Resumen

Hoy en día, los implantes de titanio son a menudo utilizados en ortopedia y odontología. Aunque el titanio es un material biocompatible, su interacción con los tejidos biológicos circundantes puede verse afectada por diversos factores (infecciones, inflamación, rechazo, etc) dando lugar a una fijación del implante poco estable. Por este motivo, diversas investigaciones en curso están centrándose en mejorar y acelerar los procesos de osteointegración del implante una vez ha sido implantado en el organismo.

Este proyecto pretende estudiar la biofuncionalización del titanio como estrategia para bioactivar su superficie y mejorar sus propiedades osteointegrativas. La funcionalización es realizada con moléculas de adhesión celular más precisamente péptidos. Se usa una plataforma que contiene dos secuencias de amino ácidos que promueven la adhesión celular, las secuencias Arg-Gly-Asp (RGD) y Pro-His-Ser-Arg-Asn (PHSRN). El uso de la plataforma permite controlar de manera química la disposición y la orientación de los dos motivos. En este proyecto, esta biomolécula es inmovilizada por medio de una silanización.

En primer lugar, el proceso de biofuncionalización es caracterizada de manera fisicoquímica, con las técnicas de microscopía electrónica de barrido, de microscopía interferométrica, de ángulo de contacto, de microscopía de fuerza atómica, de espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X y de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier. Estos metodos permiten observar cambios en la topografía, en las propiedades físicas y en la composición química de las superficies de titanio, a lo largo del proceso de funcionalización.

La segunda parte de este proyecto estudia la caracterización biológica del proceso de funcionalización. Se caracteriza la respuesta biológica de células madre mesenquimales humanas (hMSCs), que son precursoras de células óseas (osteoblastos), sobre las superficies de titanio funcionalizadas con biomoléculas. Mediante ensayos de adhesión, proliferación y diferenciación, se describe el comportamiento de las células en las superficies.

La estrategia utilizada en este proyecto ha demostrado tener un efecto biológico positivo sobre la superficie del titanio. Por este motivo, el proceso de funcionalización caracterizado en este trabajo podría usarse para funcionalizar implantes de titanio para mejorar su osteointegración.

Para concluir, es importante comentar que este proyecto forma parte de un proyecto de mayor alcance dentro del grupo de Biomateriales del departamento de Ciencia de Materiales e Ingeniería Metalúrgica.

Sumario

RESUMEN 1

SUMARIO 3

1. GLOSARIO 5

2. INTRODUCCIÓN 6

2.2. Estado del arte 6

2.3. Objetivos del proyecto 16

3. MATERIALES Y MÉTODOS 17

3.1. Obtención de las muestras 17

3.2. Funcionalización 18

3.2.1. Activación con acido nítrico (HNO_3) 18

3.2.2. Silanización 18

3.2.3. Cross linker 19

3.2.4. Funcionalización 19

3.2.5. Recubrimiento con polietilenglicol 20

3.2.6. Representación del proceso 20

3.3. Caracterización fisicoquímica de las superficies biofuncionalizadas 21

3.3.1. SEM - Microscopía electrónica de barrido 22

3.3.2. Microscopía interferométrica 23

3.3.3. Angulo de contacto 23

3.3.4. AFM – Microscopía de fuerza atómica 23

3.3.5. XPS – Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X 24

3.3.6. FTIR – Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier 24

3.4. Caracterización biológica de las superficies biofuncionalizadas 25

3.4.1. Cultivo de células 25

3.4.2. Ensayo de adhesión celular 25

3.4.3. Ensayo de proliferación celular 26

3.4.4. Ensayo de diferenciación celular 27

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 28

4.1. Caracterización fisicoquímica de las superficies durante el proceso de biofuncionalización 28

4.1.1. SEM – Microscopía electrónica de barrido 28

4.1.2. Microscopía interferométrica 35

4.1.3. Angulo de contacto 36

4.1.4. AFM – Microscopía de fuerza atómica 40
4.1.5. XPS - Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X 45
4.1.6. FTIR – Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier 51
4.2. Caracterización biológica de las superficies durante el proceso de biofuncionalización 53
4.2.1. Ensayo de adhesión 53
4.2.2. Ensayo de proliferación 60
4.2.3. Ensayo de diferenciación.....62

5. CONCLUSIONES _____67

6. IMPACTO ECONÓMICO Y AMBIENTAL_____69

6.1. Presupuesto..... 69
6.2. Impacto ambiental 73

AGRADECIMIENTOS_____74

BIBLIOGRAFÍA_____75

1. Glosario

AFM : microscopía de fuerza atómica

APTES : (3-aminopropyl)triethoxysilane

BSA : suero bovino de albúmina

CL : *cross linker* / agente entrecruzante

c.p : comercialmente puro

DAPI : 4,6-diamidino-2-phenylindole

DE : Desviación estándar

DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium

ECM : matriz extracelular

EDS : espectroscopía de rayos X por energía dispersiva

FBS : suero fetal bovino

FN : fibronectina

FTIR : espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

Gly : glicina

hMSC : célula madre mesenquimal humana

PEG : polietilenglicol

PBS : solución salina fosfatada

PFA : paraformaldehido

PHSRN : secuencia de aminoácidos Pro-His-Ser-Arg-Asn

RGD : secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp

SEM : microscopía electrónica de barrido

Ti : titanio

XPS : espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X

2. Introducción

2.2. Estado del arte

En nuestro tiempo, estamos acostumbrados a llevar en nuestro cuerpo alguna parte del resultado de la innovación en biomedicina. Es bien conocido en nuestra sociedad la utilidad y la necesidad de todo tipo de implantes, para reparar lesiones o defectos causados por el envejecimiento, accidentes o enfermedades.

Los materiales a considerar como biomateriales tienen que responder a muchas exigencias, como por ejemplo propiedades mecánicas, la biocompatibilidad, la pasividad química, y con el fin de asegurar un buen comportamiento a largo plazo.

Los materiales conocidos para ser utilizados como biomateriales son el titanio y algunas de sus aleaciones, los aceros inoxidables y las aleaciones cromo cobalto (CoCr). En este proyecto, nos centraremos en el uso del titanio.

En los últimos años, el campo de los biomateriales ha progresado mucho. Esto es debido a la importancia de la investigación en este campo, pero también al aumento de la esperanza de vida y a la mejora de las técnicas quirúrgicas.

- Titanio

Se encuentra abundamente en la naturaleza, ya que es uno de los componentes de casi todos los minerales de origen volcánico que contienen hierro.

El titanio fue descubierto en Inglaterra por William McGregor en 1791 en el mineral llamado ilmenita ($FeO.TiO_3$). En 1795, el químico alemán Heinrich Klaproch descubrió el material en el mineral rutilo (TiO_2) y dio el nombre de titanio (palabra latina titans). La primera muestra de titanio metálico impuro fue obtenida en 1887 por Nilson y Pettersson. En 1910, Matthew A. Hunter obtuvo la primera muestra de titanio metálico puro, con un pureza de 99,9%, en pequeñas cantidades por reducción del tetracluoruro de titanio ($TiCl_4$) por medio de sodio a 700-800 °C, lo que se conoce como el proceso Hunter.

No fue hasta en 1937 que el titano empezó a ser utilizado en una gran variedad de aplicaciones gracias a la separación eficiente del mineral, lograda por Kroll con ayuda de Siemens y Helske. Actualmente, mediante técnicas más avanzadas que las existentes en 1937, pero con la misma base, se ha logrado obtener titanio en grandes cantidades. [1]

La extracción del titanio es un proceso complejo, que encarece mucho el producto final. Los minerales de los que se obtiene el titanio son el rutilo y la ilmenita.

Actualmente, para obtener el producto final de titanio puro, se emplea casi exclusivamente el método Kroll, que consiste en tres etapas: cloración, transformación y obtención. Durante la etapa de cloración, el mineral de titanio es calentado al rojo vivo. Después, se añade carbón y se hace circular cloro. Al final, se obtiene $TiCl_4$. La segunda etapa es la etapa de transformación. El $TiCl_4$ se pone en un horno a 800 °C. En este horno, se añade un gas inerte (helio o argón) y magnesio. Al final, se obtiene titanio esponjoso. La última etapa es la de la obtención: en un horno se pone el titanio esponjoso y varios fundentes, para obtener el titanio puro. [1]

El titanio posee una transformación alotrópica a la temperatura de 1155 K, pasando de una estructura Hexagonal Compacta (HCP), llamada α a una estructura Cúbica Centrada en el Cuerpo (BCC), llamada β. El titanio está considerado como el único metal ligero capaz de padecer tratamientos térmicos con transformación total en sus aleaciones. Es posible obtener aleaciones de titanio con estructuras α, β o α+β, en función de los elementos aleantes que estabilizan las fases α o β. Para estabilizar la fase α, se puede usar elementos de 4 electrones de valencia por átomo (como Al, O, C y N), mientras que para estabilizar la fase β, se usa el V, Mo y Ta. [2]

El titanio es muy reactivo, entonces la obtención del metal puro sería un trabajo muy laboroso y difícil. Por este motivo, se trabaja habitualmente con el conocido titanio comercialmente puro, denominado c.p. Existen cuatro grados de titanio c.p. según la cantidad de elementos intersticiales presentes, presentados en la tabla 1:

Elemento	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Nitrógeno máx	0.03	0.03	0.05	0.05
Carbono máx	0.10	0.10	0.10	0.10
Hidrógeno máx	0.0125	0.0125	0.0125	0.0125
Hierro máx	0.20	0.30	0.30	0.50
Oxigeno máx	0.18	0.25	0.35	0.40
Titanio máx	balance	balance	balance	balance

Tabla 1: Clasificación del titanio según su composición química en % en peso [1]

Grado	Resistencia máxima (Mpa)	Límite elástico 0.2% (Mpa)	Alargamiento (%)	Reducción área (%)
1	240	170	24	30
2	345	275	20	30
3	450	380	18	30
4	550	483	15	25

Tabla 2: Propiedades mecánicas del titanio comercialmente puro [1]

Como se ve en la tabla 2, las propiedades del titanio c.p. varían según su grado, sin embargo, posee buenas propiedades mecánicas para su uso como biomaterial implantable.

Cuando la proporción de aleantes es importante, la resistencia a la fractura es mejor, pero la capacidad de deformación sin fractura es peor. En este proyecto, se utilizará el titanio c.p. de grado 2.

- Propiedades del titanio comercialmente puro

Un implante tiene que ser biocompatible pero también tiene que presentar unos requerimientos como resistencia a la tracción, resistencia a la fatiga, resistencia a la corrosión, ser osteoconductivo, etc.

El módulo elástico del titanio es de 100-110 GPa, el del hueso es de 20 GPa. El titanio es el biomaterial utilizado con el módulo elástico más próximo al del hueso. En efecto, el módulo elástico de las aleaciones de base cobalto es de 220-234 GPa y para el acero inoxidable es de 200-210 GPa. El titanio es el material que posee la mejor compatibilidad elástica con el tejido natural del hueso, es por eso que es muy usado en aplicaciones biomédicas. [3]

El titanio es un material con una reactividad elevada, su oxidación tiene lugar en tiempos de nanosegundos. Es por eso que su superficie se presenta todo el tiempo recubierta de una capa de óxido (TiO, Ti_2O_3, y TiO_2). El más estable es el TiO_2. Esta capa de dióxido de titanio es adherente y muy estable mecánicamente, y protege el metal de un aumento de la oxidación, de reacciones químicas y biológicas indeseables, y también de la corrosión. [3]

El titanio tiene la capacidad de no reaccionar con el organismo, gracias a su elevada resistencia a la corrosión (en diferentes medios), es un material bioinerte.

Por todas estas razones, el titanio posee una biocompatibilidad excelente. La biocompatiblidad fue definida en 1987 por la Sociedad Europea de Biomateriales como: “La capacidad de un biomaterial de realizar su función en lo que concierne a una cierta terapia médica, sin desencadenar ningún efecto indeseable a nivel local o sistémico en el cuerpo del paciente, para generar el beneficio celular más apropiado o la mejor respuesta del tejido en esta situación específica, y optimizando la ejecución clínica de la terapia”. [4]

El titanio se usa en varios campos de medicina: para prótesis de hueso y de articulaciones (prótesis de cadera, rodilla, etc), para implantes dentales (raíz de titanio) y también dispositivos cardiovasculares (marcapasos, stents…). En este proyecto, nos interesa el estudio del titanio para las aplicaciones ortopédicas, es decir los implantes óseos.

Todo implante, al introducirse en el organismo, posee un cierto porcentaje de rechazo. Diversas investigaciones están intentando disminuir este porcentaje de rechazo. Aunque los implantes utilizados son biocompatibles, puede ocurrir que el cuerpo humano rechace este implante. Una pobre biointegración también va a dar lugar a una pobre fijación mecánica del implante con el hueso. El uso de materiales biocompatibles que facilitan la osteointegración de los implantes ayuda a disminuir el porcentaje de rechazo de implante.

- Osteointegración

Cuando se implanta un material en el cuerpo humano, en primer lugar se crea una interacción entre este material y los fluidos del cuerpo humano (sangre, saliva o fluidos extracelulares). Las moléculas del organismo, como las proteínas, son absorbidas de manera inespecífica por la nueva superficie, gracias a interacciones fisicoquímicas.

Después, se creen dos reacciones diferentes del cuerpo humano. La primera reacción viene de los procesos de corrosión y de degradación, crean un cambio en las características fisicoquímicas del material de implante. La segunda reacción creada por la presencia de un nuevo material es un proceso de inflamación, que provoca cambios en los tejidos circundantes.

Esta inflamación aparece en los tejidos blandos que rodean el implante. En primer lugar, se produce una inflamación aguda, creando dilataciones vasculares, lo que crea un aumento de la permeabilidad de los capilares. Después, como consecuencia, las células perciben la nueva superficie del implante y dependiendo de la conformación, la orientación y el tipo de proteínas adsorbidas interaccionan con ellas segregando un cierto tipo y número de citoquinas (mensajero biológico molecular) que atraen a los fibroblastos.

Los fibroblastos son mayoritarios en el proceso reparador. Después, aparece la fibrina que aporta las células al tejido conectivo del hueso.

Con materiales que no son biomateriales o con biomateriales que no tienen las mismas propiedades que el titanio, la presencia del implante prolonga el proceso inflamatorio y de reparación, generando una cápsula fibrotica alrededor del implante.

