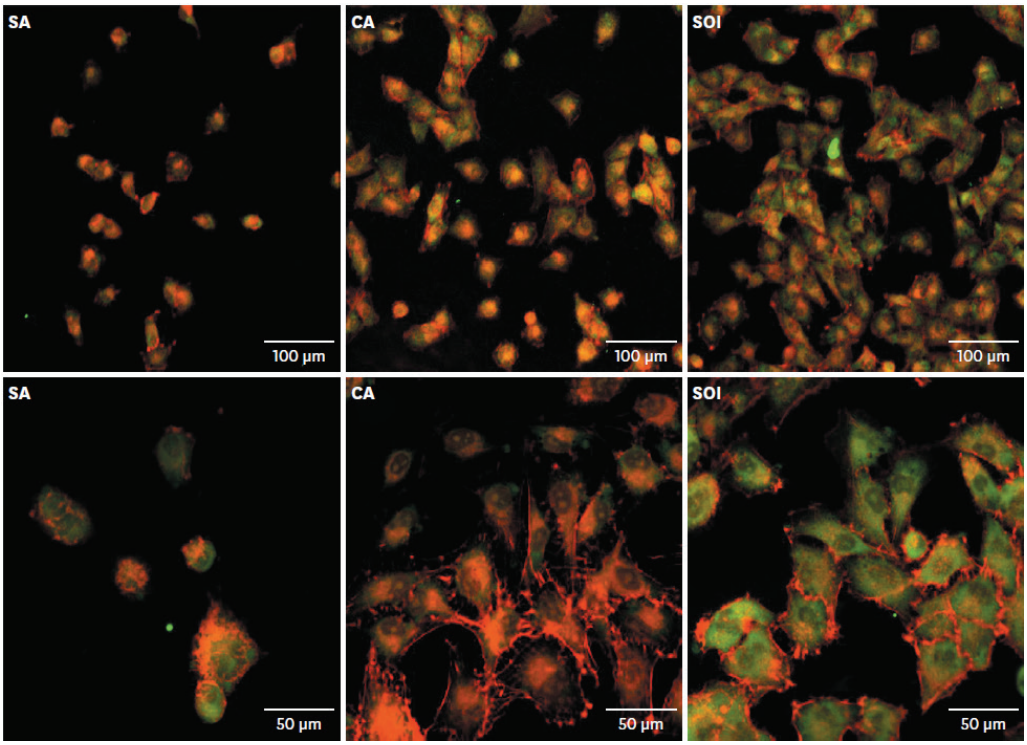


Figura 4.

Imagen de microscopio láser confocal de barrido (tinción celular por inmunofluorescencia) tomada 30 minutos después de la incubación de células MG-63 en cada superficie de implante. El rojo indica tinción con faloidina, mientras que el verde indica tinción con vinculina. Se observaron más células óseas en las superficies CA y SOI® que en la superficie SA. SA: superficie de arenado convencional con grano grueso, grabada con ácido, CA: superficie arenada con grano grueso, grabada con ácido en solución acuosa de cloruro de calcio, SOI®: superficie arenada con grano grueso, grabada con ácido recubierta con solución tampón de pH.



Proliferación osteoblástica

Utilizando un kit de ensayo de proliferación celular no radiactiva CellTiter 96® AQueous, el ensayo de proliferación de células MG-63 se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se cultivaron en los discos de titanio o en el plástico de cultivo. Se probaron tres discos de titanio de cada superficie. Después de un período de tiempo, se retiró el medio de cultivo y se combinaron 500 µL de la mezcla MTS/PMS/medio en cada pocillo durante 2 horas. Las mediciones colorimétricas del colorante formazano se realizaron utilizando un dispositivo DTX 880 y el DO se leyó a 490 nm.

Diferenciación osteoblástica (actividad de la fosfatasa alcalina)

La actividad de ALP se examinó como se describió en estudios previos [21-24], con células MG-63 cultivadas en los discos de titanio o en el plástico de cultivo. Se probaron tres discos de titanio de cada superficie. El medio osteogénico (que contenía 0,5 µM de dexametasona, 50 µg/mL de ácido L-ascórbico y 10 mM de β-glicerofosfato) [25,26] se reemplazó cada 2 días. Después de un período de tiempo, las células se lavaron y se reunieron en un tampón de lisis ALP. Se extrajo la proteína disuelta y se incubaron 100 g de proteína con p-NPP utilizando el tampón de ensayo ALP para medir la actividad de ALP en sobrenadantes celulares aislados. El grado de la reacción colorimétrica se midió utilizando un dispositivo DTX 880 para obtener una medida de OD a 405 nm.

