

Efectos de la luz UV sobre placas de titanio para la adhesión osteoblástica.

The effects of the ultraviolet irradiation of titanium plates on osteoblastic adhesion

Dr. René García-Contreras

Estudiante de la Maestría en Ciencias Odontológicas.
Facultad de Odontología
Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM)
Toluca, Estado de México, México

Dr. Rogelio J. Scougall-Vilchis

Investigador del Centro de Investigaciones
y Estudios Avanzados en Odontología (CIEAO)
Facultad de Odontología
Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM)
Toluca, Estado de México, México

Dra. Rosalía Contreras-Bulnes

Investigador del Centro de Investigaciones
y Estudios Avanzados en Odontología (CIEAO)
Facultad de Odontología
Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM)
Toluca, Estado de México, México

Dr. Kazunori Adachi

División de Farmacología.
Universidad de Meikai
Escuela de Odontología
Sakado, Saitama, Japón.

Dr. Hiroshi Sakagami

División de Farmacología.
Universidad de Meikai
Escuela de Odontología
Sakado, Saitama, Japón.

Dr. Yasushi Hibino

Biomateriales Dentales
Universidad de Meikai
Escuela de Odontología
Sakado, Saitama, Japón.

Dr. Hiroshi Nakajima

Biomateriales Dentales
Universidad de Meikai
Escuela de Odontología
Sakado, Saitama, Japón.

Dr. Jun Shimada.

Cirugía Oral y Maxilofacial
Universidad de Meikai
Escuela de Odontología
Sakado, Saitama, Japón.

Recibido: Marzo de 2011.

Aceptado para publicación: Mayo de 2001.

Resumen

Objetivo: Investigar los efectos de la irradiación ultravioleta (UV) sobre placas de titanio (Ti) para la adhesión osteoblástica por medio de un método colorimétrico simple y reproducible para determinar la densidad celular.

Materiales y métodos: Dos diferentes tamaños (10x10x0.5 mm y 20x20x0.05 mm) de placas (n=10 c/gp) fueron obtenidos de una hoja de Ti puro y divididas en dos grupos (n=5/gp) para cada tamaño de placa. La superficie de las placas de Ti fue pulida, observada con microscopía electrónica de barrido (MEB) y estimada la rugosidad de la superficie pulida. Para el grupo experimental, las placas de Ti fueron irradiadas a una longitud de onda de 253.7 nm con luz UV durante 5, 20, 40, 60 mi-

nutos ó 4 y 6 horas. Células osteoblásticas de ratón MC3T3-E1 fueron cultivadas en medio alfa mínimo esencial (-MEM) e inoculadas sobre cada placa de Ti. El número de células adheridas y proliferadas fue determinado por medio del método de MTT y el consumo de aminoácidos. **Resultados:** 20 minutos de irradiación UV de las placas de Ti fue suficiente para incrementar significativamente (p<0.05) la adhesión y proliferación celular, acompañado de un mayor consumo de aminoácidos. **Conclusiones:** La irradiación UV sobre placas de Ti incrementó significativamente la adhesión celular por medio del método de MTT, confirmando la potencialidad de la luz UV.

Palabras clave: Titanio, irradiación UV, adhesión celular, osteoblastos, método de MTT.

Abstract

Objective: To investigate the effects of the ultraviolet (UV) irradiation of titanium (Ti) plates on osteoblastic adhesion using a simple and reproducible colorimetric method to determine cell density.

Material and methods: Two different sizes of (n=10 each) plates (10 x 10 x 0.5 mm and 20 x 20 x 0.05 mm) were obtained from a sheet of pure titanium, which were then divided into two groups (n=5/gp) for each. The surface of the Ti plates was polished before being examined under a scanning electron microscope (SEM) to estimate the roughness of the polished surface. The group of experimental Ti plates was UV irradiated at a wavelength of 253.7 nm for 5, 20, 40, 60 minutes, or 4 and 6 hours.

MC3T3-E1 mouse osteoblasts were cultured in an alpha-minimum essential medium (-MEM) and inoculated on each Ti plate. The number of adherent and proliferated cells was determined using the MTT method and amino acid consumption.

Results: As little as 20 minutes of UV radiation of the Ti plates significantly ($p < 0.05$) improved the adhesion and proliferation of osteoblasts, and resulted in an increased consumption of glutamine and arginine.