Para el titanio c.p la capsula de tejido blando que se genera sobre el implante es relativamente despreciable (5-10 nm de grosor). [5] [6]

- Limitaciones del titanio

A pesar de todos sus aspectos positivos como su biocompatibilidad, su resistencia a la corrosión y sus propiedades mecánicas, el titanio es un material bioinerte. No posee un carácter bioactivo, es su carencia más importante.

Se puede definir un material bioinerte como un material que no es tóxico y que no es biológicamente activo; mientras que un material bioactivo es un material que no es tóxico y que es biológicamente activo.

En efecto, el titanio no es capaz de interaccionar directamente con el hueso. Al insertar un implante de titanio en el organismo, este material no puede crear enlaces fuertes entre él y el tejido circundante. El material bioinerte durante su vida no cede ninguna substancia en cantidades perjudiciales, por lo que no provoca reacciones adversas en el tejido. Por eso, titanio c.p. es aceptado como un material bioinerte. [7]

Para facilitar la osteointegración, los implantes deben ser modificados para aumentar la adhesión de los osteoblastos en la superficie del implante.

- Métodos de modificación superficial para mejorar la osteointegración

El material bioactivo causa reacciones tisulares favorables, lo que lleva al establecimiento de enlaces químicos directos con los tejidos circundantes, lo que va facilitar la osteointegración.

Un material bioactivado está considerado como un material osteoinductivo, es decir que las células madres pueden diferenciarse en células óseas (osteoblastos). Esta formación de células óseas permite la formación del hueso, en un proceso conocido como osteogénesis.

Las respuestas en los tejidos a corto y largo plazo son debidas a las propiedades específicas de su superficie. Por eso, al controlar las propiedades asociadas a la calidad superficial, se puede obtener avances significativos para mejorar estas respuestas.

La rugosidad, la topografía y la composición química de la superficie juegan un papel importante en el desarrollo de una buena osteointegración. Para mejorar esta osteointegración, se puede hacer modificaciones de la superficie del material. [6] Nos centraremos únicamente en las modificaciones químicas.

El tejido óseo se compone de células y de una matriz extracelular (ECM) compuesta de una fase orgánica (principalmente proteínas y proteoglicanos) y una fase inorgánica compuesta principalmente de hidroxiapatita (fosfatos de calcio). La ECM de los huesos está compuesta de alrededor de 20 % de la fase orgánica y alrededor de 70% de la fase inorgánica. [8]

Las fibras que componen la matriz son fibras de colágeno y representan 95% del peso de la matriz orgánica del hueso. Entre estas fibras, se encuentran también otros tipos de proteínas y proteoglicanos. [8]

Modificaciones químicas inorgánicas

Para inducir la bioactividad al material, se puede modificar la composición química del material. Por eso, se pueden utilizar tratamientos con fosfatos de calcio, que provocan una precipitación de capas de apatita y modifican la composición superficial.

La apatita, al tratarse de fosfato de calcio, posee la misma composición química que la fase inorgánica del hueso. Tiene la capacidad de hacer proliferar y diferenciar los osteoblastos sobre la superficie de titanio, para que el tejido óseo pueda crear enlaces químicos.

Pero la hidroxiapatita es una cerámica y tiene una resistencia a la fractura limitada. Por este motivo, se usa generalmente como recubrimiento y no como un material entero.

Existen diferentes procesos que generan esta capa cerámica. Los procesos más empleados para eso son los procesos de proyección por plasma. [6] [8]

También existen métodos para promover la precipitación de hidroxiapatita, como los desarrollados por el grupo de Kokubo. [9]

Modificaciones químicas orgánicas

Otra estrategia se basa en la biofuncionalización del titanio con moléculas orgánicas de la ECM.

La biofuncionalización se define como “una modificación de las propiedades fisicoquímicas de la superficie de cualquier material, que permite incidir en el comportamiento de las células que entren en contacto con el biomaterial (como puede ser un implante o una prótesis) a fin de mejorar la respuesta biológica del organismo ante el material con el que se ha fabricado el implante.” [10] Con esta capacidad, las propiedades superficiales de los implantes pueden ser mejoradas para obtener efectos beneficiosos como una osteointegración más rápida por ejemplo.

Es una modificación superficial de tipo bioquímico de la superficie del implante agregándole biomoléculas como proteínas, enzimas o péptidos bioactivos. Es la opción utilizada en este proyecto.

- Las integrinas y la secuencia RGD

En la ECM se encuentran proteínas como el colágeno o la fibronectina. Estas proteínas interaccionan con las células via las integrinas.

Las integrinas son receptores de membrana, expresados en osteoblastos y muchos otros tipos celulares, que permiten la interacción entre las células y la ECM. Son, por lo tanto, vitales en los procesos de adhesión celular.

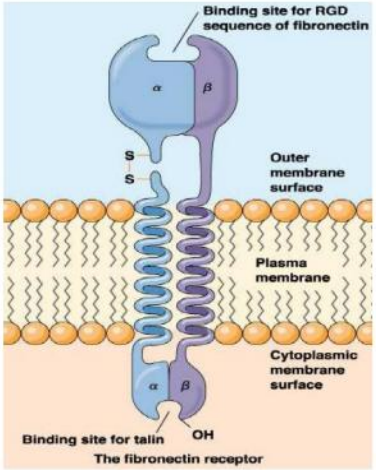


Figura 1: Esquema de una integrina

Las integrinas son heterodímeros, constituidos por dos subunidades conocidas como α y β asociadas de una manera no covalente. La combinación de esta subunidades define las propiedades de adhesión celular.

Como se ve en la figura 1, cada subunidad contiene un domino extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático. La mayor parte de la proteína se encuentra hacia el medio extracelular.

Existe 18 tipos de subunidad α y 8 subunidades β en los mamíferos. Estas subunidades se componen de entre 700 y 1200 aminoácidos. [6] [8] [11]

Esos receptores interactúan a través de secuencias de amino ácidos específicos de la matriz extracelular, en particular la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD: Arginina – Glicina –Acido aspártico). Este péptido, representado en la figura 2, es uno de los más efectivos para promover la adhesión celular. [6] [8]

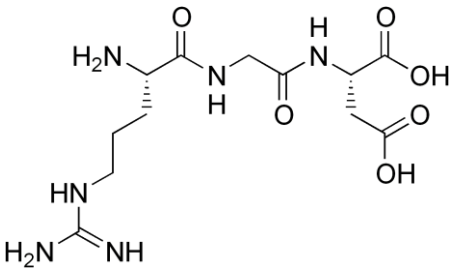


Figura 2: Secuencia RGD

La utilización de este motivo RGD sobre una superficie es una estrategia para mejorar la adhesión celular sobre el titanio.

- Proteínas y péptidos con el motivo RGD

La funcionalización del titanio con proteínas o péptidos con afinidad por las integrinas expresadas por osteoblastos ha demostrado una mejora adhesión de los osteoblastos y una mejora osteointegración del implante. [6] [7] [8]

El uso de péptidos sintéticos cortos, es una alternativa muy interesante para superar las limitaciones asociadas al uso de proteínas. Estos péptidos contienen sólo los aminos ácidos necesarios para promover la adhesión celular, es decir la secuencia RGD. Los péptidos actúan como las proteínas, activando señales intracelulares.

Sin embargo, un solo motivo peptídico no aporta los mismos resultados biológicos que la proteína entera (el potencial biológico es inferior y la selectividad es también inferior). Un gran esfuerzo se ha dedicado a mejorar la actividad biológica y la selectividad de los péptidos para la adhesión celular, con la utilización de péptidos cíclicos y peptidomimeticos. [12]

- El uso de plataformas

Una técnica sencilla y muy útil es combinar distintas secuencias bioactivas de pequeños péptidos. Por ejemplo, la combinación del motivo RGD (unión a integrinas) con una secuencia de unión a heparina ha demostrado una mejora de la adhesión celular y de la mineralización, en comparación con el uso de un único péptido. La principal limitación de esta estrategia es que es difícil de reproducir la orientación de los ligandos y que la caracterización de la proporción exacta de moléculas unidas a la superficie es difícil. [12]

Recientemente, en el grupo de investigación de biomateriales del Departamento de Ciencia de Materiales de la UPC se ha logrado sintetizar una plataforma compuesta de dos distintos motivos peptídicos biológicamente activos para funcionalizar biomateriales. Este sistema contiene las siguientes características, presentadas en la figura 3:

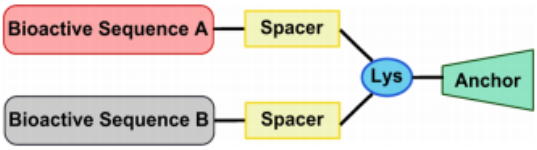


Figura 3: Representación esquemática de la plataforma

La plataforma se compone de dos secuencias de péptidos distintas, dos unidades separadoras, una lisina (Lys) como elemento bifurcador y un grupo de anclaje. Para asegurar una distancia mínima entre las secuencias bioactivas y el material, se necesita el uso de unidades separadoras.

En este proyecto, se ha usado una plataforma con las secuencias RGD y PHSRN. La combinación de estas secuencias ha sido descrita ampliamente para influir positivamente en el comportamiento celular en superficies funcionalizadas. [12]

La figura 4 presenta la plataforma utilizada. Durante este proyecto, esta plataforma será nombrada CM15.

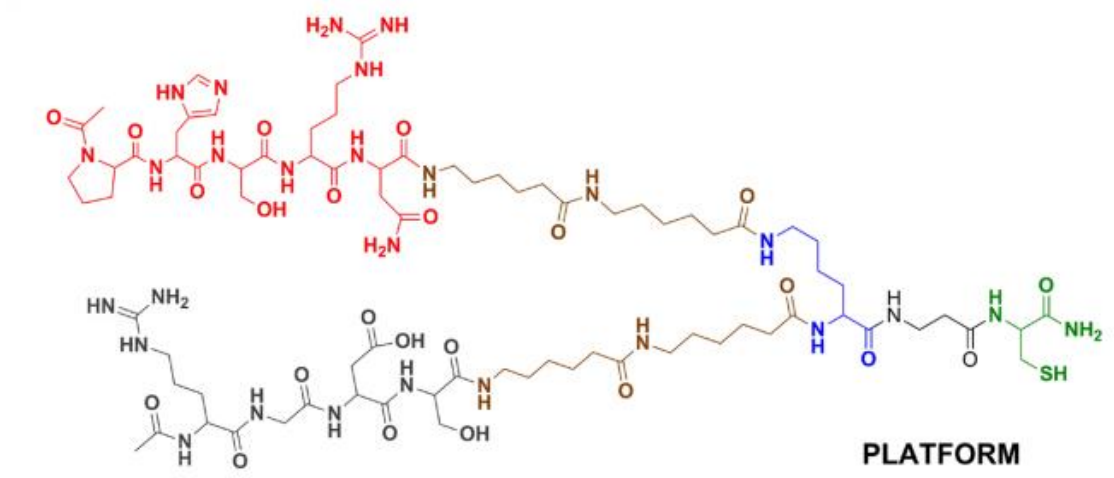


Figura 4: Representación de la plataforma

En la extremidad de la izquierda, se ven las dos secuencias: RGD (rojo) y PHSRN (gris). Después de estas secuencias, se observa la presencia de las unidades separadores (marrón), unidas a la lisina (azul), unida al grupo de anclaje (verde). [12]

La utilización de los dos motivos RGD y PHSRN en la forma de la plataforma, permite de controlar la disposición y la orientación de los dos motivos de manera química.

- Métodos de inmovilización de biomoléculas

Los equipos de investigación trabajan actualmente para desarrollar y mejorar las técnicas de funcionalización de biomateriales con péptidos, y más precisamente con péptidos con el motivo RGD.

Para funcionalizar la superficie con este motivo, los péptidos pueden ser depositados en el material mediante un proceso de adsorción física. Pero la unión de un péptido a una superficie mediante fisisorción se establece mediante interacciones débiles, como interacciones de Van der Waals o enlaces de hidrógeno, lo que no es suficiente para la estabilidad a largo plazo. [8]

Otra técnica utilizada con los péptidos es la unión covalente. Existen muchas técnicas para unir los péptidos a la superficie del material con enlaces covalentes. La que es usada en este proyecto es la silanización. La silanización consiste en la creación de una unión entre un material inorgánico (el titanio en este caso) y un material orgánico (un péptido en este caso). Es una reacción entre organosilanos funcionales y grupos hidroxilo (-OH) de la superficie, que genera una capa de silanos sobre la superficie.

Con este proceso de funcionalización, las propiedades superficiales del material van a ser mejoradas, el material se convierte en un material bioactivo. Estas cadenas de grupos funcionales son capaces de formar enlaces covalentes con varias moléculas, los péptidos en nuestro proyecto, lo que permite una interacción entre el material y el sistema biológico. Este proceso es presentado con mayor detalle en la parte Materiales y Métodos. [13]

2.3. Objetivos del proyecto

El objetivo de este proyecto es la caracterización fisicoquímica y biológica de un proceso de funcionalización del titanio para favorecer la osteointegración. En este proyecto, se ha llevado a cabo la biofuncionalización de muestras de titanio c.p. grado 2, gracias a una silanización y después una unión covalente con un péptido (CM15), más precisamente una plataforma que contiene dos secuencias de adhesión celular.

La primera etapa del proyecto es la biofuncionalización de muestras de titanio. Este proceso de se divide en cinco etapas:

- Activación
- Silanización
- *Cross linker*
- Biofuncionalización
- Recubrimiento con polietilenglicol

Estas etapas están descritas en la parte Materiales y Métodos.

La primera parte de este proyecto consiste en la caracterización fisicoquímica del proceso de funcionalización. Cada etapa del proceso está analizada con varias técnicas. Las técnicas utilizadas son:

- SEM – Microscopía electrónica de barrido
- Microscopía interferométrica
- Angulo de contacto
- AFM – Microscopía de fuerza atómica
- FTIR – Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
- XPS – Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X

La segunda parte del proyecto consiste en la caracterización biológica de las superficies. Con este objetivo, varios tipos de ensayos son realizados:

- Ensayos de adhesión
- Ensayos de proliferación
- Ensayos de diferenciación

3. Materiales y Métodos

En esta parte, se describen los materiales, así como los métodos utilizados durante este proyecto.

3.1. Obtención de las muestras

El titanio utilizado se presentaba como discos de 2 mm de espesor y 10 mm de diámetro, obtenido de barras de titanio c.p. de grado 2.

Estos discos fueron encastados en baquelita (5 muestras por baquelita) con la máquina (LaboPress 3 de marca Struers), con los siguientes parámetros:

- Fuerza de 15 kN
- Tiempo de calentamiento de 5 min a 180°C
- Tiempo de enfriamiento de 4 min a temperatura ambiente

Una vez puestos en baquelita, estos discos se pulieron hasta obtener una superficie lisa con un efecto de espejo. La pulidora utilizada era una pulidora automática (Phoenix 4000 de marca Buehler). Los paños utilizados eran de carburo de silicio (de marca Buehler).