Mineralización osteoblástica (tinción con rojo de alizarina S)

Las muestras experimentales se tiñeron con rojo de alizarina S como se ha informado en otro lugar [27-29], con modificaciones menores. Las células MG-63 se cultivaron en los discos de titanio o en el plástico de cultivo. Se probaron tres discos de titanio de cada superficie. El medio osteogénico se reemplazó cada 2 días. Después de un período de tiempo, las células se lavaron y luego se fijaron en formaldehído al 10% (Junsei, Tokio, Japón). Las células se tiñeron con Alizarina Roja S al 2% a un pH de 4,2 durante 20 minutos. Las células teñidas se recolectaron utilizando el proceso de recolección típico. El nivel de absorbancia de Alizarin Red S se midió a 405 nm.

Migración osteoblástica (ensayo de quimiotaxis: ensayo de migración celular Transwell®)

Para la migración celular, las células MG63 (1×106 células/mL) se suspendieron en un medio DMEM BSA al 0,1%, y se sembraron 350 µL de suspensión celular en las cámaras superiores de una unidad Transwell® (tamaño de poro de 8 µm, inserto SPL; SPL Life Sciences, Pocheon, Corea) e incubado. Las cámaras inferiores se llenaron con 1 mL de los eluyentes del implante. Después de 2 horas, se retiraron las cámaras superiores y se limpió el inserto Transwell® con un aplicador con punta de algodón. Los insertos se tiñeron con violeta de cresilo al 0,2% y las células teñidas se eluyeron con ácido cítrico. Las mediciones colorimétricas del violeta de cresilo se realizaron utilizando un dispositivo DTX 880 y la DO se leyó a 590 nm. Se probaron nueve discos de titanio de cada superficie.

Adhesión plaquetaria

Aislamiento plaquetario (plasma rico en plaquetas)

La sangre se obtuvo mediante punción cardíaca de un conejo neozelandés de 2,5 a 3,0 kg utilizando una aguja de 21 G en citrato de sodio al 4% (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EE. UU.). El plasma rico en plaquetas (PRP) se elaboró de acuerdo con la técnica descrita en un artículo anterior [30]. El PRP se incubó con cloruro de calcio (concentración final, 5 mM) (Fisher Scientific) a 37 °C durante 10 minutos.

Ensayo de lactato deshidrogenasa

La solución plaquetaria tenía una concentración de 1×108 plaquetas/mL en PBS. A esta solución, se le agregó cloruro de calcio para obtener una concentración de 2,5 mM, después de lo cual se agregó cloruro de magnesio para obtener una concentración final de 1,0 mM. Después de 30 minutos a 37 °C, la suspensión plaquetaria se colocó sobre los discos de titanio y se dejó adherir durante 1 hora a 37 °C. Se probaron nueve discos de titanio de cada superficie. La suspensión plaquetaria se enjuagó para eliminar las plaquetas no adherentes. El nivel de adhesión plaquetaria se cuantificó mediante un ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH). La LDH, que se libera cuando se lisan las plaquetas adherentes, se midió con un tampón Triton-PBS y un ensayo de citotoxicidad no radiactiva CytoTox 96® (Promega). Los métodos notificados en estudios previos [31, 32] se utilizaron con modificaciones.

Observación SEM de la red de fibrina

Preparación de la muestra de sangre para obtener un coágulo de fibrina

Como ya han descrito Park y Davies [33], los discos de titanio se insertaron de forma que se encajaran casi a presión en el fondo de las placas de 24 pocillos. Se añadió un mililitro de PRP a cada pocillo y se mezcló suavemente con proteínas sanguíneas capturadas dentro de la red de fibrina a 37 °C durante 24 horas.

Preparación del coágulo de fibrina lavado y observación SEM

Para prepararse para la observación SEM, las muestras de coágulos de fibrina se enjuagaron ligeramente con PBS y luego se fijaron durante 1 hora a temperatura ambiente utilizando un tampón de fijación especial (glutaraldehído al 2,5% disuelto en el tampón PBS de Dulbecco a un pH de 7,0). Después de deshidratar la red de fibrina adherida con una mezcla de etanol y agua, las muestras se trataron con hexametildisilazano (Sigma) y se secaron. El procedimiento SEM se completó con el secado del punto crítico del material. Las redes de fibrina adherentes se observaron mediante SEM (Figura 5).

Activación plaquetaria

La preparación de muestras de plaquetas humanas y la incubación de discos de titanio

PRP se obtuvo de 3 voluntarios sanos de la manera descrita anteriormente [34]. Como señalan Park y Davies [33], los discos de titanio se insertaron de modo que se ajustaran casi a presión en el fondo de las placas de 24 pocillos. Se probaron nueve discos de titanio de cada superficie. A cada pocillo se le añadió un mililitro de PRP. Con el fin de estimular las interacciones entre las superficies y las

plaquetas, la placa se mezcló suavemente a 37 °C. El sobrenadante se pipeteó después de 1 hora para su posterior análisis.

Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) para la P-selectina

Como índice de activación plaquetaria, se midió la P-selectina, una glicoproteína de la membrana plaquetaria que se expresa cuando se activan las plaquetas. Los sobrenadantes previamente preparados se analizaron mediante un ELISA para medir la concentración de P-selectina soluble. Todos los ensayos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Los registros de cada experimento se utilizaron para calcular los valores medios y de desviación estándar de los hilos por segundo y el DO de los ensayos realizados en las 3 superficies de implante (SA, CA y SOI©). Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Mann-Whitney (análisis de varianza no paramétrico) para analizar las diferencias entre las 3 superficies de implante. Se consideró que un valor de P inferior a 0,05 indicaba significación estadística. Para algunas pruebas con n<4, no se pudo realizar un análisis estadístico y solo se presentaron la media y la desviación estándar.

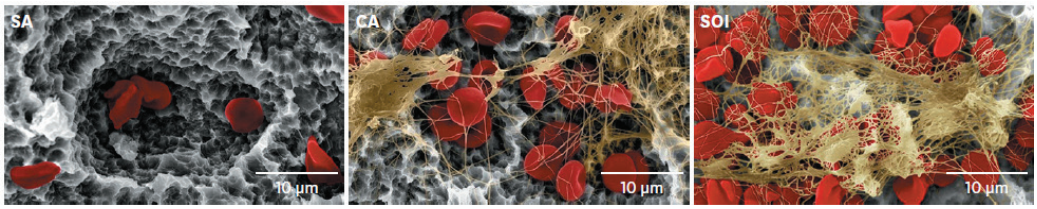


Figura 5.

Imagen de microscopía electrónica de barrido de redes de fibrina en cada superficie de implante 1 hora después de la fijación del coágulo de fibrina. En la superficie SOI®, se observaron numerosos glóbulos rojos y la red de fibrina estaba densamente presente por encima y alrededor de los glóbulos rojos.

SA: superficie de arenado convencional con grano grueso, grabada con ácido, CA: superficie arenada con grano grueso, grabada con ácido en solución acuosa de cloruro de calcio, SOI®: superficie arenada con grano grueso, grabada con ácido recubierta con solución tampón de pH.

RESULTADOS

Mediciones de humectabilidad superficial (mediciones de velocidad de humectación)

Los implantes con las superficies SA, CA y SOI® se sumergieron en sangre para medir la velocidad de humectación (Figura 1B). La velocidad media de humectación para cada superficie del implante se midió como 0,000 hilos/segundo, 0,069 hilos/segundo y 0,124 hilos/segundo, respectivamente (Tabla 1). La diferencia entre las velocidades de humectación de las superficies SA y CA fue estadísticamente significativa (P=0,000). Las diferencias entre las velocidades de humectación de las superficies SA y SOI© y entre las de las superficies CA y SOI® también fueron estadísticamente significativas (P=0,000 y P=0,000, respectivamente).

Adsorción de albúmina sérica

Ensayo de BCA

Se añadió albúmina sérica a los discos de titanio con las superficies SA, CA y SOI®. La adsorción media de albúmina sérica para cada superficie se midió como 0,281, 1,120 y 1,287 OD, respectivamente (Tabla 2). Las diferencias entre la adsorción de albúmina sérica de las superficies SA y CA fueron estadísticamente significativas (P=0,000). Las diferencias entre las superficies SA y SOI® y las de las superficies CA y SOI© fueron estadísticamente significativas (P=0,000 y P=0,000, respectivamente).

BSA con la etiqueta FITC

La adsorción media de proteínas medida por la intensidad de fluorescencia para las superficies SA, CA y SOI® fue de 3.972, 1.599.268 y 3.102.829 píxeles, respectivamente. Los datos se presentan en la Tabla 2. No se pudo realizar un análisis estadístico de las diferencias entre los grupos debido a la falta de un tamaño muestral suficientemente grande. Sin embargo, se observaron grandes diferencias en la intensidad de la fluorescencia entre los grupos, siendo la superficie SA la que mostraba los valores más bajos y la superficie SOI® la más alta.

Observación de la morfología osteoblástica

SEM

Las células MG-63 se incubaron en cada una de las superficies SA, CA y SOI®. El número de osteoblastos en las superficies CA y SOI fue mayor que el de la superficie SA, y las células de las superficies CA y SOI© parecían estar aún más diferenciadas.

Tabla 1. Velocidad de humectación

Tipo de superficie(n=9)	SA	CA	SOI
Velocidad (hilos/segundo)	0	0.069±0.005 a)	0.124±0.012 a)

Los valores se presentan como media±desviación estándar.

SA: superficie convencional arenada con grano grueso, grabada al ácido, CA: superficie arenada con grano grueso, grabada al ácido en solución acuosa de cloruro de calcio, SOI®: superficie arenada con grano grueso, grabada al ácido recubierta con solución tampón de pH. a) Diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo SA.