Conclusions: UV irradiation of Ti plates significantly enhanced osteoblastic adhesion using the MTT method, confirming the potential of UV light

Key Word: *Titanium, UV irradiation, cell attachment, osteoblast, MTT method.*

Introducción

La necesidad de obtener una osteointegración total de los implantes dentales ha sido un reto para los odontólogos. Aunque el mejoramiento de las propiedades de las superficies de los implantes de titanio (Ti) por medios químicos ha evolucionado la era de la implantología,¹⁻⁶ el tratamiento ideal de las superficies de Ti no se ha logrado satisfactoriamente. La esterilización de los implantes dentales juega un papel muy importante en mantener la osteointegración de los mismos.⁷ La descarga de radiofrecuencia luminiscente⁸ y la irradiación de luz ultravioleta (UV)⁹ logran una superficie limpia de ellos, contribuyendo así a su integración ósea. La esterilización por luz UV produce una capa de óxido más delgada y eficiente que la esterilización por vapor,^{8, 10} debido a que la exposición induce a una fotocatalisis, reduciendo las concentraciones de carbono e incrementando la cantidad de oxígeno sobre las superficies. Teóricamente, una superficie con grandes cantidades de oxígeno es hidrofílica,¹¹ formando grupos estructurales de retención de agua y grupos OH y O₂ en su capa superficial.^{12, 13} La energía superficial e hidrofiliidad de las superficies de los implantes son de vital importancia en la interacción inicial entre las proteínas y células óseas.¹⁴⁻¹⁶

Recientemente la técnica y el sistema para la interacción entre el Ti y el cultivo celular se han establecido.² El método de MTT es un bioensayo que se basa en la reducción metabólica

del (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa que reduce a formazán, dando un color púrpura, permitiendo determinar la actividad mitocondrial de las células tratadas. Recientemente, reportamos que el contacto de células osteoblásticas de ratón MC3T3-E1 con placas de Ti cubiertas con hidroxiapatita significativamente incrementa la proliferación celular en base al número de células viables y el consumo de aminoácidos proveniente del medio de cultivo, específicamente arginina y glutamina.²

La rugosidad de la superficie puede afectar la expresión del gen¹⁷ y la diferenciación osteoclástica.¹⁸ Por otro lado, la foto-activación de las superficies de las placas de Ti con luz UV ha incrementado significativamente la adhesión de células mesenquimales pluripotenciales precursores de la línea celular C2C12,¹⁹ células derivadas de médula ósea de ratón^{20, 21} y células madre mesenquimales humanas (MSCs).²² Si bien esta información es particularmente valiosa para la aplicación clínica de los implantes de Ti, los detalles de los experimentos no se han descrito claramente, por lo que el presente trabajo tiene como propósito investigar los efectos de la irradiación ultravioleta (UV) sobre placas de titanio para la adhesión osteoblástica por medio de un método colorimétrico simple y reproducible para determinar la densidad celular.

Materiales y métodos

Preparación de las placas de Ti

Hojas de Ti tipo 1 comercialmente puro (99.5%) (Tokuriki, Melters, Tokio, Japón) fueron utilizadas para preparar placas de Ti de 10x10x0.5 mm y 20x20x0.05 mm (n=10c/gp). Las muestras fueron embebidas en resina epóxica y pulidas automáticamente a una velocidad de entre 160-200 rpm (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) con lija de agua de diferentes tamaños de grano, #400, 800, 1000, 1500 y 200 (Fuji Star, Sankyo, Rikagaku, Okegawa, Japón) y por ultimo con suspensión de diamante de 0.05-1 μm con fieltro (Chemomet, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA). Las placas fueron removidas de la resina y limpiadas ultrasónicamente (Shinmeidaikougyou, Sine sonic 100, Tokio, Japón) con una mezcla de agua bidestilada, etanol al 99.5% y acetona al 99.5%^{23, 24} durante 10 minutos²³⁻²⁵ y secadas a temperatura ambiente. Las placas de Ti de diferente tamaño fueron divididas en un grupo experimental (Irradiación UV) y un control (n=5c/gp). Todas las placas fueron reutilizadas a lo largo de los experimentos después de realizar un nuevo pulido y esterilizado.

Observación y medición de la superficie

Las superficies pulidas de las placas de Ti fueron observadas por microscopía electrónica de barrido (MEB) (JSM-6360LV, JEOL, Tachikawa, Japón) a 300 y 1000 aumentos. La rugosidad de las superficies de cada muestra se estimó con un medidor de rugosidad (Surfcom, Seimitsu, Tokio, Japón). Los parámetros obtenidos correspondieron a la medición de seis perfiles (5 mm en longitud) de cada placa de Ti (cuatro en la periferia y dos cruzados en el centro) y los resultados obtenidos se basaron de acuerdo a la ISO 4287:1997. El análisis de los resultados se consideró en orden a Ra (media aritmética del punto de partida de la rugosidad de la superficie en base a una línea media)^{6, 26} y Rmax (distancia vertical entre el punto más alto y el punto más bajo dentro de la longitud a medir).^{6, 26}

Esterilización e irradiación ultravioleta

Todas las muestras se empaquetaron en bolsas para esterilizar y fueron esterilizadas por medio de vapor húmedo (Tomy, SX-500, California, EUA). La aplicación de la irradiación UV, para el grupo control, se realizó sobre las muestras en una cámara de luz UV con una lámpara (Hitachi, Tokio,

Japón) a 253.7 nm que correspondieron a 52 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ en base al medidor de luz UV (YK-35UV, Lutron, Taipei, Taiwan). El tiempo de exposición a la radiación UV correspondió a 5, 20, 40, 60 minutos ó 4 y 6 horas a una distancia de 5 cm entre las placas de Ti y la fuente de irradiación UV.