Durante el proceso de pulido, varios paños fueron utilizados, con una diminución sucesiva del tamaño de grano desde un paño P800 a un paño P2500 (Grado europeo P). Después, se utilizaron dos soluciones con partículas de alumina de tamaño 1 µm y 0,05 µm en suspensión en agua milli-Q con un paño de terciopelo.

Las varias etapas del proceso de pulido son presentadas en la tabla 3:

Discos de pulido	rpm	F(N)	t(min)	Dirección	Agua
P800	300	10-15	15	><	sí
P1200	150	10-15	15	><	sí
P2500	150	10-15	20	><	sí
Al_2O_3 solución 1 µm	300	10-15	60	><	sí
Al_2O_3 solución 0,05 µm	300	10-15	60	><	sí

Tabla 3: Proceso de pulido

Con ayuda de una sierra y un destornillador, se quitaba los discos de titanio de la baquelita.

Antes de la funcionalización, las muestras fueron limpiadas en ultrasonidos con ciclohexano, isopropanol, agua destilada, etanol y acetona. La limpieza se realizaba tres veces con cada solvente durante dos minutos.

Las muestras fueron almacenadas secas y al vacío.

3.2. Funcionalización

3.2.1. Activación con acido nítrico (HNO_3)

Antes de silanizar, la primera etapa del proceso era la activación con acido nítrico (pasivación). Por eso, se utilizaba acido nítrico 65% (v/v) de marca Sigma-Aldrich.

La operación de activación era sencilla. Las muestras se dejaron una hora en un baño de acido nítrico dentro de una campana extractora.

Pasado este tiempo, se limpiaron tres veces las muestras con agua destilada, tres veces con etanol y tres veces con acetona. Finalmente se secaron con nitrógeno.

3.2.2. Silanización

Se introducieron las muestras en una matraz y se cerró con un tapón. Con una aguja y una bomba de vacío, se realizó el vacio. Después, con una aguja también, se introduce nitrógeno.

Se añadieron el solvente y después el silano, el solvente era el tolueno y el silano utlizado era (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) de marca Sigma-Aldrich. Se añadía:

- 10 mL de tolueno anhidro
- 0,2 mL de APTES.

Se dejaba la mezcla de reacción bajo agitación durante una hora a una temperatura de 70 °C.

Pasado este tiempo, se pusieron las muestras en un vaso con tolueno anhidro y se sonicaron durante 5 minutos.

Después, se limpiaron las muestras tres veces con tolueno, una vez con acetona, tres veces con isopropanol, tres veces con agua destilada, tres veces con etanol y tres veces con acetona. Finalmente se secaron con nitrógeno.

A continuación, se colocaron las muestras en una placa de Petri y se curaron durante 5 minutos en un horno a 120 °C.

3.2.3. Cross linker

Para preparar la solución de *cross linker*, se añadió a las muestras 10 mL de N-succinimidyl-3-maleimidopropionate (SMP) a una concentración de 2mg/mL en dimetilformamida (DMF). Los reactivos utilizados eran los dos de marca Sigma-Aldrich.

En un vaso de precipitados, se puso la solución de *cross linker* con las muestras y se dejó la mezcla de reacción bajo agitación durante una hora a temperatura ambiente, dentro de la campana.

Después de una hora, se limpiaron las muestras tres veces con DMF, una vez con acetona, tres veces con agua destilada, tres veces con etanol y tres veces con acetona. Finalmente se secaron con nitrógeno.

3.2.4. Funcionalización

Las biomoléculas se disolvieron en solución salina fosfatada (PBS) de pH de 6,5 con una concentración de 100 µM. 100 µL de esta solución se depositó sobre las muestras de titanio. Se dejaron las muestras con la biomolécula durante una noche a temperatura ambiente.

Las biomoléculas fueron sintetizadas en el laboratorio por Carles Mas, investigador del departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica (CMEM).

Después de la inmovilización del péptido, las muestras se limpiaron tres veces con PBS y se secaron con nitrógeno.

Para los ensayos celulares, otras biomoléculas (RGD, PHSRN) han sido utilizadas, todas a una concentración de 100 µM en una solución de PBS con un pH de 6,5 y cada vez una cantidad de 100 µL fue depositada en las muestras. La proteína de la ECM fibronectina (FN) se ha usado en todos los ensayos celulares como control positivo.

3.2.5. Recubrimiento con polietilenglicol

El polietilenglicol (PEG) se añade para evitar la adsorción inespecífica de proteínas o células en los ensayos biológicos. Su estructura es presentada en la figura 5:

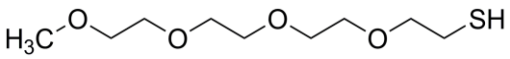


Figura 5: Representación de la molécula de PEG

El PEG se disolvió en PBS a una concentración de 500 µM. 100 µL de esta solución se depositó sobre las muestras de titanio. Se dejaba las muestras con el PEG durante 2 horas a temperatura ambiente.

Después de este proceso de funcionalización, las muestras fueron almacenadas secas y al vacío.

3.2.6. Representación del proceso

A continuación, se presentan en la figura 6 las etapas del proceso de funcionalización.

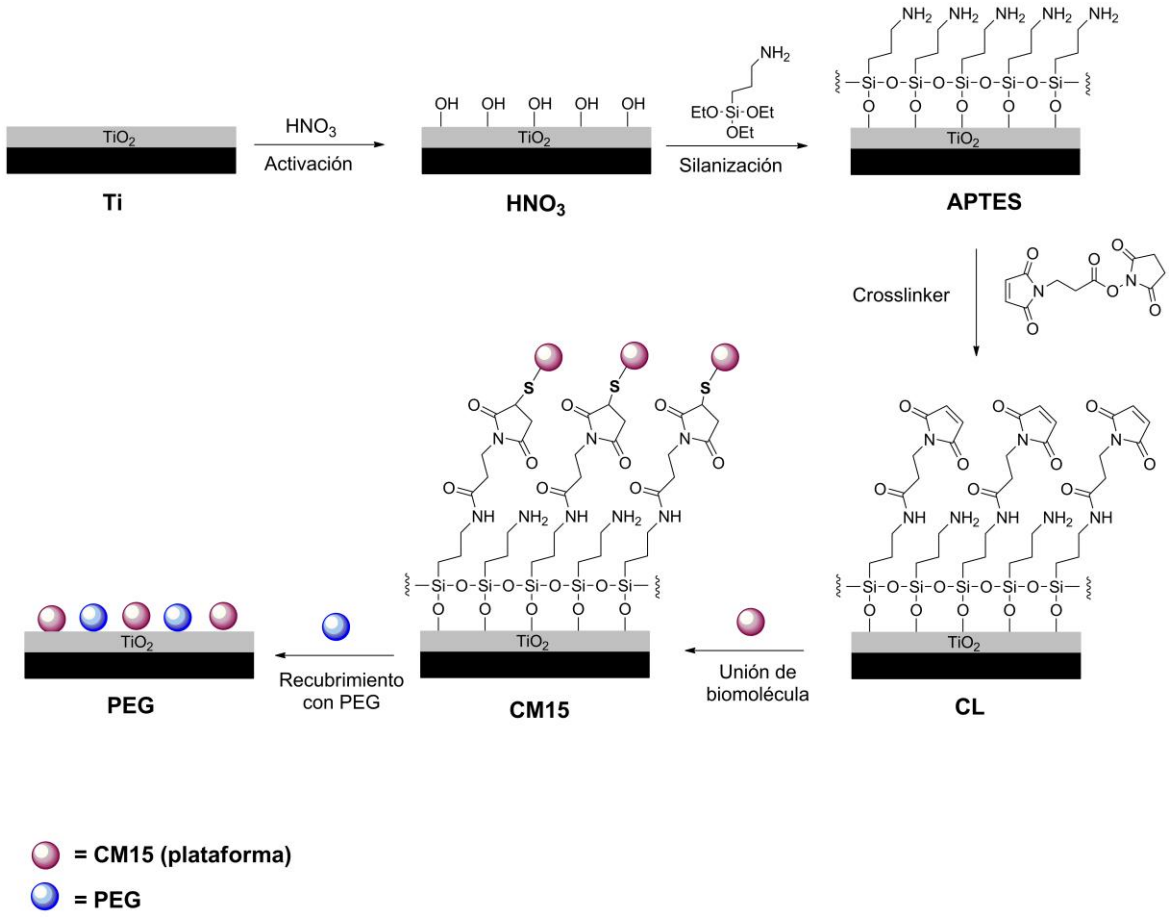


Figura 6: Etapas del proceso de biofuncionalización

3.3. Caracterización fisicoquímica de las superficies biofuncionalizadas

En esta parte, se describen los métodos utilizados para la caracterización fisicoquímica de las superficies. El objetivo era caracterizar cada etapa del proceso de biofuncionalización descrito antes.

Por eso, después de cada etapa del proceso de funcionalización (activación, silanización, *cross linker*, funcionalización), tres muestras fueron estudiadas.

Es decir que para cada técnica de caracterización, las siguientes muestras eran analizadas por triplicado:

- HNO_3 : muestras después de la activación
- APTES : muestras después de la reacción de silanización
- CL : muestras después de la reacción con el *cross linker*
- CM15 : muestras después de la funcionalización con el péptido CM15
- PEG : muestras después de la reacción de recubrimiento con PEG

Para algunas técnicas, muestras del material de partida, es decir muestra de titanio antes del proceso de pulido fueron analizadas. Estas muestras se utilizaron para el ángulo de contacto, la rugosidad, el SEM y el XPS.

Se utilizaron también muestras de titanio pulidas y limpias (pero sin tratamiento de activación) para el ángulo de contacto, el SEM y la rugosidad.

3.3.1. SEM - Microscopía electrónica de barrido

Esta técnica fue utilizada para visualizar la topografía de las muestras de titanio. El equipado utilizado para obtener imágenes de la superficie era el microscopio Focused Ion Beam Zeiss Neon 40 (figura 7). Los modos QBSD (Baskscattered Electron Detector) y SE2 (Secondary Electron) fueron utilizados.

Fue realizado también un análisis de espectroscopía de rayos X por energía dispersiva (EDS), para determinar los elementos químicos presentes en la superficie de las muestras con el software INCAPenta.

Una muestra de cada etapa del proceso de biofuncionalización fue analizada. En cada muestra, dos zonas como mínimo fueron analizadas.

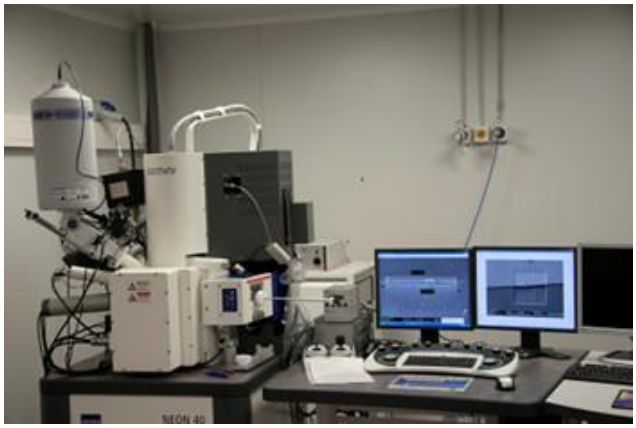


Figura 7: Microscopía electrónica de barrido

3.3.2. Microscopía interferométrica

La rugosidad de la superficie de las muestras de titanio fue determinada utilizando un microscopio interferométrico de luz blanca (Wyko 9300NT óptico láser, Veeco Instruments). Se realizó un análisis de datos con el software de WykoVision 4.10 (Veeco Instruments).

Los parámetros de rugosidad se midieron por triplicado para cada muestra. Para cada parámetro, se analizaron tres discos.

La técnica de medición utilizada era el Vertical Scanning Interferometry (VSI), porque algunas muestras eran rugosas.

3.3.3. Angulo de contacto

El equipo utilizado para medir el ángulo de contacto era el OCA 15 plus Contact Angle System, con el método del “sessile drop”. El software utilizado era SCA (Dataphysics Instruments GMBH), con la prueba de Laplace Young.

Tres muestras eran analizadas para cada condición. Tres medidas en cada muestra fueron realizadas. Los valores del ángulo de contacto representaban la media de nueve valores para cada condición.

Todas las medidas fueron realizadas a temperatura ambiente con dos líquidos distintos: agua milli-Q y diodometano. El volumen de la gota depositada era de 1 µL.

3.3.4. AFM – Microscopía de fuerza atómica

Esta técnica fue utilizada para visualizar la topografía de las muestras de titanio. El equipado utilizado para obtener imágenes de la superficie de titanio es el microscopio Dimension 3100 (VEECO Instruments). Se realizó un análisis de las imágenes con el software WSxM 11.2 (Nanotec Electronica).

La topografía de las muestras fue analizada con una punta piramidal, en modo de contacto intermitente “Tapping”.

Para cada parámetro, se tomaron imágenes en dos discos distintos. En cada disco, tres imágenes fueron realizadas.

3.3.5. XPS – Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X

El análisis de la composición elemental en superficie de las muestras, gracias al análisis de las energías de los electrones emitidos, fue realizado utilizando una plataforma de ultra alto vacio equipada con espectroscopio fotoelectrónico de rayos X (SPECS Surface Nano Analysis GmbH) (figura 8). Los resultados fueron analizados con el software CasaXPS.

Tres muestras en cada etapa del proceso y tres medidas en cada muestra fueron realizadas.

Figura 8: Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X

3.3.6. FTIR – Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

Esta técnica de espectrofotometría fue utilizada para hacer un análisis químico de las muestras funcionalizadas.

El equipado utilizado para analizar las muestras es un espectrómetro infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR Nicolet 6700) equipado con una fuente láser de He/Ne con el software OMNIC. El rango espectral es de 675 a 4000 cm^{-1}. Las medidas fueron realizadas en transmitancia, con 128 scans para cada espectro a una resolución de 4, y convertidas en absorbancia en esta memoría.

Tres muestras en cada etapa del proceso y tres medidas en cada muestra fueron realizadas.

3.4. Caracterización biológica de las superficies biofuncionalizadas

3.4.1. Cultivo de células

Los experimentos celulares se realizaron utilizando células madre mesenquimales humanas (hMSCs). Las células se cultivaban en medio Advanced DMEM (Sigma-Aldrich), suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS), 2% (v/v) de 4-(2-hisroxietil)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES buffer solución), 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina y 1% (v/v) de L-glutamina.