Tabla 2. Adsorción de albúmina sérica

Tipo de superficie(n=9)	SA	CA	SOI
BSA (OD) (n=9)	0.281±0.006	1.120±0.024 a)	1.287±0.040 a)
BSA (píxel) etiquetado por FITC (n = 3)	3,972±607	1,599,268±119,340	3,102,829±72,992

Los valores se presentan como media±desviación estándar.

SA: superficie convencional arenada, de grano grande, grabada al ácido, CA: superficie arenada con grano grueso, grabada al ácido en solución acuosa de cloruro de calcio; SOI®: superficie arenada con grano grueso, grabada al ácido recubierta con solución tampón de pH, OD: densidad óptica, FITC: isotiocianato de fluoresceína, BSA: albúmina sérica bovina. a) Diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo SA.

No se observaron diferencias significativas entre las superficies CA y SOI®, pero se estimó que el número de osteoblastos en la superficie SOI© era ligeramente mayor (Figura 3).

CLSM

Las células MG-63 se incubaron en cada una de las superficies SA, CA y SOI®. Se realizó tinción por inmunofluorescencia para la vinculina y la F-actina, que constituyen el citoesqueleto de la célula. Al igual que en las observaciones SEM, se observaron más células óseas en las superficies CA y SOI® que en la superficie SA (Figura 4).

Adhesión osteoblástica

Las mediciones medias del ensayo de adhesión celular para las superficies SA, CA y SOI® fueron de 0,438, 0,842 y 0,949 OD, respectivamente. Los datos se presentan en la Tabla 3. No se pudo realizar un análisis estadístico de las diferencias entre los grupos debido a la falta de un tamaño muestral suficientemente grande; sin embargo, la superficie SA mostró el valor más bajo para el ensayo de adhesión celular.

Proliferación osteoblástica

Las mediciones medias del ensayo de proliferación celular para las superficies SA, CA y SOI® fueron de 0,701, 0,837 y 0,912 OD, respectivamente. Los datos se presentan en la Tabla 3. No se pudo realizar un análisis estadístico de las diferencias entre los grupos debido a la falta de un tamaño muestral suficientemente grande; la superficie SA mostró el valor más bajo y la superficie SOI® mostró el valor más alto, pero en general, pareció haber poca diferencia entre los grupos.

Diferenciación osteoblástica

Las mediciones medias del ensayo de diferenciación osteoblástica para las superficies SA, CA y SOI® fueron de 0,350, 0,379 y 0,385 OD, respectivamente. Los datos se presentan en la Tabla 3. No se pudo realizar un análisis estadístico de las diferencias entre los grupos debido a la falta de un tamaño muestral suficientemente grande; las superficies SA mostraron el valor más bajo y la superficie SOI® mostró el valor más alto, pero en general, pareció haber poca diferencia entre los grupos.

Mineralización osteoblástica

Las mediciones medias del ensayo de mineralización osteoblástica para las superficies SA, CA y SOI® fueron de 320,4, 382,6 y 452,1 nM, respectivamente. Los datos se presentan en la Tabla 3. No se pudo realizar un análisis estadístico de las diferencias entre los grupos debido a la falta de un tamaño muestral suficientemente grande; sin embargo, las superficies de SA parecieron mostrar el valor más bajo para el ensayo de adhesión celular.

Tabla 3. Adhesión, proliferación, diferenciación, mineralización y migración osteoblástica

Tipo de superficie	SA	CA	SOI
Adhesión (OD) (n=3)	0.438±0.015	0.842±0.028	0.949±0.038
Proliferación (OD) (n=3)	0.701±0.016	0.837±0.027	0.912±0.023
Diferenciación (OD) (n=3)	0.350±0.010	0.379±0.005	0.385±0.005
Mineralización (nM) (n=3)	320.4±23.0	382.6±20.1	452.1±28.9
Migración (OD) (n=9)	0.195±0.013	0.195±0.012	0.215±0.018 a)

Los valores se presentan como media±desviación estándar.

SA: superficie arenada convencional, con grano grueso, grabada al ácido, CA: superficie arenada con grano grueso, grabada al ácido en solución acuosa de cloruro de calcio, SOI®: superficie arenadacon grano grueso, grabada al ácido recubierta con solución tampón de pH, OD: densidad óptica. a) Diferencia estadísticamente significativa en comparación con los grupos SA y CA.

Tabla 4. Adhesión y activación plaquetaria

Tipo de superficie	SA	CA	SOI
Adhesión (OD) (n=9)	0.185±0.016	0.255±0.031a)	0.298±0.042 a, b)
Activación (OD) (n=9)	0.112±0.014	0.251±0.024a)	0.414±0.046 a, b)

Los valores se presentan como media±desviación estándar.

SA: superficie de arenado convencional con grano grueso, grabada al ácido, CA: superficie arenada con grano grueso, grabada al ácido en solución acuosa de cloruro de calcio, SOI®: superficie arenada con grano grueso, grabada al ácido recubierta con solución tampón de pH, OD: densidad óptica.
a) Diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo SA.
b) Diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo CA.