Cultivo celular

Los osteoblastos de ratón de la línea celular MC3T3-E1 fueron obtenidos de la calvaria de ratones C57BL/6,²⁷ previamente establecidos, las células fueron sub-cultivadas en medio alfa mínimo esencial (-MEM) (GIBCO BRL, Grand Island, NY, EUA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (JRH Bioscience, Lenexa, KS, EUA) inactivado por calor, 100 UI/ml de penicilina G y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de sulfato de estreptomocina en cajas de cultivo celular de polietileno (10 cm) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) dentro de la campana de flujo (CCV-811, Ikemoto Rika Co. Tokio, Japón). Las células fueron incubadas (10-0211, Ikemoto Rika Co. Tokio, Japón) a 37°C en una atmósfera de medio húmedo con 5% de CO₂,² lavadas con solución salina buffer de fosfato (PBS) sin Ca²⁺ y Mg²⁺ (pH 7.4) y resuspendidas enzimáticamente del plato de polietileno con tripsina 0.25% con EDTA-2Na (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EU) en PBS (-) para cada experimento.

Cuantificación de la adherencia y proliferación celular

Las placas de Ti fueron aleatoriamente seleccionadas y las células fueron inoculadas a 2x10⁶ células/ml sobre cada placa de Ti y dentro de dos pocillos del plato de cultivo celular (12 pocillos), después de 40 minutos de adherencia e incubación a temperatura ambiente (25°C) dentro de la campana de flujo, el medio de cultivo se retiró y lavó tres veces con PBS para remover las células no adheridas. La proliferación de las células se llevó a cabo a 24 horas más de incubación con medio de cultivo fresco sobre las placas de titanio, posterior a lavarlas tres veces con PBS. La viabilidad celular se determinó por el método de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EU). Las células adheridas a las superficie de Ti se incubaron durante 40 minutos con 0.2 mg/ml de MTT en medio de cultivo del águila modificado de Dulbecco (DMEM) (GIBCO BRL, Grand Island, NY, EU) con 10% FBS. Se utilizó DMEM+10% FBS como medio de cultivo para determinar la viabilidad celular, ya que al disolver el reactivo de MTT en -MEM produce

una coloración azulada que puede dificultar o alterar la determinación exacta de la viabilidad celular. El medio de cultivo DMEM se utilizó únicamente para la determinación del método de MTT y todos los otros experimentos se realizaron con -MEM. El formazán resultante durante el período de incubación, fue disuelto con 0.8 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) (Wako Pure Chem Co., Osaka, Japón) y colocado sobre el plato de cultivo celular de 24 pocillos, la lisis resultante (0.2 ml) se depositó en un plato de cultivo celular de 96 pocillos, la cuantificación celular se determinó con la ayuda de un espectrofotómetro de microplaca (Multiskan, Biochromatic, Labsystem, Osaka, Japón) a 540 nm de absorbancia. Platos de cultivo de uso cotidiano se utilizaron para comparar la adhesión celular del grupo control y experimental, se utilizó una placa como antecedente para determinar las probables partículas desprendidas de las placas expuestas a luz UV y no interfirieran con el conteo celular.

Consumo de aminoácidos

La fracción resultante del medio de cultivo (100 µl) obtenido de las células osteoblásticas inoculadas sobre las placas de Ti se mezcló en tubos de eppendorf (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) a igual volumen de ácido tricloracético (ATC) (Wako Pure Chem Co., Osaka, Japón) al 10% y se colocaron sobre hielo durante 30 minutos. Después de centrifugar durante 5 minutos a 15,000 rpm, los sobrenadantes desproteinizados se colectaron y se almacenaron a -30°C. Se utilizó 20 µl de las muestras que fueron sometidos a un analizador de aminoácidos (JLC-500/V, JEOL, Tokio, Japón) por reacción de ninhidrina.²⁸ El consumo de glutamina y arginina fue determinado después de 24 horas de incubación para el grupo control y experimental.

Análisis estadístico

Se calculó el promedio y desviación estándar utilizando la hoja de cálculo Excel (Microsoft Office System, Redmond, Washington, EUA). Se utilizaron pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis para la comparación entre grupos y múltiples comparaciones de Mann-Whitney para los grupos en relación al tiempo de exposición de luz UV con el paquete estadístico SPSS (Versión 15, Chicago Illinois, EUA). La significancia del valor estadístico se estableció a un nivel de 0.05.