Las células se mantenían a 37 °C, en un ambiente humidificado con 5% (v/v) de CO_2. El medio de cultivo era cambiado dos veces por semana. Todos los experimentos se realizaron con células hMSCs en los pasajes entre 2 y 5.

3.4.2. Ensayo de adhesión celular

Para analizar el número y la propagación de las células sobre la superficie de titanio biofuncionalizada, ensayos de adhesión celular fueron realizados. Las muestras de titanio se pusieron en placas de 48 pocillos para realizar los experimentos. Todos los estudios celulares se hicieron usando tres muestras para cada condición.

Las células hMSCs fueron sembradas a una densidad de 7000 células por disco (14000 células/mL) con medio sin FBS. Después de 4 horas de incubación a 37 °C y con 5% (v/v) de CO_2, las muestras fueron limpias dos veces con PBS.

Después de este ensayo, se realizó la tinción de los núcleos, de las fibras de actina y de la vinculina para obtener informaciones sobre el número de células adheridas, la propagación de estas células y también sus contactos focales, mediante un proceso de inmunohistoquímica.

Para esto, la primera etapa era la fijación de las células, durante 30 minutos con 4% (w/v) de paraformaldehido (PFA) en PBS. Las células fueron permeabilizadas con 500 µL por disco de 0,05% (w/v) de Triton en PBS durante 15 minutos. Después, para el paso de bloqueo, una solución de 1% (w/v) de BSA en PBS fue puesta durante 30 minutos.

Después, se ponía 100 µL por disco de anticuerpo primario anti-vinculina de ratón (1:100 en 1% (w/v) de BSA en PBS). Se incubaron durante 1 hora. El anticuerpo secundario: anti-mouse Alexa 488 (1:2000) y el phalloidin Alexa 546 (1:300) en triton 0,05% (w/v) en PBS se incubaron en las muestras (gotas de 100 µL por disco) durante 1 hora. A partir de este paso, todas las etapas se desarrollan en la oscuridad, para evitar la descomposición de la fluorescencia. Para teñir los núcleos, se añadía 500 µL por disco de DAPI (1:1000) en PBS-Gly durante 2 minutos en la oscuridad. Todos los lavados intermedios se realizaron con PBS-Gly (20 mM de Gly) durante 5 minutos.

Al final, los discos de titanio fueron montados en láminas portaobjetos, para analizarlos por microscopía de fluorescencia (Nikon E600). El número y la extensión de las células unidas en la superficie se evaluaron con el software ImageJ. El número de células se calculaba contando los núcleos celulares, en las tres repeticiones para cada condición. La extensión de las células se calculaba con por lo menos 10 células para cada muestra y con el promedio para las tres muestras de cada condición.

3.4.3. Ensayo de proliferación celular

Para determinar la proliferación de células hMSCs en superficies de titanio funcionalizadas, 5000 células fueron sembradas en cada muestra (4000 células/mL) y se incubaron en medio de cultivo sin FBS a 37 °C con 5% (v/v) de CO_2. Después de 4 horas de incubación, el medio sin FBS se sustituye por un medio con 10% (v/v) de FBS.

Durante el ensayo, se cambió el medio dos veces a la semana. Después de 4 y 8 días, el número de células fue calculado con Alamar Blue.

Para esto, 350 µL de una solución de 10% (v/v) de Alamar Blue con medio completo (con 10% (v/v) de FBS) fue añadida a las muestras. Después de una hora de incubación, 100 µL de la solución de cada muestra fue recogida y puesta en una placa de 96 pocillos. Esta operación se realizó tres veces para cada muestra de la placa de 48 pocillos (cada muestra de titanio correspondía a 3 pocillos en la placa de 96 pocillos).

La fluorescencia de esta placa de 96 pocillos fue leída con un lector de placa (Infinite M200 PRO) a 560 nm para la longitud de onda en excitación y 590 nm para la emisión, con un aumento de 50.

Para convertir la lectura de fluorescencia del Alamar Blue en el número de células, se aplicó una curva estándar de concentraciones, realizada el primer día del experimento en una otra placa.

3.4.4. Ensayo de diferenciación celular

Para determinar la diferenciación de células hMSCs en superficies de titanio funcionalizadas, 2000 células fueron sembradas en cada muestra (4000 células/mL) y se incubaron en un medio de cultivo sin FBS a 37 °C con 5% (v/v) de CO_2. Después de 4 horas de incubación, el medio sin FBS se sustituye por un medio de cultivo diferente para cada placa. Los dos medios de cultivo diferentes son un medio basal (medio común describido en la parte 3.4.1.) y un medio osteogénico. El medio osteogénico se compone de medio Advanced DMEM (Sigma-Aldrich), suplementado con 10% (v/v) de FBS, 2% (v/v) de HEPES buffer solución, 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina y 1% (v/v) de L-glutamina, 1% (v/v) de ácido ascórbico, 1% (v/v) de B-glicerofosfato y de 0,02% (v/v) de dexamethasona.

Durante el ensayo, se cambió el medio dos veces a la semana. Después de 21 días, la diferenciación celular se evaluó con el ensayo Alizarin Red.

Para esto, después de un ensayo de Alamar Blue para cuantificar las células, las células fueron fijadas con 4% (v/v) de PFA en PBS durante 15 minutos. Después de dos limpiezas con agua Milli-Q, 0,5 mL de Alizarin Red solución 40 mM fueron puesto en las muestras. Las placas se incubaron durante 20 minutos con un poco de agitación.

La tinción no incorporada fue aspirada, y las muestras fueron limpiadas 2 veces con agua Milli-Q agitando las placas. 300 µL de cetylpyridinium chloride buffer (CPC) se añadieron durante 30 minutos para extraer la tinción.

100 µL de esta solución se transfirieron en una placa de 96 pocillos, haciendo triplicado para cada muestra de la placa de 48 pocillos. La absorbencia de esta placa de 96 pocillos fue leída con un lector de placa (Infinite M200 PRO) a una longitud de onda de 570 nm.

4. Resultados y discusión

4.1. Caracterización fisicoquímica de las superficies durante el proceso de biofuncionalización

En esta parte, se presentan los resultados de la caracterización fisicoquímica del proceso de funcionalización del titanio con el péptido CM15.

Cada etapa del proceso (activación, silanización, *cross linker*, péptido y recubrimiento con el PEG) está analizada con varias técnicas tal y como se ha descrito anteriormente en la sección de Materiales y Métodos.

4.1.1. SEM – Microscopía electrónica de barrido

Se utiliza la microscopia electrónica de barrido para obtener imágenes de la topografía de la superficie en las etapas del proceso de funcionalización. Se obtiene informaciones sobre la evolución de la rugosidad de las superficies de titanio a lo largo de los tratamientos.

En primer lugar, las muestras del material de partido, muestras de titanio antes del proceso de pulido, son analizadas con varias magnificaciones.

4.1.1.1. No pulido

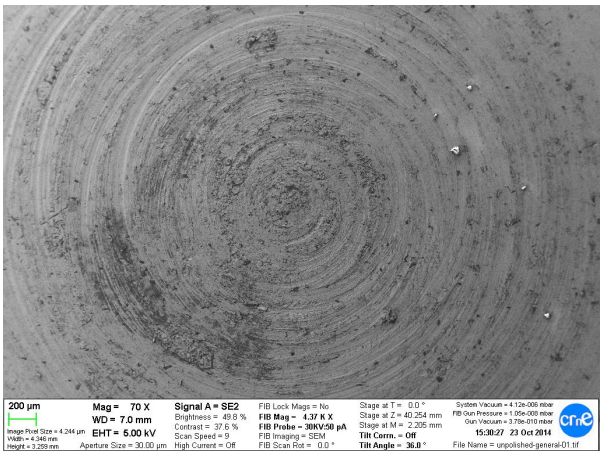


Figura 9: Visión general de la muestra “no pulido”, Magnificación X70

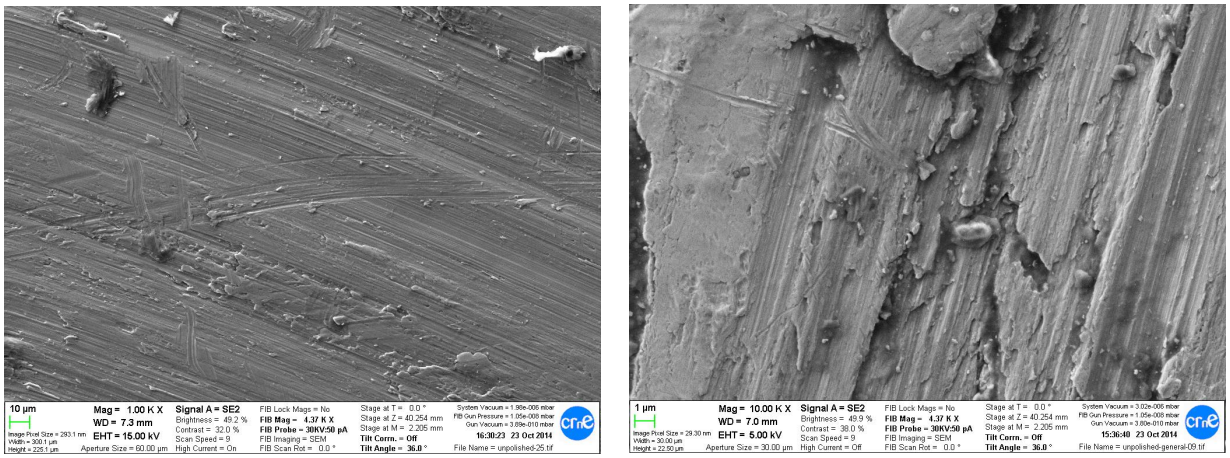


Figura 10: Muestra "no pulido”, Izquierda: Magnificación X1000,
Derecha: Magnificación X10000

Antes de ser pulida, la superficie de las muestras es muy irregular. En la figura 9, se observan las rayas en forma de círculos concéntricos, que vienen del proceso de corte de las muestras. En las figuras 9 y 10, se observan rayas de corte también. En estas tres imágenes, se ve la presencia de suciedad y de impurezas.

4.1.1.2. Pulido

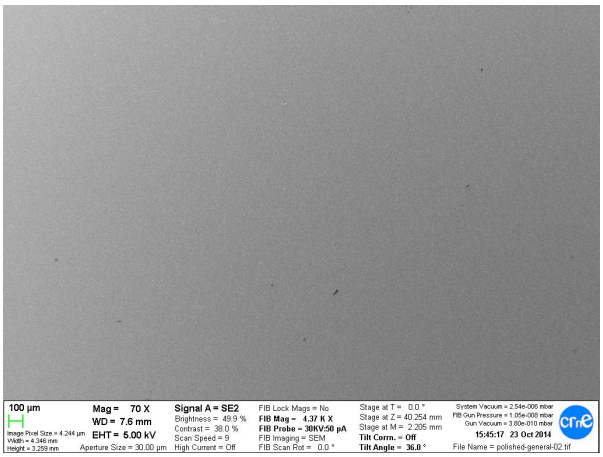


Figura 11: Visión general de la muestra “pulido”, Magnificación X70

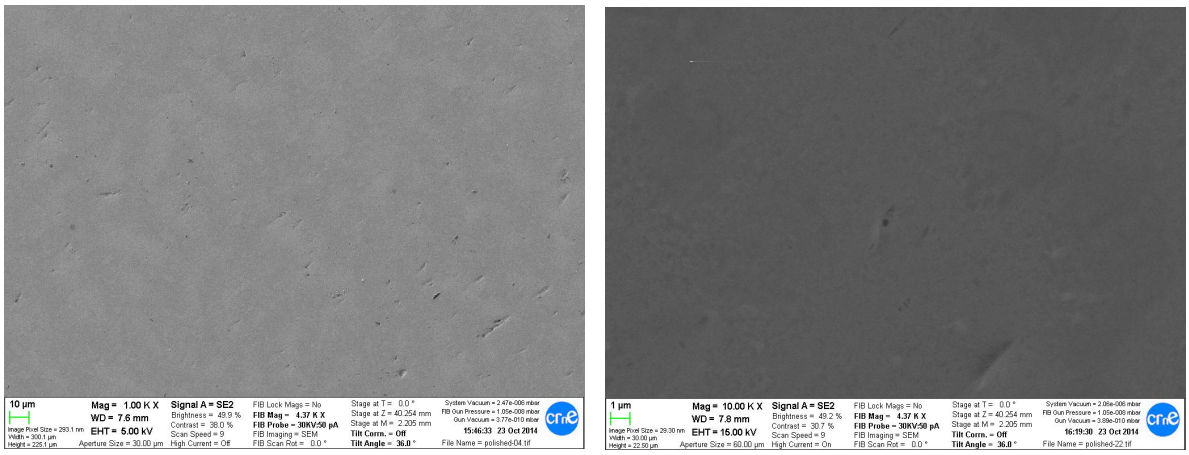


Figura 12: Muestra pulido”, Izquierda: Magnificación X1000, Derecha: Magnificación X10000

Después del proceso de pulido, las superficies parecen más lisas. Se puede distinguir pequeñas rayas en la figura 12, debidas al proceso del pulido. Se observan también contaminaciones con la forma de pequeñas incrustaciones. Entre las dos magnificaciones, de 1000 y de 10000 no se ven cambios.

A continuación, un estudio de la composición química de estas contaminaciones es realizada con un análisis EDS.

4.1.1.3. Otros pasos

En las etapas siguientes del proceso de funcionalización, es decir en las muestras APTES, CL, CM15 y PEG, se obtienen imágenes similares a las imágenes obtenidas con la muestra “pulido”. Es decir que se ve también una superficie lisa, con algunas rayas y un poco de suciedad, a las dos magnificaciones de 1000 y de 10000.

La silanización y después la funcionalización se realiza con moléculas muy pequeñas, que son indistinguibles en las imágenes del SEM.

Se puede concluir que el proceso de funcionalización no modifica la topografía de las muestras.

4.1.1.4. Análisis EDS

El análisis EDS permite, en este proyecto, determinar la composición química de las partículas de contaminaciones. Este análisis es un análisis cualitativo de los elementos químicos presentes a la superficie de las muestras.

Las moléculas utilizadas para funcionalizar el titanio (molécula de APTES, de CL, de CM15 y de PEG) son tan pequeñas que el software no puede reconocer estas moléculas en la superficie del titanio.