Migración osteoblástica

Las mediciones medias de ELISA de P-selectina soluble para las superficies SA, CA y SOI® fueron de 0,195, 0,195 y 0,215 OD, respectivamente (Tabla 3). La diferencia entre los grupos de superficie SA y CA no fue estadísticamente significativa (p=0,931). Sin embargo, la superficie SOI® mostró un valor estadísticamente significativo mayor que el grupo SA o el grupo CA (P=0,040 y P=0,031, respectivamente).

Adhesión Plaquetaria

Las mediciones medias del ensayo LDH para la adhesión plaquetaria a las superficies SA, CA y SOI® fueron de 0,185, 0,255 y 0,298 OD, respectivamente (Tabla 4). La diferencia en el ensayo de LDH entre las superficies SA y CA fue estadísticamente significativa (P=0,000). Además, la superficie SOI® mostró un valor estadísticamente significativo mayor que los grupos SA y CA (P=0,000 y P=0,040, respectivamente).

Observación SEM de la red de fibrina

Se observó la morfología de las redes de fibrina adheridas a cada superficie. En las superficies de los implantes SA, la menor cantidad de glóbulos rojos eran visibles y apenas se observó una red de fibrina. Por el contrario, un gran número de glóbulos rojos se localizaron en las superficies de CA y se formó claramente una red de fibrina alrededor de los glóbulos rojos. En la superficie del SOI®, se observaron más glóbulos rojos y una red de fibrina estaba densamente presente por encima y alrededor de los glóbulos rojos (Figura 5).

Activación plaquetaria

Las mediciones medias de ELISA de P-selectina soluble para las superficies SA, CA y SOI® fueron de 0,112, 0,251 y 0,414 OD, respectivamente (Tabla 4). La diferencia entre los grupos de superficie SA y CA fue estadísticamente significativa (P=0,000). Las diferencias entre los grupos de superficie SA y SOI® y entre los grupos de superficie CA y SOI® también fueron estadísticamente significativas (P=0,000 y P=0,000, respectivamente).

DISCUSIÓN

Se probó si una superficie de SLA® recubierta con una solución tampón de pH mostraba una mayor hidrofilicidad y afinidad por las proteínas, las células y las plaquetas que una superficie de SLA® convencional. Estos estudios in vitro realizados con varias superficies de implante demostraron que esta novedosa superficie era superior a una superficie SLA® convencional.

Generalmente, la humectabilidad se cuantifica por el ángulo de contacto entre una gota de líquido y la superficie sólida de un disco plano. En este estudio, la velocidad de humectación, que es el número de hilos humedecidos por la sangre, se utilizó para probar indirectamente la humectabilidad, ya que los ángulos de contacto de las superficies CA y SOI® eran casi 0°, lo que imposibilitaba la comparación entre los grupos utilizando solo el ángulo de contacto. De hecho, el uso de la velocidad de humectación para evaluar la hidrofilicidad o humectabilidad de la superficie puede no producir resultados precisos. Sin embargo, optamos por medir la velocidad de humectación porque la capacidad de atraer sangre en situaciones clínicas es lo que finalmente queríamos evaluar. En cierto sentido, esto puede ser una limitación metodológica de este experimento, ya que se probaron 2 superficies con muy alta hidrofilicidad. La velocidad de humectación de la superficie SA fue casi 0, mientras que fue mucho mayor para las superficies CA y SOI® durante un corto período de tiempo. Esencialmente, la superficie SA parecía ser menos hidrófila que las otras 2 superficies porque era una superficie seca que no había estado en contacto con ningún líquido, como se usa en situaciones clínicas. Por esta razón, el resultado superior obtenido para el grupo SOI® puede no haberse debido al efecto del agente tampón en sí. Sin embargo, para comparar las superficies de los implantes utilizadas en situaciones clínicas reales, es razonable utilizar una superficie de SLA® seca en lugar de una superficie de SLA® sumergida en solución salina que no sea isotónica. Un estudio previo [10] que comparó la superficie de SLA® sumergida en una solución isotónica de NaCl con una superficie de SLA® convencional también utilizó una superficie seca para su grupo de control.

El grado óptimo de hidrofilicidad de la superficie del implante sigue sin estar claro. No está claro si la superficie de un implante superhidrófilo es biológica y clínicamente superior a una superficie de implante hidrofílico convencional y, en caso afirmativo, no está claro [9]. Sin embargo, se cree que una superficie más hidrofílica mejora la osteointegración según estudios previos in vivo y en humanos [8,10], ya que produce un mayor contacto entre el hueso y el implante. Además, se ha descubierto que la humectabilidad de la superficie altera las respuestas biológicas de las superficies de los implantes con respecto a la adhesión de proteínas y otras moléculas, así como las interacciones celulares [9]. Del mismo modo, en el presente estudio, el grupo SOI® con mayor velocidad de humectación también mostró la mayor afinidad por las proteínas y los osteoblastos.