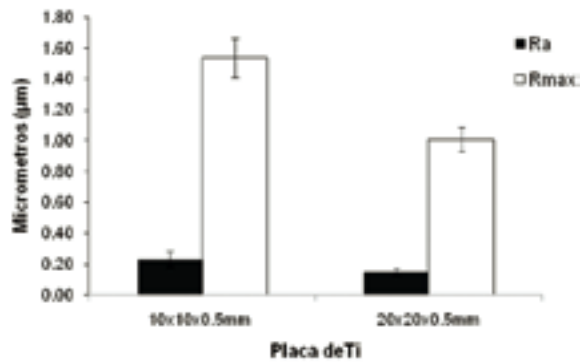
Resultados

Observación y medición de la superficie

Las placas de ti de 20x20x0.5 mm mostraron una superficie mas tersa en comparación a las placas de 10x10x0.5 mm en base a los valores promedios de Ra y Rmax (Tabla I, Gráfica 1). La observación microscópica de las placas de titanio muestran una superficie casi plana con algunas microporosidades a una magnificación de 300 y 1000 aumentos (Figura 1a y 1b)

Tabla I: Rugosidad de las placas de titanio

Placa de Ti	Ra (±m)	Rmax (±m)
10x10x0.5 mm	0.233±0.053	1.538±0.128
20x20x0.5 mm	0.148±0.021	1.008±0.078



Gráfica1. Rugosidad de las placas de Ti. Promedio de seis perfiles de los dos diferentes tamaños de placa (n=10 c/gp). Cada barra representa media ± D.S.

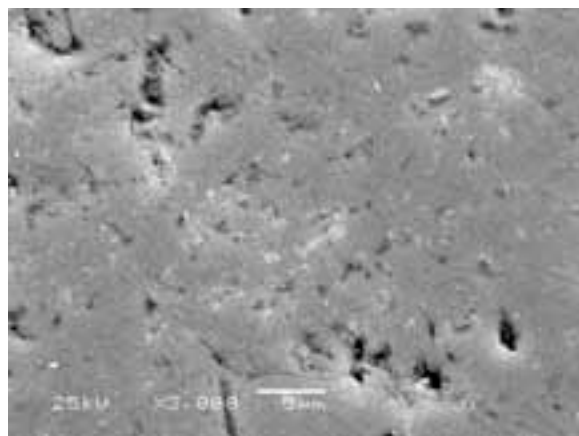


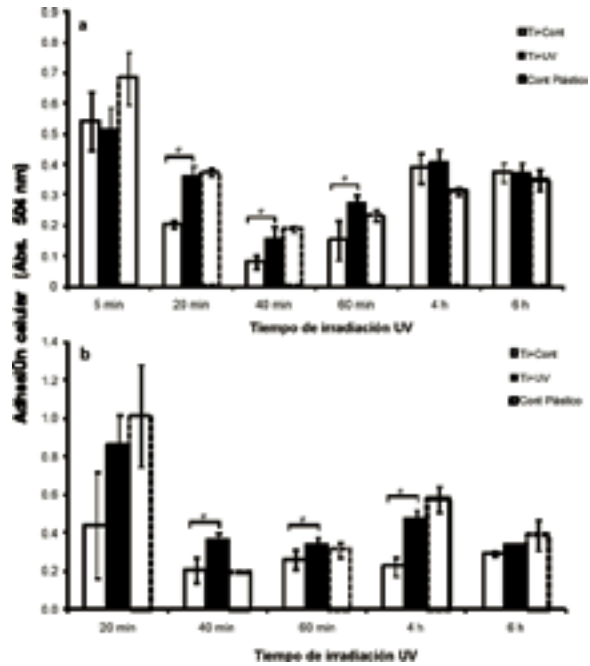
Figura 1. Imagen representativa de una placa de titanio pulida y observada con un microscopio electrónico de barrido (MEB). Tamaño original X 3000.

Adhesión y proliferación celular

La irradiación de las placas de Ti con luz UV a 253.7 nm significativamente incrementó la adhesión de células osteoblásticas de ratón de la línea celular MC3T3-E1 comparado con las placas de titanio sin exposición (Tabla II). La exposición a los 20 minutos con luz UV es suficiente para modificar la superficie de Ti e incrementar la adhesión de los osteoblastos y un tiempo prolongado las 4 horas de irradiación ligeramente disminuye la adhesión celular, esto en base a una mayor absorbancia en las placas expuestas a luz UV (Gráfica 2a y 2b). Las placas de Ti tratadas con luz UV tuvieron una misma o ligeramente mayor adherencia celular que los platos de polietileno para cultivo celular de uso común (Tabla II, Gráfica 2a y 2b).

Durante un tiempo de incubación subsecuente a 24 horas, las células adheridas a las placas de Ti con un tratamiento previo a 20 minutos de irradiación UV, mostraron un mayor número de proliferación celular en las placas de 10x10x0.5 mm que fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en comparación con las placas de 20x20x0.5 mm (Gráfica 3).