A continuación, se presentan varios espectros de análisis EDS, con varios tipos de contaminaciones. En efecto, en muestras de todos los pasos del proceso, el software detecta varios elementos químicos a la superficie. Estos espectros dan una idea de las contaminaciones posibles.

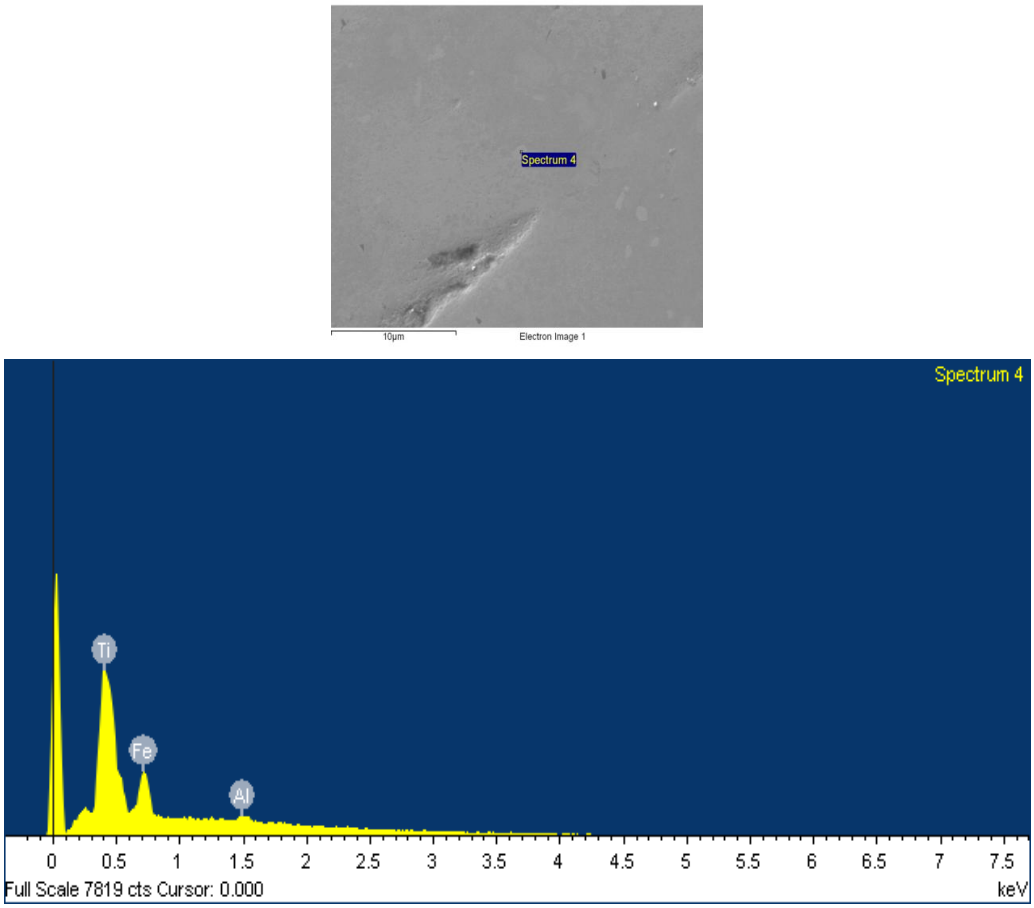
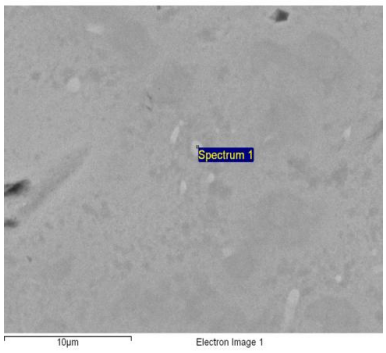


Figura 13: Muestra “pulido” Arriba: Imagen SEM, Magnificación X10000, Abajo: Espectro EDS

En el espectro EDS de la muestra “pulida” de la figura 13, se nota la presencia de residuos de hierro y de aluminio.

El aluminio viene probablemente del proceso de pulido. En efecto, se utiliza discos de carburo de silicio para las primeras etapas y después partículas de alúmina (partículas de 1 µm y 0,05 µm de diámetro). Las partículas de alúmina son muy finas, no podemos verlas en las imágenes.

En cuanto al hierro, está incrustado en el titanio, forma parte del material de partida. En este proyecto, titanio c.p. de grado 2 es utilizado, es decir que este titanio tiene como máximo un 0.30 % en peso de hierro, en teoría. En los análisis EDS, parece que se detecta una cantidad significativa de hierro. Sin embargo, el hecho que este análisis es únicamente cualitativo no nos permite sacar más conclusiones.



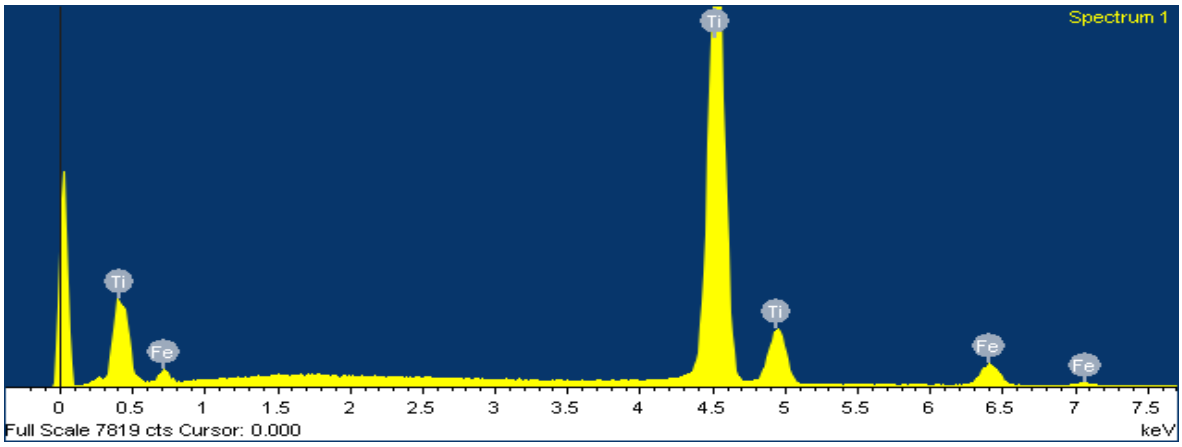


Figura 14: Muestra HNO_3 Arriba: Imagen SEM, Magnificación X10000, Abajo: Espectro EDS

En la figura 14, en la imagen de la muestra HNO_3, el punto “spectrum 1”, se ve una mancha blanca. En el espectro EDS de este punto, se observa un pico de hierro. Como en el análisis EDS precedente, este hierro viene del material de partida. El número atómico del hierro es 26, el del titanio es 22, el hierro es más pesado que el titanio, entonces aparece blanco en las imágenes.

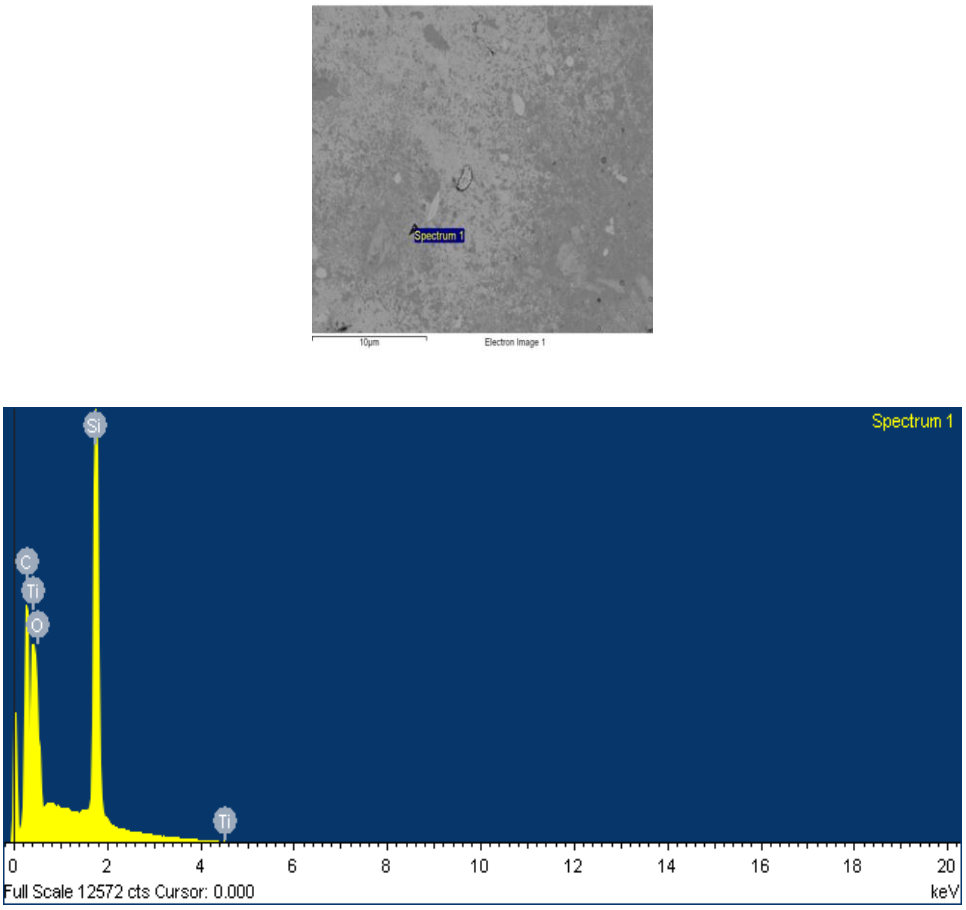


Figura 15: Muestra APTES Arriba: Imagen SEM, Magnificación X10000, Abajo: Espectro EDS

En la figura 15, en la imagen de una muestra de APTES, se ve una mancha negra. Con el espectro EDS, se puede afirmar que corresponde al elemento silicio. El número atómico del titanio es 22, el del silicio es 14, el silicio es más ligero que el titanio y por eso aparece en negro.

Los residuos de silicio vienen probablemente del proceso de pulido, discos de carburo de silicio son utilizados al principio de este proceso. El carbono resulta probablemente de una contaminación orgánica.

La sensibilidad de esta técnica no indica si se realiza un cambio de la rugosidad después de la etapa de activación (en las etapas de silanización y de funcionalización). Para medir este cambio de rugosidad, se utilizará la microscopia interferométrica.

- ➔ El proceso de pulido reduce la rugosidad y los defectos de las muestras, haciéndolas más lisas y homogéneas.

- ➔ Aunque las muestras son limpias después de este proceso de pulido, se observan contaminaciones de silicio y de alúmina en las superficies en todos los pasos.

- ➔ La microscopia electrónica de barrido no permite visualizar cambios en la topografía de la superficie del titanio en los pasos de silanización y de funcionalización.

4.1.2. Microscopía interferométrica

Se utiliza la microscopia interferométrica para medir la rugosidad de las superficies de titanio a lo largo del proceso de funcionalización.

Para esta técnica de caracterización, los valores de los parámetros de rugosidad son obtenidos con el promedio de nueve valores. Por eso, tres muestras de cada condición fueron analizadas, y las medidas de rugosidad fueron realizadas en tres zonas diferentes de cada muestra. Se obtienen los resultados de la tabla 4:

Muestra	Ra (nm)	Rq (nm)
No pulido	729,34 ± 178,01	887,67 ± 204,37
Pulido	28,82 ± 11,28	37,8 ± 14,38
HNO_3	21,27 ± 5,93	30,23 ± 8,86
APTES	30,57 ± 9,77	42,33 ± 12,93
CL	26,06 ± 5,64	36,68 ± 8,08
CM15	27,48 ± 5,75	40,7 ± 7,77
PEG	28,77 ± 5,18	44,21 ± 9,73

Tabla 4: Resumen de los datos de rugosidad

El parámetro Ra corresponde a la desviación media aritmética del perfil de rugosidad. Este parámetro expresa la rugosidad de las superficies. [14]

El parámetro Rq representa la raíz cuadrada media desviación del perfil de rugosidad. En estadística, equivale a la desviación estándar σ. [14]

Los resultados obtenidos con la interferometría presentados en la tabla 4 muestran claramente que el pulido de las muestras reduce significantemente la rugosidad de la muestra. La rugosidad media (caracterizada por el parámetro Ra), que era de 729,34 nm antes del proceso de pulido, pasa a 28,82 nm después de este proceso.

Este análisis revela también que la rugosidad de las muestras de titanio no se modifica durante el proceso de funcionalización. La rugosidad es relativamente constante para todos los pasos desde el "pulido" hasta el final del proceso, con valores del parámetro Ra sobre 20 o 30 nm. Se puede concluir que el proceso de funcionalización no cambia la rugosidad de las superficies.

La topografía (es decir la rugosidad) de las superficies ha sido descrita de tener una gran influencia en la adhesión de células. [15] [16] Todas las superficies de los pasos de biofuncionalización analizadas en este proyecto muestran valores comparables de rugosidad, lo que indica que las diferencias en el comportamiento de las células en estas superficies puede ser atribuido a la biofuncionalidad de las moléculas depositadas, y no a la rugosidad de las superficies.

El análisis de rugosidad de superficies con la microscopia interferométrica presenta los mismos resultados que el análisis con la microscopia electrónica de barrido (SEM), presentando un cambio en la topografía con el proceso de pulido, pero ningún cambio en la topografía en los otros pasos del proceso de biofuncionalización.

- ➔ El proceso de pulido afecta la superficie de las muestras, disminuyendo la rugosidad.

- ➔ La rugosidad de las superficies no cambia durante el proceso de funcionalización, en todas las etapas el parámetro Ra se queda constante.

4.1.3. Angulo de contacto

Se puede definir el ángulo de contacto como el ángulo formado por la superficie de un líquido al entrar en contacto con un sólido. Todas las superficies tienen una determinada afinidad por el agua, se llama la mojabilidad. Hay superficies que se mojan fácilmente cuando entran en contacto con el agua, mientras que otras tienen más dificultades para mojarse.