Las propiedades bioquímicas de las superficies de los implantes, como la viabilidad celular, la proliferación celular, la unión celular y la diferenciación, se han probado en estudios in vitro anteriores [12-14]. Soares et al. [12] observaron el rendimiento biológico de superficies de implantes tratadas de manera diferente. Se evaluó la viabilidad celular (actividad mitocondrial), la adhesión celular, la proteína sérica total y la FA. Las características de la superficie del implante pueden determinar la respuesta celular alrededor del implante, así como la extensión de las proteínas adsorbidas en la superficie.

Martin et al. [13] realizaron análisis de proliferación celular, síntesis de ADN, actividad de ALP, síntesis de ARN y proteínas, y síntesis de proteoglicanos utilizando 5 tipos de superficies de implantes y células similares a osteoblastos MG63. Además, observaron la morfología y distribución de las células cultivadas en cada tipo de superficie. Su estudio demostró que la rugosidad de la superficie podría alterar la proliferación, la diferenciación y la producción de matrices de los osteoblastos.

Eriksson et al. [14] investigaron la viabilidad celular, la actividad de la fosfatasa alcalina, el nivel de factor de crecimiento endotelial vascular, la presencia de osteocalcina y las células positivas para la proteína morfogenética ósea-2 según la energía superficial de las superficies de los implantes. La energía superficial parecía ser particularmente importante en las primeras etapas, y se demostró que una alta energía superficial promueve la diferenciación y activación celular.

En el presente estudio, se realizó un ensayo de proliferación para evaluar la adhesión y proliferación de las células MG-63, el cual se visualizó utilizando el método colorimétrico de colorante formazano. Las imágenes SEM mostraron que las células de las superficies SOI© estaban más diferenciadas y habían proliferado en mayor medida que las de las otras superficies.

La diferenciación osteoblástica estuvo representada por la concentración de ALP, ya que la ALP está altamente expresada en la etapa de proliferación del osteoblasto [21-24]. La mineralización osteoblástica estuvo representada por la cuantificación del mineral calcificado teñido con Alizarina Roja S. Alizarina Roja S se une a los depósitos de calcio en cultivos celulares, lo cual es útil para la detección de calcificación de la matriz extracelular [27-29]. Además, la migración osteoblástica se probó con el ensayo de migración celular Transwell®, que mide la movilidad celular hacia un gradiente quimioatrayente [35]. Aunque el número repetido de experimentos para la adhesión, proliferación, diferenciación y mineralización celular no fue estadísticamente suficiente, hubo una tendencia a que la superficie SA fuera la menos amigable para los osteoblastos y la superficie SOI® fuera la más amigable para los osteoblastos en este estudio.

Di Iorio et al. [16] observaron coágulos de fibrina en las superficies de los implantes, y los puntos negros en las imágenes SEM, que se tomaron para indicar la presencia de coágulos de fibrina, se contaron automáticamente utilizando un software especial. En el presente estudio, el nivel de adhesión plaquetaria se cuantificó mediante la medición de la LDH, que se libera durante la lisis de las plaquetas adherentes. El nivel de activación plaquetaria se cuantificó midiendo la P-selectina, la glicoproteína de la membrana plaquetaria que se expresa cuando se activan las plaquetas. En la prueba de adhesión plaquetaria, la superficie SOI® mostró el valor medio más alto, pero sin significación estadística en comparación con la superficie CA. En la prueba de activación plaquetaria, la superficie SOI® presentó la mayor activación plaquetaria, con significación estadística. Las imágenes SEM también mostraron los mismos resultados, con una red de glóbulos rojos y fibrina claramente formada en la superficie del SOI®. La actividad osteoblástica alcanza su punto máximo a pH 7,4, una condición débilmente básica, y casi desaparece por debajo de 6,9 [18,19]. En este experimento, se utilizó un medio débilmente básico para cultivar células MG-63, como en la sangre. Aunque el medio de cultivo celular se intercambiaba periódicamente, el pH no podía mantenerse constante, ya que se veía afectado por los metabolitos de las células. Además, varios errores de laboratorio podrían afectar el pH en experimentos in vitro. Incluso cuando no se produce la perforación o la destrucción del hueso, lo que produciría un pH débilmente ácido,

un tampón de pH puede ser útil para mantener el pH constante incluso en condiciones in vitro. El agente amortiguador del pH parece crear condiciones favorables para la actividad osteoblástica al mantener el pH constante o al menos prevenir cambios significativos en el pH, ya que los resultados de este experimento mostraron un aumento de la actividad osteoblástica en el grupo SOI®. Los iones de calcio también se unen a varias proteínas en solución, manteniendo el pH de la solución débilmente básico y funcionando como un tampón de pH. Hay que tener en cuenta que los iones de calcio por sí mismos contribuyen a los procesos osteogénicos, pero también puede ser importante que la superficie de CA tenga un efecto amortiguador del pH, aunque no sea tan eficaz como la superficie SOI®. Además, la adhesión y activación plaquetaria fue significativamente mayor en las superficies de CA y SOI® que en la superficie de SA. La actividad plaquetaria es inhibida por la acidosis extracelular y promovida por la alcalosis extracelular [20]. Dado que la actividad plaquetaria se ve afectada por el pH extracelular, se cree que las plaquetas pueden haberse activado en las superficies CA y SOI®, que tienen un efecto amortiguador del pH.