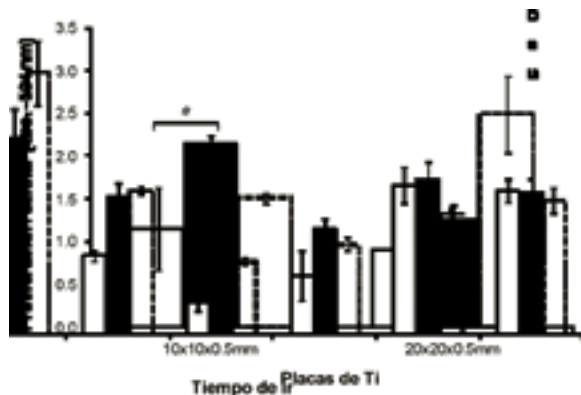
La adhesión celular y la actividad mitocondrial se confirmó por medio de una micrografía (MEB) posterior a la utilización del método de MTT al observar la ruptura citoplasma por la liberación mitocondria inducida por DMSO. La placa de



Gráfica 2. Efectos de la irradiación UV sobre placas de Ti en la adhesión de células osteoblásticas MC3T3-E1. Las placas experimentales fueron expuestas a luz UV con una longitud de onda de 253.7 nm durante 5, 20, 40, 60 minutos o 4 y 6 horas. Las células osteoblásticas fueron inoculadas sobre cada placa de 10x10x0.5 mm (a) y 20x20x0.5mm (b) sobre el grupo control (Ti+Cont) y experimental (Ti+UV), además de platos de cultivo de uso común (Cont Plástico) e incubadas por 40 minutos. Después de lavar las células con PBS, el número de células viables se calculó por el método de MTT. Cada barra representa media \pm D.S. obtenida de tres determinaciones a una absorbancia de 540 nm. *Prueba de Mann-Whitney ($P < 0.05$).

Tabla II. Estadística descriptiva de la adhesión de células osteoblásticas MC3T3-E1.						
Grupo	Tiempo de irradiación UV	n	Placa 10x10x0.5mm	Kruskal-Wallis	Placa 20x20x0.5mm	Kruskal-Wallis
Ti+controlD	I	3	.5440 \pm .095	A*	-----	A
	II	3	.2043 \pm .014		.4447 \pm .278	
	III	3	.0817 \pm .021		.2090 \pm .065	
	IV	3	.1530 \pm .065		.2643 \pm .051	
	V	3	.3903 \pm .049		.2267 \pm .050	
	VI	3	.3740 \pm .032		.2963 \pm .014	
Ti+UVD	I	3	.5123 \pm .076	B**	-----	B*
	II	3	.3607 \pm .037		.8630 \pm .157	
	III	3	.1563 \pm .041		.3640 \pm .035	
	IV	3	.2750 \pm .027		.3420 \pm .040	
	V	3	.4053 \pm .044		.4763 \pm .047	
	VI	3	.3703 \pm .036		.3437 \pm .004	
Control plastico	I	2	.6845 \pm .085	C*	-----	A
	II	2	.3765 \pm .012		1.0150 \pm .267	
	III	2	.1905 \pm .009		.1950 \pm .002	
	IV	2	.2340 \pm .016		.3150 \pm .038	
	V	2	.3140 \pm .012		.5780 \pm .067	
	VI	2	.3500 \pm .033		.3910 \pm .080	

Λ =Placa de Ti control, Φ =Placa de Ti irradiada con luz UV. I=5 min, II=20 min, III=40 min, IV=60 min, V=4 hrs and VI=6 hrs. Grupos con letras diferentes son estadísticamente significativos entre ellos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.



Gráfica 3. Proliferación de las células adheridas después de 24 horas de incubación. Las placas experimentales fueron irradiadas con luz UV durante 20 minutos. Las células osteoblásticas fueron inoculadas sobre cada placa de 10x10x0.5 mm (a) y 20x20x0.5mm (b) sobre el grupo control (Ti+Cont) y experimental (Ti+UV), además de platos de cultivo de uso común (Cont Plástico) e incubadas durante 40 minutos. Después de lavar las células con PBS fueron incubadas durante 24 horas más y el número de células viables se calculó por el método de MTT. Cada barra representa media \pm D.S. obtenida de tres determinaciones a una absorbancia de 540 nm. *Prueba de Mann-Whitney ($P < 0.05$).

Ti con las células adheridas fueron fijadas con 2% de glutaraldehído en 0.1 M de solución de cacodilato (Figura 2). El método de MTT fue adecuado para determinar la interacción entre las células y las placas de titanio. Sin embargo, el formazán inducido a los 40 minutos de incubación no fue completamente removido por el DMSO, dejando una pequeña cantidad de células sobre las placas de Ti, las cuales pudieron ser observadas incluso después del contacto con DMSO por medio de MEB. (Figura 3).