Con los diferentes tratamientos de biofuncionalización, la mojabilidad de la superficie del titanio cambia. Una manera de entender la variación de las propiedades fisicoquímicas de su superficie es de estudiar las variaciones del ángulo de contacto en cada uno de los pasos realizados. Este valor de ángulo de contacto es definido por la composición química de la superficie de un material, pero las propiedades físicas y la topografía de la superficie pueden hacer variar este valor. [17] [18]

Los resultados obtenidos son presentados en la figura 16:

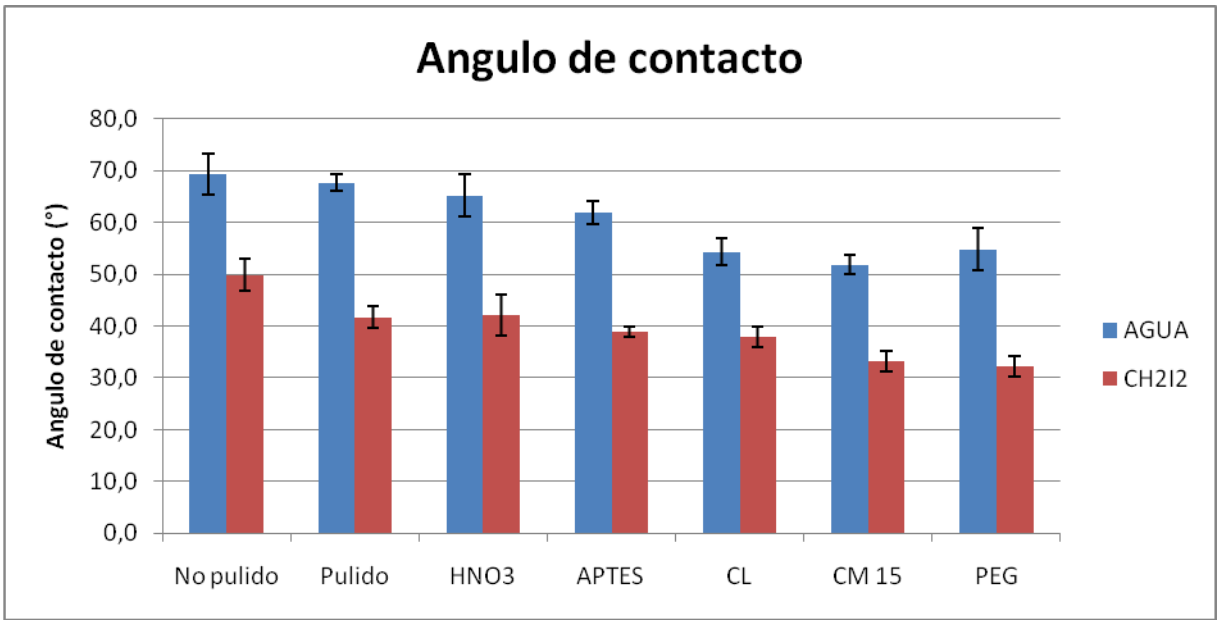


Figura 16: Angulo de contacto en los varios pasos del proceso de biofuncionalización

El ángulo de contacto va disminuyendo con los varios tratamientos. Y disminuye con los dos líquidos utilizados: agua y diiodometano (CH_2I_2). Entonces, a partir de las medidas de ángulo de contacto con agua, podemos concluir que a lo largo del proceso de funcionalización la superficie del titanio se vuelve más y más hidrófila.

El proceso de pulido hace disminuir ligeramente el ángulo de contacto. Es normal, porque después del proceso de pulido, la superficie del titanio es más lisa y no tiene irregularidades (suciedad, polvo…), la gota de agua puede propagarse más fácilmente por la superficie.

El proceso de activación con acido nítrico hace disminuir el valor del ángulo de contacto también. En efecto, la activación permite la creación de grupos hidroxilos en la superficie. El agua presenta una afinidad por estos grupos, entonces la superficie es más hidrófila, la gota de líquido presenta un ángulo de contacto menor.

La silanización ha introducido grupos silanos en la superficie del titanio, estos grupos son hidrofóbicos. En teoría, la superficie es más hidrofóbica y el ángulo de contacto tendría que aumentar. Pero en nuestro caso, el ángulo de contacto disminuye, es decir que la superficie es más hidrófila. Esto puede ser causado por los grupos amino de los silanos que pueden dotar la superficie de un carácter más polar.

Al poner el *cross linker*, la afinidad de la superficie con el agua aumenta, la muestra es más hidrófila y entonces el ángulo de contacto disminuye.

La inmovilización del péptido provoca una disminución del valor del ángulo de contacto. En efecto, el péptido utilizado contiene el motivo RGD que es un motivo hidrófilo. Con este péptido, la superficie es más hidrófila.

La única excepción es al poner el PEG ya que el ángulo de contacto aumenta, lo que significa que la superficie se vuelve más hidrofóbica. Una explicación posible seria a propósito de la estructura de la molécula de PEG, es hidrófila pero el grupo $-CH_3$ de su extremidad, que queda expuesto en la superficie, es hidrófobo (ver figura 16 para más detallas).

Etas diferencias en los valores de la mojabilidad son indicadores de las modificaciones sufridas por las superficies a lo largo del proceso de biofuncionalización.

Con los valores del ángulo de contacto de los dos líquidos, se puede calcular la energía superficial del material (figura 17). El software utiliza la ecuación de Young-Laplace, esta ecuación relaciona las tensiones de interface en un punto donde las tres fases (sólido, vapor, líquido) están en contacto. La energía superficial de una superficie tiene una gran influencia en la adhesión celular y la adsorción de proteínas cuando el implante es insertado en el cuerpo. [19] [20]

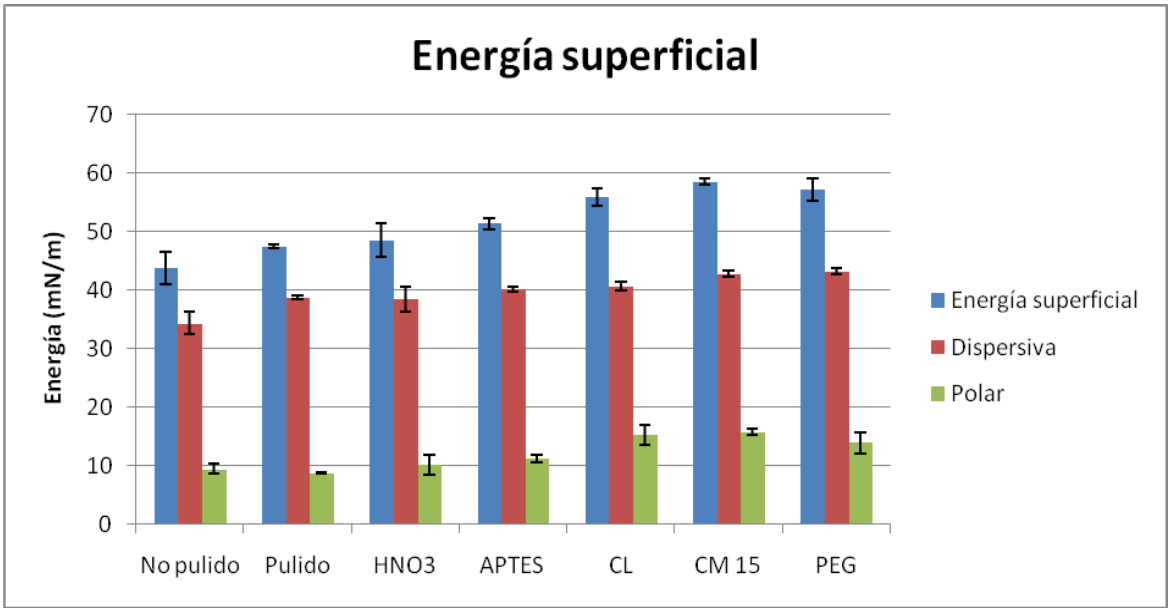


Figura 17: Energía superficial en los varios pasos del proceso de biofuncionalización

La energía superficial va aumentando con los varios tratamientos. Es lógico porque los valores de energía superficial son calculados con valores del ángulo de contacto.

La única excepción es entre el CM15 y el PEG, la energía disminuye pero parece normal porque el ángulo de contacto disminuye.

La energía superficial está dividida en dos componentes: la energía polar (σ_p) y la energía dispersiva (σ_d). Es decir que las interacciones se dividen entre las interacciones polares y las otras ("dispersivas"). La polaridad depende de las diferencia de electronegatividad entre los átomos que forman un enlace. Cuando en un enlace químico la diferencia de electronegatividad entre los dos átomos es grande, los electrones tienen tendencia a ser captados con más fuerza por uno de los dos átomos.

La componente polar es proporcional a la hidrofilicidad. Es decir que, cuando la componente polar aumenta, la hidrofilicidad de la superficie aumenta, la superficie es más hidrofilica.

En la figura 17, se ve que la componente polar aumenta con los pasos (excepto con el PEG). Es decir que el aumento en la hidrofilicidad de las muestras observado con el ángulo de contacto a lo largo de los tratamientos, se verifica también con la energía superficial.

- ➔ El proceso de biofuncionalización provoca un aumento del carácter hidrófilico de las superficies de titanio, excepto para la última etapa de PEG.

- ➔ En relación con esta mojabilidad, la energía superficial de las superficies aumenta con los varios tratamientos de funcionalización (excepto para el PEG).

- ➔ Esta técnica permite ver modificaciones de la superficie durante el proceso de funcionalización.

4.1.4. AFM – Microscopía de fuerza atómica

Se utiliza la microscopía de fuerza atómica para obtener imágenes de la topografía de la superficie.

Se obtienen tres imágenes:

- Una imagen de topografía (unidades en nm)
- Una imagen de error (unidades en mV)
- Una imagen de fase (unidades en grado)

En este proyecto, se utiliza la primera imagen para visualizar la topografía de la superficie y hacer perfiles de la superficie. La segunda imagen permite “visualizar” en tres dimensiones la topografía de la superficie, con relieve. La tercera imagen permite ver los cambios de fase, por ejemplo ver la existencia de dos materiales sobre la superficie.

4.1.4.1. HNO_3

En primer lugar, nos centramos en el proceso de activación con acido nítrico. Se realiza este estudio en dos muestras diferentes, con tres imágenes en cada disco. Para estas muestras, todas las imágenes obtenidas son parecidas.

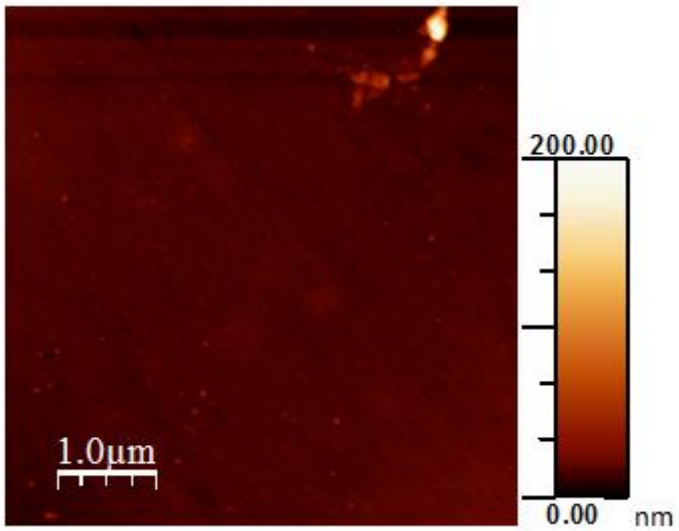


Figura 18: Topografía de la muestra HNO_3

En la figura 18, se ve una superficie lisa, con una altura de relieve muy pequeña. Las pequeñas partículas un poco más claras son suciedades, aunque las muestras se limpiaron después de los procesos de pulido, puede ser suciedades del pulido. La mancha clara arriba a la derecha es una mancha de suciedad también.

Además, en esta imagen como en todas las imágenes de las superficies de todos los pasos, se observan valles, que son rayas del proceso de pulido del titanio.

Con el software WS ×M, se puede realizar un perfil de la superficie, se ve en la figura 19:

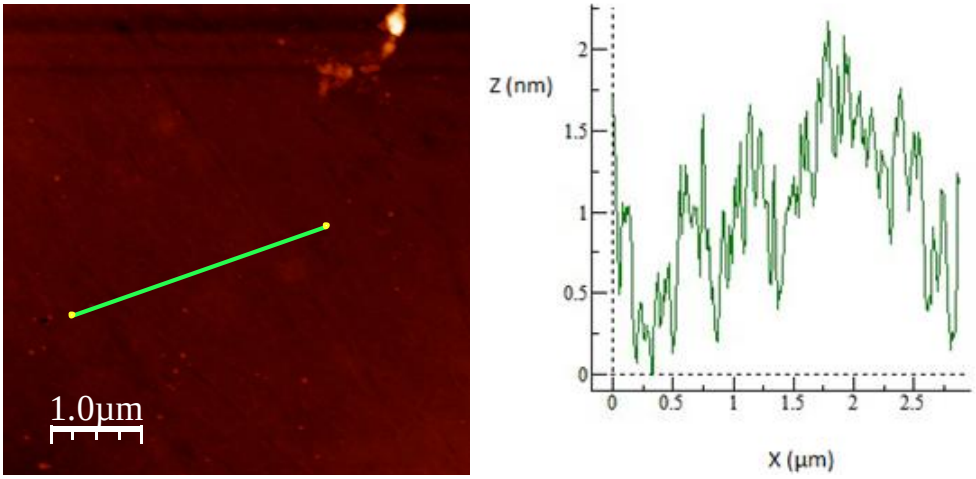


Figura 19: Perfil de la muestra HNO_3

En el perfil, se ve una altura de relieve mediana entre 0,5 nm y 2 nm, que se corresponde con una topografía lisa, no rugosa. Esto se puede relacionar con las imágenes de microscopía interferométrica y del SEM.

Es posible ver esta topografía en la imagen de error también a la izquierda de la figura 20:

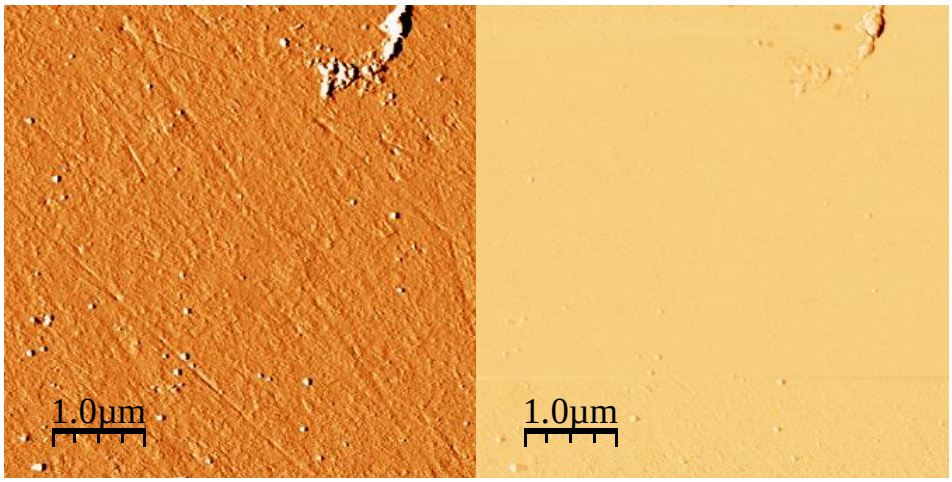


Figura 20: Izquierda: Imagen de error de la muestra HNO_3
Derecha: Imagen de fase de la muestra HNO_3

A la izquierda, se ve la representación de la topografía. Se ven todavía las rayas del proceso de pulido, pequeñas partículas de suciedad y la mancha de suciedad.