En algunos experimentos, se observaron diferencias significativas entre las superficies CA y SOI®, mientras que otros experimentos no mostraron diferencias significativas. Dado que tanto las superficies de CA como las de SOI® tienen un efecto amortiguador del pH en la solución isotónica, los resultados de los experimentos no parecían ser consistentemente diferentes a menos que mostraran un efecto importante sobre la actividad celular. Por el contrario, la superficie SA, que no se sumergió en solución y no tuvo ningún efecto amortiguador del pH, mostró resultados significativamente inferiores en la mayoría de los experimentos.

Una superficie de SLA® con un agente amortiguador de pH mostró una mayor hidrofilicidad y afinidad por las proteínas, las células y las plaquetas que una superficie de SLA® convencional. Dado que el número de experimentos realizados no estaba estandarizado y era estadísticamente insuficiente en algunos experimentos, es necesario tener precaución al interpretar los resultados. En condiciones ácidas después de un procedimiento de perforación, también se espera que la capacidad de amortiguación del pH aumente el nivel de ALP, promoviendo la trombogénesis y la actividad osteoblástica. Dentro de los límites de este estudio, se puede concluir que esta nueva superficie puede inducir la unión a plaquetas, proteínas formadoras de hueso y células más que una superficie SLA® convencional, lo que permite lograr una osteointegración estable y rápida. Se deben realizar estudios adicionales para comparar directamente una superficie de SLA® con un agente amortiguador de pH con otras superficies convencionales con respecto a su seguridad y eficacia en entornos clínicos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer especialmente a Osstem Implant Co., Ltd. por el apoyo técnico que brindaron en la realización de este estudio.

REFERENCIAS

1. Massaro C, Rotolo P, De Riccardis F, Milella E, Napoli A, Wieland M, et al. Comparative investigation of the surface properties of commercial titanium dental implants. Part I: chemical composition. J Mater Sci Mater Med 2002;13:535-48.
PUBMED | CROSSREF

2. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 2--review focusing on clinical knowledge of different surfaces. Int J Prosthodont 2004;17:544-64.
PUBMED

3. Esposito M, Coulthard P, Thomsen P, Worthington HV. The role of implant surface modifications, shape and material on the success of osseointegrated dental implants. A Cochrane systematic review. Eur J Prosthodont Restor Dent 2005;13:15-31.
PUBMED

4. Puleo DA, Thomas MV. Implant surfaces. Dent Clin North Am 2006;50:323-38, v.
PUBMED | CROSSREF

5. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. Dent Mater 2007;23:844-54.
PUBMED | CROSSREF

6. Morton D, Bornstein MM, Wittneben JG, Martin WC, Ruskin JD, Hart CN, et al. Early loading after 21 days of healing of nonsubmerged titanium implants with a chemically modified sandblasted and acid-etched surface: two-year results of a prospective two-center study. Clin Implant Dent Relat Res 2010;12:9-17.
PUBMED | CROSSREF

7. Li D, Ferguson SJ, Beutler T, Cochran DL, Sittig C, Hirt HP, et al. Biomechanical comparison of the sandblasted and acid-etched and the machined and acid-etched titanium surface for dental implants. J Biomed Mater Res 2002;60:325-32.
PUBMED | CROSSREF

8. Lang NP, Salvi GE, Huynh-Ba G, Ivanovski S, Donos N, Bosshardt DD. Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. Clin Oral Implants Res 2011;22:349-56.
PUBMED | CROSSREF

9. Gittens RA, Scheideler L, Rupp F, Hyzy SL, Geis-Gerstorfer J, Schwartz Z, et al. A review on the wettability of dental implant surfaces II: biological and clinical aspects. Acta Biomater 2014;10:2907-18.
PUBMED | CROSSREF

10. Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. J Dent Res 2004;83:529-33.
PUBMED | CROSSREF

11. Scarano A, Piattelli A, Quaranta A, Lorusso F. Bone response to two dental implants with different sandblasted/acid-etched implant surfaces: a histological and histomorphometrical study in rabbits. BioMed Res Int 2017;2017:8724951.
PUBMED | CROSSREF

12. Soares PB, Moura CC, da Rocha Júnior HA, Dechichi P, Zanetta-Barbosa D. Biological characterization of implant surfaces- in vitro study. Rev Odontol UNESP 2015;44:195-9.
CROSSREF

13. Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J Jr, et al. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). J Biomed Mater Res 1995;29:389-401.
PUBMED | CROSSREF

14. Eriksson C, Nygren H, Ohlson K. Implantation of hydrophilic and hydrophobic titanium discs in rat tibia: cellular reactions on the surfaces during the first 3 weeks in bone. Biomaterials 2004;25:4759-66.
PUBMED | CROSSREF

15. Hong J, Kurt S, Thor A. A hydrophilic dental implant surface exhibits thrombogenic properties in vitro. Clin Implant Dent Relat Res 2013;15:105-12.
PUBMED | CROSSREF

16. Di Iorio D, Traini T, Degidi M, Caputi S, Neugebauer J, Piattelli A. Quantitative evaluation of the fibrin clot extension on different implant surfaces: an in vitro study. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2005;74:636-42.
PUBMED | CROSSREF

17. Kohn DH, Sarmadi M, Helman JI, Krebsbach PH. Effects of pH on human bone marrow stromal cells in vitro: implications for tissue engineering of bone. J Biomed Mater Res 2002;60:292-9.
PUBMED | CROSSREF

18. Arnett TR. Extracellular pH regulates bone cell function. J Nutr 2008;138:415S-8S.
PUBMED | CROSSREF

19. Kaysinger KK, Ramp WK. Extracellular pH modulates the activity of cultured human osteoblasts. J Cell Biochem 1998;68:83-9.
PUBMED | CROSSREF

20. Marumo M, Suehiro A, Kakishita E, Groschner K, Wakabayashi I. Extracellular pH affects platelet aggregation associated with modulation of store-operated Ca2+ entry. Thromb Res 2001;104:353-60.
PUBMED | CROSSREF

21. Engvall E. Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. Methods Enzymol 1980;70:419-39.
PUBMED | CROSSREF

22. Jung K, Pergande M. Influence of inorganic phosphate on the activity determination of isoenzymes of alkaline phosphatase in various buffer systems. Clin Chim Acta 1980;102:215-9.
PUBMED | CROSSREF

23. Harada M, Hiraoka BY, Fukasawa K, Fukasawa KM. Purification and properties of bovine dental-pulp alkaline-phosphatase. Arch Oral Biol 1982;27:69-74.
PUBMED | CROSSREF

24. Jones JV, Mansour M, James H, Sadi D, Carr RI. A substrate amplification system for enzyme-linked immunoassays. II. Demonstration of its applicability for measuring anti-DNA antibodies. J Immunol Methods 1989;118:79-84.
PUBMED | CROSSREF

25. Rausch-fan X, Qu Z, Wieland M, Matejka M, Schedle A. Differentiation and cytokine synthesis of human alveolar osteoblasts compared to osteoblast-like cells (MG63) in response to titanium surfaces. Dent Mater 2008;24:102-10.
PUBMED | CROSSREF

26. Valarmathi MT, Yost MJ, Goodwin RL, Potts JD. The influence of proepicardial cells on the osteogenic potential of marrow stromal cells in a three-dimensional tubular scaffold. Biomaterials 2008;29:2203-16.
PUBMED | CROSSREF

27. Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. J Cell Biol 1983;96:191-8.
PUBMED | CROSSREF

28. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. Anal Biochem 2004;329:77-84.
PUBMED | CROSSREF

29. Malladi P, Xu Y, Chiou M, Giaccia AJ, Longaker MT. Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells. Am J Physiol Cell Physiol 2006;290:C1139-46.
PUBMED | CROSSREF

30. Kanthan SR, Kavitha G, Addi S, Choon DS, Kamarul T. Platelet-rich plasma (PRP) enhances bone healing in non-united critical-sized defects: a preliminary study involving rabbit models. Injury 2011;42:782-9.
PUBMED | CROSSREF

31. Tamada Y, Kulik EA, Ikada Y. Simple method for platelet counting. Biomaterials 1995;16:259-61.
PUBMED | CROSSREF

32. Grunkemeier JM, Tsai WB, Horbett TA. Hemocompatibility of treated polystyrene substrates: contact activation, platelet adhesion, and procoagulant activity of adherent platelets. J Biomed Mater Res 1998;41:657-70.
PUBMED | CROSSREF

33. Park JY, Davies JE. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. Clin Oral Implants Res 2000;11:530-9.
PUBMED | CROSSREF

34. Klein MO, Grötz KA, Walter C, Wegener J, Wagner W, Al-Nawas B. Functional rehabilitation of mandibular continuity defects using autologous bone and dental implants- prognostic value of bone origin, radiation therapy and implant dimensions. Eur Surg Res 2009;43:269-75.
PUBMED | CROSSREF

35. Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, Yang LV. In vitro cell migration and invasion assays. J Vis Exp 2014:51046.
PUBMED | CROSSREF

OSSTEM IMPLANT

Avda. Manoteras, 32B. 28050 Madrid.
91 013 69 49
marketing.osstem.es