Consumo de aminoácidos

El consumo de aminoácidos a las 24 horas de incubación por las células osteoblásticas MC3T3-E1 adheridas a las placas de Ti correspondió principalmente a glutamina y arginina, siendo mayor el consumo en las placas con una previa exposición a irradiación UV (Glut= $1003 \pm 27.23 \mu\text{M}$; Arg= $396 \pm 14.93 \mu\text{M}$,) en comparación a las placas sin irradiación UV (Glut= $1042 \pm 67.68 \mu\text{M}$; Arg= $409 \pm 23.16 \mu\text{M}$), lo que señala una mayor consumo de aminoácidos en las placas expuestas a luz UV por la mayor presencia de células osteoblásticas.

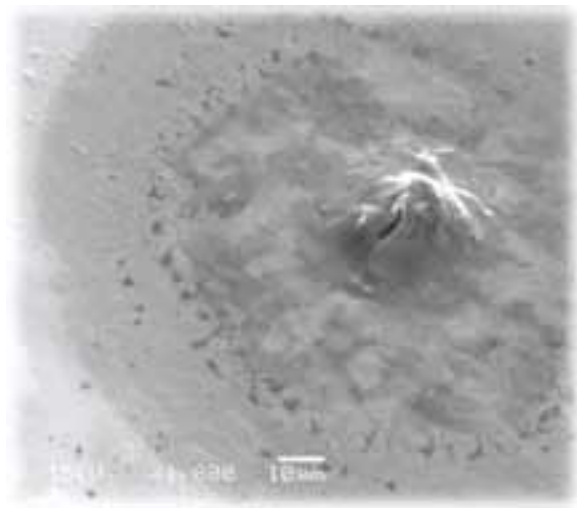


Figura 2. Adhesión celular y la actividad mitocondrial por el método de MTT. Nótese la intensa adhesión sobre la placa de titanio y la ruptura citoplasmática inducida por DMSO. La placa de titanio con las células adheridas fueron fijadas con 2% de glutaraldehído en 0.1M de solución de cacodilato y observadas en microscopía electrónica de barrido (MEB) a 1000 aumentos.

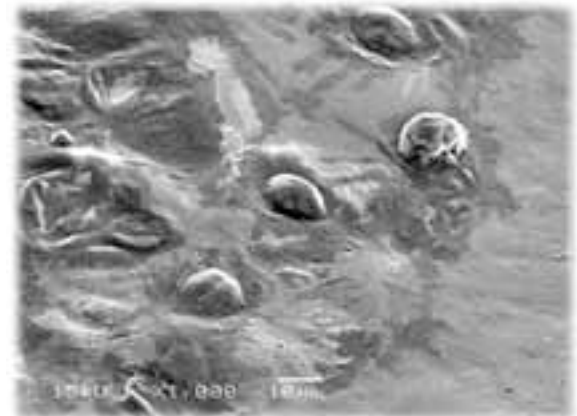


Figura 3. Presencia celular intacta posterior a la aplicación del método de MTT sobre las placas de titanio. Nótese la integridad citoplasmática posterior a la aplicación de DMSO. La placa de titanio con las células adheridas fueron fijadas con 2% de glutaraldehído en 0.1 M de solución de cacodilato y observadas en microscopía electrónica de barrido (MEB) a 1000 aumentos.

Discusión

El primer reporte de fotocatalisis del óxido de titanio (TiO_2) data desde 1970, el cual se llevó a cabo por Fujishima y cols.²⁹ A lo largo de la historia diversos estudios sobre las propiedades de la luz UV se han enfocado principalmente en efectos antibacteriales y de esterilización como lo fueron reportados por Xu y cols.³⁰ y Koseki

y cols.³¹ Recientemente, Ueno y cols.,¹⁹ Susuki y cols.³² e Iwasa y cols.³³ han demostrado que la irradiación UV para el tratamiento de placas e implantes de titanio han incrementado la aposición ósea en estudios en animales. Por otro lado, estudios *in vitro* han reportado el incremento en la adhesión y proliferación de diferentes líneas celulares como lo son células mesenquimales precursoras de la línea celular C2CI2, por Ueno y cols.,¹⁹ células osteoblásticas de ratón obtenidas de médula ósea reportado por Att y cols.,²⁰ y células madre humanas mesenquimales (MSCs) citadas por Aita y cols.²¹ y Susuki y cols.³²

En el presente estudio, la irradiación de luz UV sobre las placas de Ti comercialmente puro demostró el incremento en la adhesión de osteoblastos de ratón MC3T3-E1, lo que confirma la fotoactivación del Ti por luz UV para el incremento de la adhesión celular. La adhesión de las células osteoblásticas fue obtenida por un mínimo de 20 minutos de exposición a luz UV y una exposición mayor a 60 minutos o 4 horas disminuyen ligeramente la adhesión celular. La longitud de onda y los watts emitidos de la luz UV juegan un papel decisivo para el incremento de la adhesión de osteoblastos, así como la distancia entre las placas de Ti y la fuente de irradiación UV, la lámpara de luz UV utilizadas para este estudio lograron fotoactivar el titanio a 20 minutos de exposición UV. En el contexto de las superficies, Bico y cols.³⁴ mencionan que una superficie rugosa incrementa la hidrofiliidad induciendo a la formación de un líquido metaestable que se ha confirmado por medio de un mayor ángulo de contacto como el que se ha reportado en superficies de Ti inducidas a fotocatalisis por irradiación UV.^{22, 23} En el presente estudio se observó una mayor proliferación celular en las placas de 10x10x0.5 mm en comparación con las placas de mayor tamaño, lo que puede ser explicado por presentar una superficie más rugosa en base a los promedios de Ra y Rmax del medidor de rugosidad de superficie.