A la derecha, es la imagen de fase. En esta imagen, se ve solo un único color, una única fase, que corresponde a la superficie de titanio.

4.1.4.2. APTES

Después de silanizar con APTES, aparecen cambios drásticos en las imágenes.

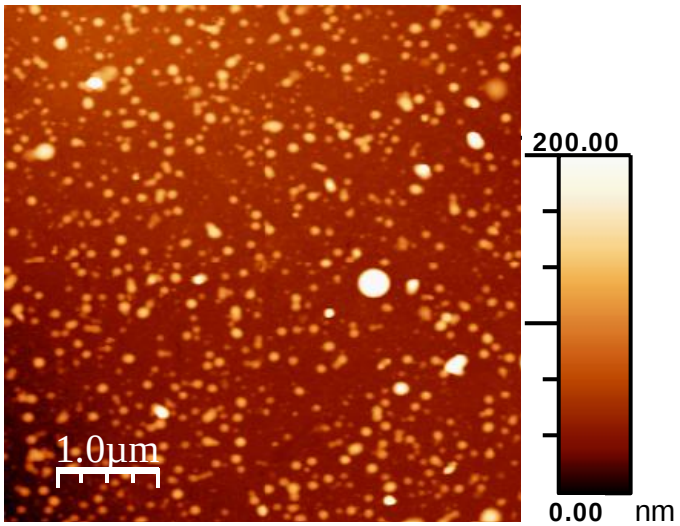


Figura 21: Topografía de la muestra APTES

En todas las imágenes de topografía de las muestras después de la silanización, se observan aglomeraciones que se atribuyen al silano, en forma de pequeñas partículas de geométrica esférica más claras (figura 21). El tamaño de estas partículas es irregular. Además, el AFM es una técnica muy local, sólo se miden pequeñas áreas, una zona de 5 µm por 5 µm aquí.

Pero, en las seis imágenes tomadas en muestras silanizadas (en dos muestras diferentes), se observa la misma topografía y la misma distribución de las esferas. Para medir la altura de estos agregados, un perfil es realizado en la figura 22:

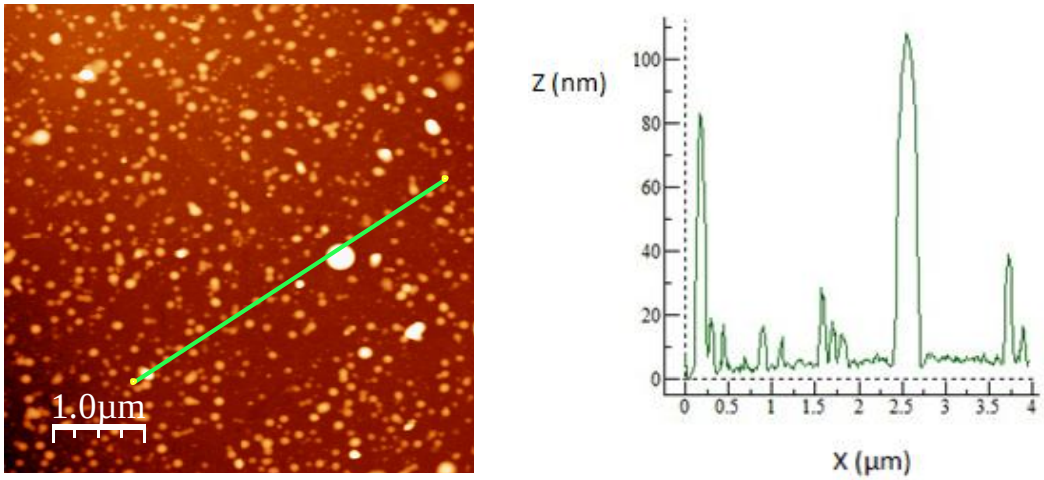


Figura 22: Perfil de la muestra APTES

Con el perfil, se observa la altura de las partículas. La partícula más grande (a la derecha) tiene una altura de sobre 110 nm. Para las otras esferas, se ve en el perfil una altura de las aglomeraciones mediana de unos 20 nm. En las zonas donde no hay agregados, que aparecen en rojo en la imagen, la altura es muy baja, menos de 5 nm, lo que corresponde al perfil realizado en la muestra de HNO_3 (figura 19).

El perfil muestra un tamaño irregular de las bolas. Estas alturas pueden indicar la formación de multicapas de silano (polimerización vertical) en algunos puntos de la superficie.

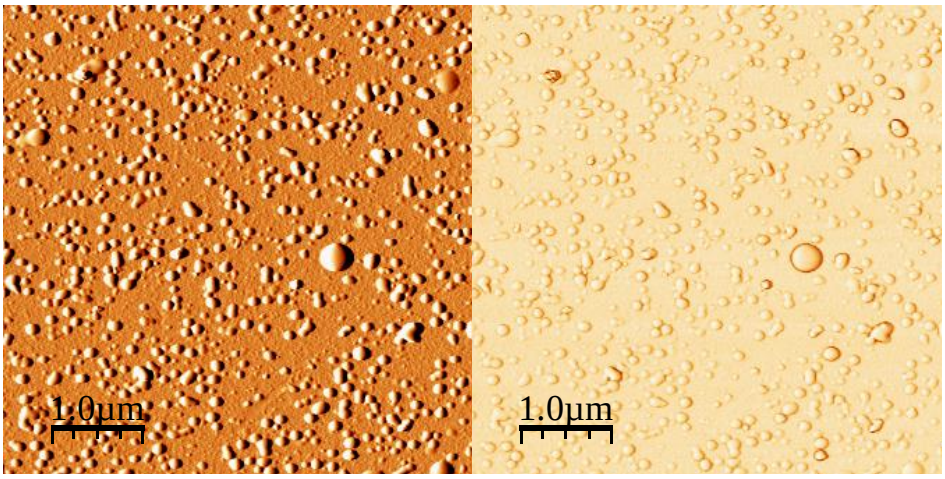


Figura 23: Izquierda: Imagen de error de la muestra APTES
Derecha: Imagen de fase de la muestra APTES

La imagen de la izquierda de la figura 23 representa la topografía en relieve. Las partículas de APTES se ven de forma distinta. Se nota también la gran diversidad de tamaño de estas aglomeraciones. A la derecha, la imagen de fase permite de verificar la presencia de APTES, en efecto, agregados de otra fase aparecen entre la imagen de fase del HNO_3 y esta imagen.

4.1.4.3. Otros pasos

Para los otros pasos del proceso de funcionalización, es decir las etapas de *cross linker*, péptido y PEG, no se ve cambios en las imágenes. Las imágenes obtenidas con estas muestras son muy parecidas a las imágenes del APTES, con aglomeraciones de varios tamaños.

El *cross linker* se une al APTES (mediante los grupos $–NH_2$), y no directamente a la superficie del titanio. Lo mismo ocurre en los pasos siguientes, la plataforma se engancha al *cross linker* y el PEG al CM15.

Estas moléculas (*cross linker*, CM15 y PEG) tienen un tamaño muy pequeño, entonces no se pueden detectar cambios en los perfiles de las imágenes de topografía.

- ➔ La etapa de silanización modifica la topografía de la superficie de las muestras, provocando una formación de aglomeraciones de silano, en forma de partículas de geométrica esférica en la superficie.

- ➔ Los cambios de topografía debidos a los otros pasos del proceso de biofuncionalización no se observan en las superficies con la microscopia de fuerza atómica, probablemente porque las moléculas utilizadas son demasiados pequeñas.

- ➔ Esta técnica es una buena técnica para detectar la presencia de silanos en la superficie del titanio.

4.1.5. XPS - Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X

Las superficies de las muestras de titanio han sido también caracterizadas con un análisis XPS, para detectar cambios en la composición química de las superficies a lo largo de las etapas del proceso de funcionalización. Los resultados son presentados en la tabla 5:

Muestra	%at conc	C	N	O	Si	S	Ti
Ti pulido	Promedio	26,75	0,79	57,24	0,15	0,01	15,06
	DE	0,75	0,32	1,36	0,04	0,01	0,8
HNO_3	Promedio	24,29	0,61	55,07	0,14	0,00	19,9
	DE	4,88	0,05	3,34	0,09	0,01	1,52
APTES	Promedio	33,84	5,25	42,24	7,17	0,01	11,49
	DE	3,61	0,62	3,39	1,07	0,01	1,91
CL	Promedio	43,77	6,1	35,7	7,03	0,00	7,4
	DE	6,52	1,2	6,12	1,74	0,00	3,3
CM15	Promedio	42,78	7,84	38,08	5,06	0,16	6,1
	DE	1,14	0,25	1,22	1,17	0,08	1,24
CM15 (S)	Promedio	44,75	7,64	35,31	4,78	0,19	7,33
	DE	3,47	0,24	2,48	0,65	0,03	1,58
PEG	Promedio	45,28	7,45	35,28	5,4	0,15	6,43
	DE	3,4	0,39	2,77	1,21	0,02	2,19

Tabla 5: Resumen de los resultados del XPS en %at. concentración (DE: Desviación estándar, (S): Tratamiento de 30 minutos en ultrasonidos)

Las muestras de titanio pulido y de HNO_3 presentan señales correspondientes a átomos de carbono, nitrógeno, oxigeno, silicio y titanio. La presencia de átomos de titanio y oxigeno proviene de la capa de dióxido de titanio. La presencia de carbono es atribuida a varios contaminantes orgánicos. La pequeña cantidad de nitrógeno es también debida a contaminación. Los átomos de silicio presentes en estas muestras son residuos del proceso de pulido. La presencia de estas contaminaciones de carbono, nitrógeno y silicio hace que los porcentajes de estos átomos en los pasos siguientes se deben tomar con precaución.

La deposición de una capa de molécula reduce la capacidad de detección del TiO_2 por el XPS. En efecto, se ve una reducción del porcentaje de titanio a lo largo del proceso, es decir a lo largo de la formación de capas (de silano, de *cross linker*, de péptido y de PEG), excepto para el CM15 ultrasonicado.

En cuanto a la disminución del porcentaje de oxigeno, no se puede atribuir a la formación de capas encima del dióxido de titanio porque las moléculas utilizadas para la funcionalización tienen átomos de oxígeno. Para analizar las variaciones de porcentaje del oxigeno, se realiza más adelante una deconvolución de los picos de la señal de oxigeno (figuras 24, 25 y 26).

La silanización ha producido un aumento considerable del porcentaje de silicio y nitrógeno, lo que era esperado porque una molécula de APTES está compuesta de un átomo de silicio y uno de nitrógeno en su extremidad (grupo $–NH_2$). Se puede calcular la proporción N/Si, y en este caso se obtiene un resultado de 0,73, lo que es inferior a la teoría (la cual es de 1). La cantidad de carbono aumenta también, lo que se puede explicar con la presencia de cadenas de carbono en la molécula de APTES.

La molécula de *cross linker* tiene un átomo de nitrógeno, lo que puede explicar el aumento en la cantidad de nitrógeno después de esta etapa. Esta molécula se compone también de átomos de carbono, lo cual podría explicar el aumento del porcentaje de carbono.

La funcionalización con el péptido CM15 ha producido un aumento del porcentaje de nitrógeno y de azufre. Al contrario, se observa una disminución del porcentaje del titanio, del carbono, del oxigeno y del silicio. El azufre, cuya presencia era insignificante antes, ve su porcentaje aumentar considerablemente. Es normal porque el péptido se une al *cross linker* por medio de un átomo de azufre. La presencia de nitrógeno se puede atribuir a grupos amidas y otras funcionalidades amino de la secuencia de aminoácidos del CM15. La disminución de la cantidad de silicio y de titanio se explica por la formación de otra capa de molécula encima de las muestras, lo que reduce aun más la cantidad de detección de las primeras capas por el XPS.

Para las etapas de *cross linker* y de funcionalización, la proporción N/Si aumenta (0,87 para el CL y 1,55 para el CM15), lo que es normal porque estas moléculas contienen átomos de nitrógeno y no de silicio.

Para verificar la estabilidad de la capa de péptido CM15, las muestras de CM15 han sido ultrasonicadas durante media hora en agua. Los resultados se presentan en la tabla 5 como CM15 (S). Los porcentajes de los elementos quedan constantes después de esta etapa, interesan en particular los átomos de nitrógeno, oxigeno y azufre porque forman parte de la plataforma. La constancia de estos átomos permite afirmar que la capa de péptido es estable, esta plataforma está bien adherida a la superficie por medio del silano y el *cross linker*.

Finalmente, después de la etapa de recubrimiento con PEG, se observa un aumento del porcentaje de carbono, lo que se puede explicar porque la molécula de PEG está compuesta de cadenas de carbono. Sin embargo, aunque está es compuesta también de átomos de oxigeno y de un átomo de azufre en su extremo, los porcentajes de estos átomos no aumentan.