Dado que el método de colorimetría rápida del MTT se basa en la actividad celular metabólica, los presentes resultados del estudio pueden ser más confiables que los reportados por Sawase y cols.,²² en donde el conteo del número de células adheridas se realizó por medio de microscopía láser y un software especializado; por otro lado, Onuki y cols.² desprendieron las células adheridas con tripsina y el conteo celular se realizó

con hematocitómetro y por último Iwasa y cols.³² aislaron las células de la superficie con tripsina y ondas ultrasónicas, métodos que son ineficaces para la adecuada estimación del número de células viables. Sin embargo, el método de MTT presenta una limitación de subestimación celular mínima por falta de tiempo de contacto del reactivo del MTT con las células, por lo que en futuras investigaciones es recomendable aumentar el tiempo de incubación del reactivo con las células. Para solventar este problema de subestimación celular, el consumo de aminoácidos reportado por Onuki y cols.,² principalmente glutamina y arginina, es una opción adecuada para monitorear la actividad celular. En esta investigación, el consumo de aminoácidos a las 24 horas fue mayor en las células adheridas a las placas de titanio previamente tratadas con luz UV.

El presente estudio es preliminar, es necesario incluir más detalles sobre la cinética entre las células y las superficies de Ti, lo que involucra al tiempo de dosis-respuesta de irradiación UV, monitorear la expresión del gen de las células osteoblásticas, diferenciación osteoblástica en células maduras posterior a la modificación superficial, la utilización de modelos animales, además de evaluar la hidrofiliidad por medio del ángulo de contacto de las placas de Ti y correlacionar la rugosidad superficial con la adherencia celular.

Conclusiones

El presente estudio confirma la potencialidad de la irradiación UV al modificar las superficies de titanio e incrementar la adhesión celular tan rápido como a los 20 minutos de exposición a UV en base a la recuperación de un mayor número de células viables de las placas. El método de MTT provee de un simple y rápido sistema de análisis para investigar la interacción entre osteoblastos y placas de Ti modificadas.

Referencias bibliográficas

- Buser D, Broggin N, Wieland M, Scheiken RK, Denzar AJ, Cochran DL, Hoffman B, Lussini A, Steinemann SG. Enhanced bone opposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res* 2004; 83: 529-533.
- Onuki H, Sakagami H, Kobayashi M, Hibino Y, Yokote, Nakajima H, Shimada J. Effect of contact with titanium alloys on the proliferation of mouse osteoblastic cells in culture. *In Vivo* 2010; 24: 29-37.
- Yang GL, He FM, Hu JA, Wang XX, Zhao SF. Effects of biomimetically and electrochemically deposited nano-hidroxiapatite coating on

osseointegration of porous titanium implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod* 2009; 107: 782-789.

Iwaya Y, Machigashira M, Kanbara K, Miyamoto M, Noguchi K, Izumi Y, Ban S. Surface properties and biocompatibility of acid-etched titanium. *Dent Mater J* 2008; 27: 413-421.

Kim KH, Ramaswamy N. Electrochemical surface modification of titanium in dentistry. *Dent Mater J* 2009; 28: 20-36.

Chiesa R, Giavaresi G, Fini M, Sandrini E, Giordano C, Bianchi A, Giardino R. In vitro and in vivo performance of a novel surface treatment to enhance osseointegration of endosseous implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod* 2007; 103: 745-756.

Albresktsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson A. The long-term efficacy of currently used dental implants. A review and proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1986; 1: 11-25.

Hartman LC, Meenaghan MA, Schaaf NG, Howker PB. Effects of pretreatment sterilization and cleaning methods on materials properties and osseointegration of threaded implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1989; 4: 11-18.

Riley DJ, Bavastrello V, Covani U, Barone A, Nicolini C. An in-vitro study of the sterilization of titanium dental implants using low intensity UV-radiation. *Dent Mater* 2005; 21: 756-760.

Singh S, Schaaf N. Dynamic sterilization of titanium implants with ultraviolet light. *Inter J Oral Maxillo* 1989; 4: 139-146.

Wang R, Hashimoto K, Fujishima A. Light-induced amphiphilic surfaces. *Nature* 1997; 388: 431-432.

Tengvall P, Lundström I. Physico-chemical considerations of titanium as a biomaterial. *Clin Mater* 1992; 9: 115-134.

Lahann J, Mitragotri S, Tran TN, Kaido H, Sundaram J, Choi IS, Hoffer S, Samorjai GA, Langer R. A reversibly switching surface. *Science* 2003; 299: 371-374.

Kieswetter K, Schwartz Z, Dean DD, Boyan BD. The role of implant surface characteristics in the healing of bone. *Crit Rev Oral Biol Ued* 1996; 3: 329-245.

MacDonald DE, Deo N, Markovic B, Stranick M, Somasundaran P. Adsorption and dissolution behavior of human plasma fibronectin on thermally and chemically modified titanium dioxide particles. *Biomaterials* 2002; 23: 1269-1270.

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

Yamamichi N, Pugdee K, Chang W, Lee S, Yoshinari M. Gene expression monitoring in osteoblast on titanium coated with fibronectin-derived peptide. *Dent Mater J* 2008; 27: 744-750.

Makihira S, Mine Y, Kosaka E, Nikawa H. Titanium surface roughness accelerates RANKL-dependent differentiation in the osteoclast precursor cell line, RAW264.7. *Dent Mater J* 2007; 26: 739-745.

Ueno T, Yamada M, Suzuki T, Minamikawa H, Sato N, Hori N, Takeuchi K, Hottoti M, Ogawa T. Enhancement of bone-titanium integration profile with UV photofunctionalized titanium in a gap healing model. *Biomaterials* 2010; 31: 1546-1557.

Att W, Hori N, Iwasa F, Yamada M, Ueno T, Ogawa. The effect of UV-photofunctionalization on the time-related bioactivity of titanium and chromium-cobalt alloys. *Biomaterials* 2009; 30: 4268-4276.

Aita H, Att W, Ueno T, Yamada M, Hori N, Iwasa F, Tsukimura N, Ogawa T. Ultraviolet light-mediated photofunctionalization of titanium to promote human mesenchymal stem cell migration, attachment, proliferation and differentiation. *Acta Biomater* 2009; 5: 3247-3257.

Sawase T, Jimbo R, Baba K, Shibata Y, Ikeda T, Atsuta M. Photo-induced hydrophilicity enhances initial cell behavior and early bone apposition. *Clin Oral Impl Res* 2008; 19: 491-496.

Zhu Y, Watari F. Surface carbonization of titanium for abrasion resistant implant materials. *Dent Mater J* 2007; 26: 245-253.

Tamura Y, Yokoyama A, Watari F, Kawasaki. Surface properties and biocompatibility of nitrided titanium for abrasion resistant implant materials. *Dent Mater J* 2002; 21: 355-372.

Okawa S, Watanabe K. Chemical polishing of titanium with colloidal silica containing hydrogen peroxide-mirror polishing and surface properties. *Dent Mater J* 2009; 2: 68-74.

International Organization for Standardization: Geometrical Product Specifications (GPS): Surface texture, Profile method: Terms, definitions and surface texture parameters. ISO 4287:1997.

Sudo H, Kodoma H, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S. In vitro differentiation and calcification in new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 1983; 96: 191-198.

Sakagami H, Kishino K, Amano O, Kanda Y, Kunii S, Yokote Y, Oizumi H, Oisumi T. Cell death induced by nutritional starvation in mouse macrophage-like RAW264.7 cells. *Anticancer Res* 2009; 29: 343-348.

Fujishima A and Honda K. Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode. *Nature* 238: 37-38, 1972.

Xu MF, Lin S, Chen XM and Peng YZ. Studies on characteristics of nanostructure of N-TiO₂ thin films and photobactericidal action. *J Zhejiang Univ Sci B* 7: 586-590, 2006.

Koseki H, Shiraishi K, Asahara T, Tsurumoto T, Shindo H, Baba K, Taoda H and Terasaki N. Photocatalytic bactericidal action of fluorescent light in a titanium dioxide particles mixture: an in vitro study. *Biomed Res* 30: 189-192, 2009.

Susuki T, Hori N, Att W, Kubo K, Iwasa F, Ueno T, Maeda H and Ogawa T. Ultraviolet treatment overcomes time-related Degrading Bioactivity of titanium. *Tissue Engineering* 2009; 15:3679-3888.

Iwasa F, Hori N, Minamikawa H and Ogawa T. Enhancement of osteoblast adhesion to UV-photofunctionalized titanium via an electrostatic mechanism. *Biomaterials* 2010; 31: 2717-2727.

Bico J, Tordeux C and Quérés D. Rough wetting. *Europhys Lett* 2001; 55: 214-220.

Correspondencia:

Dr. Rogelio J. Scougall-Vilchis
Centro de Investigaciones y
Estudios Avanzados en Odontología (CIEAO)
Facultad de Odontología
Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM),
Toluca, Estado de México, México. Tel: 7222126464
E-mail: rogelio_scougall@hotmail.com