Para analizar de manera más precisa las variaciones de porcentaje de oxigeno, se realiza una deconvolución de los picos de oxigeno, los resultados son presentados en las figuras 24, 25, 26 y en la tabla 6:

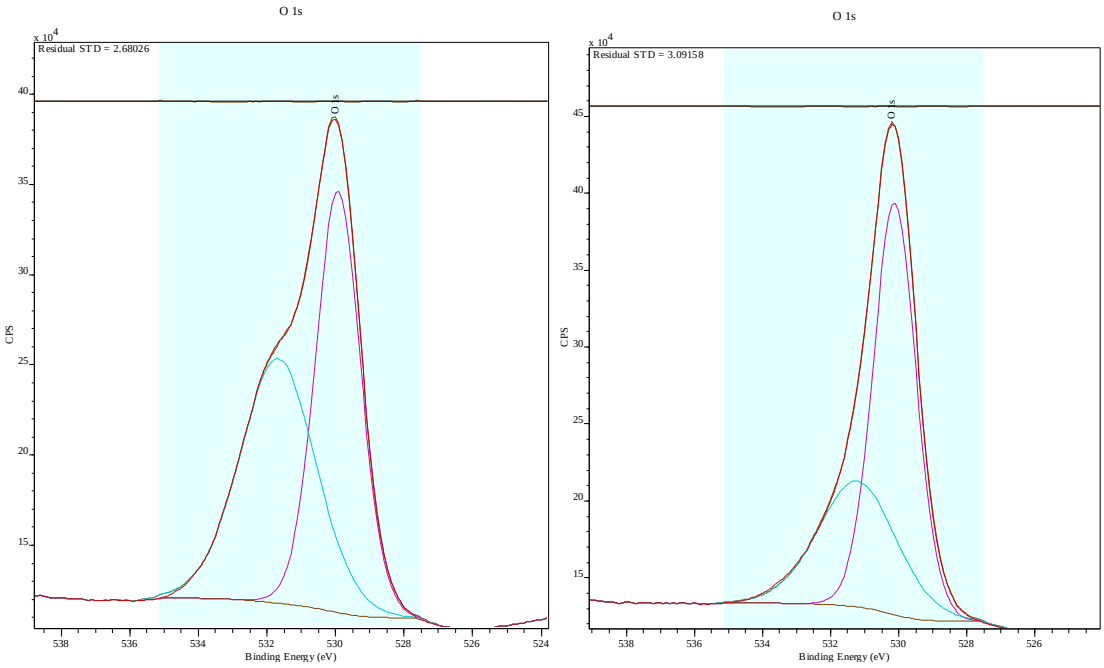


Figura 24: Deconvolución picos de oxigeno de las muestras “pulido” (izquierda) y HNO_3 (derecha)

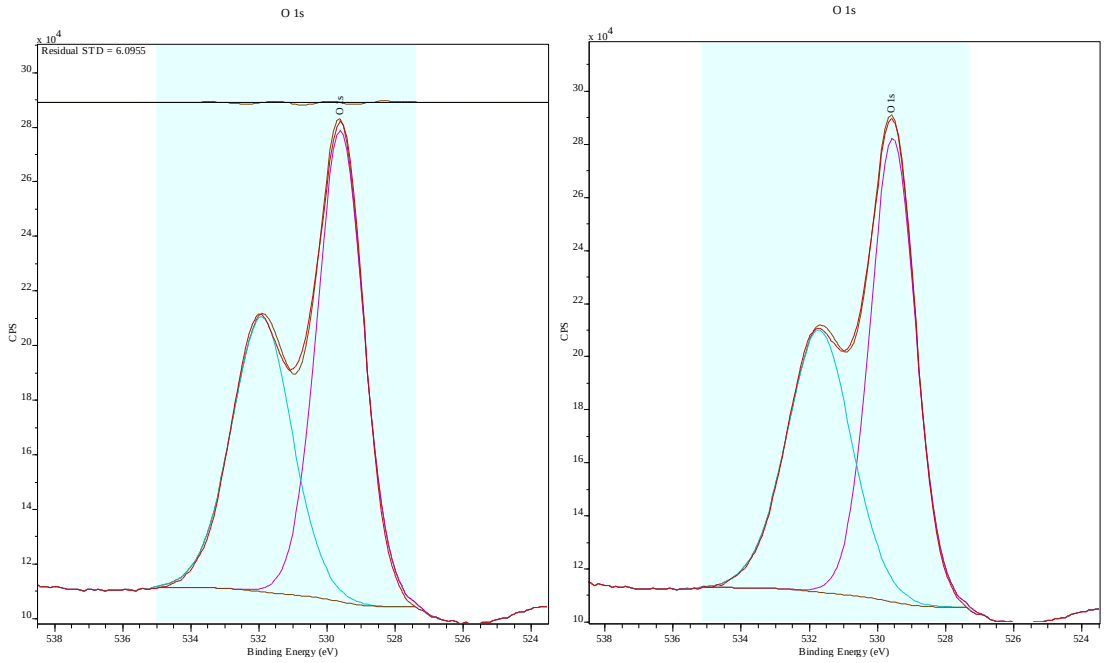


Figura 25: Deconvolución picos de oxigeno de las muestras APTES (izquierda) y CL (derecha)

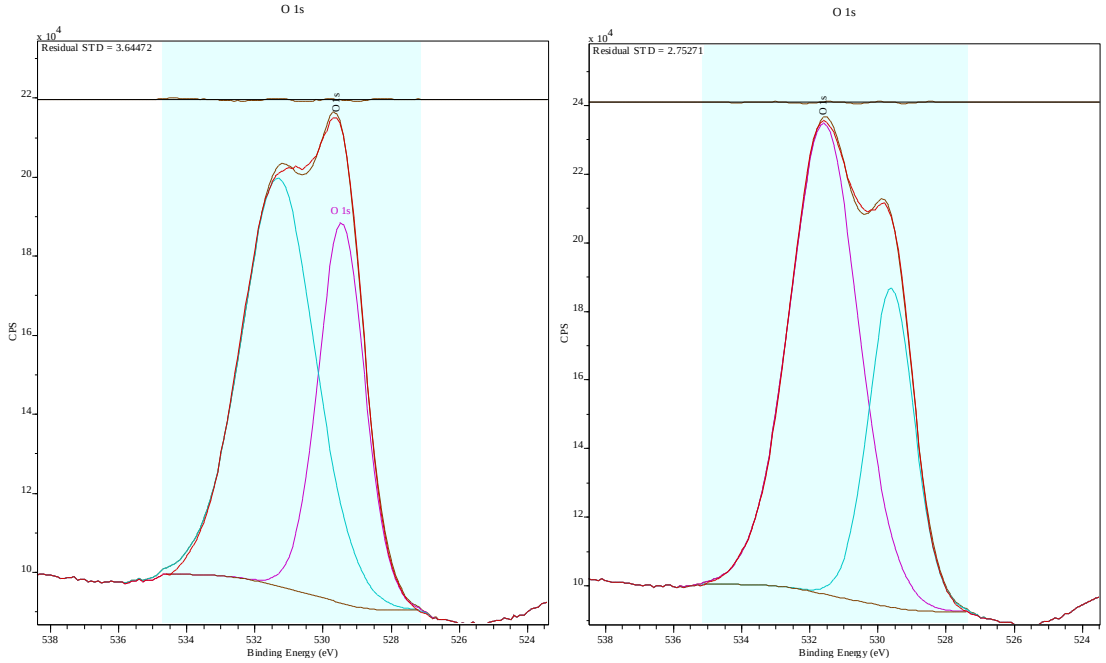


Figura 26: Deconvolución picos de oxigeno de las muestras CM15 (izquierda) y PEG (derecha)

Muestra	Átomo	Posición del pico de energía de enlace	% at concentración	Especies
Ti pulido	O1s	529,93	50,64	TiO_2
	O1s	531,68	49,36	COOH, Ti-OH
Control	O1s	530,12	64,14	TiO_2
	O1s	531,22	35,86	COOH, Ti-OH
APTES	O1s	529,61	57,14	TiO_2
	O1s	531,22	42,86	Ti-Si-O
CL	O1s	529,55	55,64	TiO_2
	O1s	531,77	44,36	Ti-Si-O, CO carbonilos
CM15	O1s	529,45	37,01	TiO_2
	O1s	531,31	62,99	Ti-Si-O, CO carbonilos
PEG	O1s	529,61	31,23	TiO_2
	O1s	531,59	68,77	Ti-Si-O, CO, CH_2-O-CH_2

Tabla 6: Resumen de los datos de la deconvolución de los picos de oxigeno

En teoría, los picos con una energía entre 531-532 eV corresponden a los enlaces Si-O, C=O, CO_2H y C-OH, los picos a una energía superior a 532 eV corresponden a agua fisisorbida. Los picos que salen a una energía sobre 529-530 eV, es decir a una energía inferior, corresponden a TiO_2. [13] [21]

En la muestra de titanio pulido, el pico de la izquierda a 531,68 eV corresponde a los enlaces COOH y Ti-OH que corresponden a contaminación orgánica en las muestras y también a los grupos hidroxilos de la superficie del titanio. El pico a 529,93 eV corresponde al TiO_2, que es mayoritario en este caso.

El proceso de activación con acido nítrico produce una disminución del pico a 531,22 eV. Eso se explica porque esta etapa permite la creación de una capa homogénea de TiO_2, pero el acido nítrico participa también a la limpieza de los contaminantes, lo que produce una disminución considerable del pico correspondiente a esos contaminantes (grupos COOH).

Al poner el APTES, el pico con la energía más elevada (531,22 eV) aumenta. Se explica por la creación de enlaces Ti-O-Si durante la etapa de silanización. Este pico se solapa con la señal de los enlaces COOH y Ti-OH, resulta difícil de analizar precisamente cada enlace.

Para las etapas siguientes de CL, CM15 y PEG, el pico situado a energía más alta sigue aumentando, como indica su porcentaje en la tabla 6. En efecto, las moléculas utilizadas y más precisamente la plataforma contienen enlaces C=O y CO-NH lo que participa al aumento de este porcentaje.

- ➔ Se puede afirmar que la capa de péptido es estable gracias a un análisis XPS de las muestras después de una etapa de ultrasonidos.

- ➔ Las varias capas depositadas sobre la superficie de las muestras (silano, *cross linker*…) producen una reducción de la señal detectable de la capa de óxido de titanio.

- ➔ Se ha caracterizado el proceso de funcionalización a nivel químico. En particular, cabe destacar que se ha podido caracterizar la presencia de péptido sobre las superficies.

4.1.6. FTIR – Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

Las superficies de las muestras fueron analizadas por FTIR, para estudiar los grupos químicos detectables en la superficie de las muestras a lo largo de las etapas del proceso de funcionalización. Se puede identificar las señales que aparecen en los espectros obtenidos.

En la figura 27, se muestran los espectros FTIR de las muestras HNO_3 y APTES:

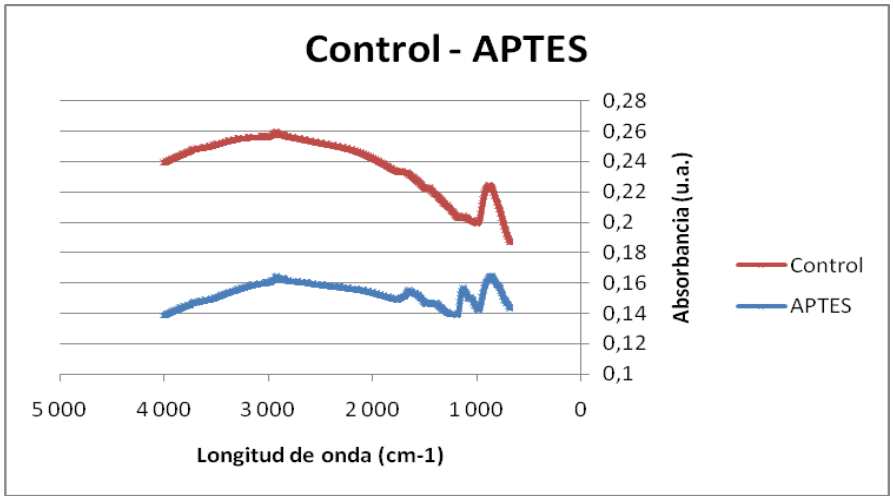


Figura 27: Espectros FTIR muestras HNO_3 y APTES

La diferencia entre estos dos espectros se ve en las longitudes de onda alrededor de 1100 cm^{-1} con una banda que aparece en el espectro de la muestra APTES.

En la figura 28, se ve una ampliación del espectro de la superficie después del tratamiento de silanización entre 700 y 1500 cm^{-1}.

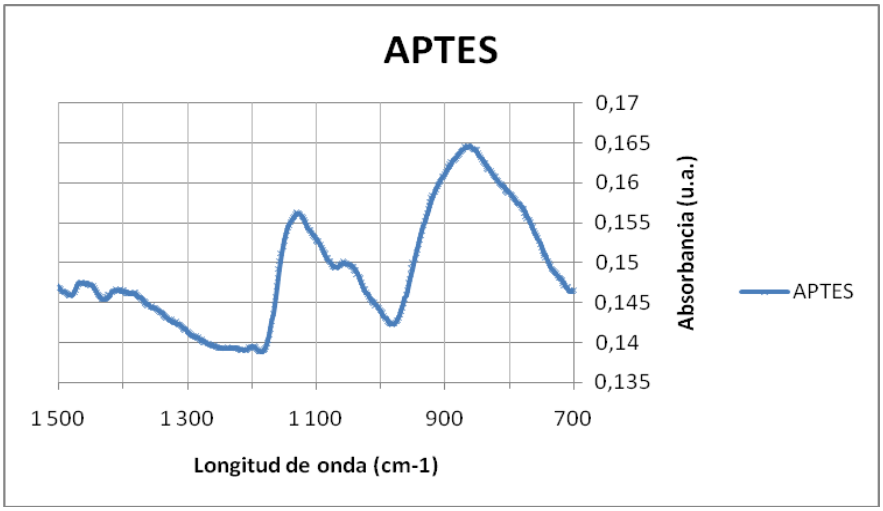


Figura 28: Espectro FTIR de la muestra APTES

Tal y como se observa en las figuras 27 y 28, después de silanizar aparecen dos nuevos picos en la región cercana a los 1100 cm^{-1}. Estos picos corresponden a los stretching de los grupos Ti-O-Si y Si-O-Si, y corroboran la presencia de silanos sobre la superficie y su unión al titanio, tal y como se había observado en los resultados de XPS.

Sin embargo, los sucesivos pasos de funcionalización (*cross linker*, CM15, PEG) no comportaron ningún cambio significativo en los espectros de IR. Esto seguramente es debido a la baja de sensibilidad de la técnica sobre muestras de titanio. Para observar estos cambios, sería necesario hacer medidas con un número mayor de acumulaciones, lo cual comportaría tiempos de análisis mucho más largos.

- ➔ La etapa de silanización permite la creación de enlaces Ti-O-Si y Si-O-Si en la superficie de las muestras, que forman parte de la capa de silano.

- ➔ Los cambios producidos por la etapa de funcionalización con *cross linker*, CM15 y PEG, no se detectan en los espectros.

- ➔ El FTIR es una buena técnica para caracterizar el proceso de silanización.

4.2. Caracterización biológica de las superficies durante el proceso de biofuncionalización

Una vez caracterizada la superficie de manera fisicoquímica y haber demostrado cambios de topografía, de rugosidad y de composición química a lo largo del proceso de funcionalización, se estudia la respuesta biológica de estas superficies.

En esta parte, se caracteriza la respuesta biológica de células madre mesenquimales humanas (hMSCs) precursoras de osteoblastos sobre las superficies de titanio funcionalizadas con biomoléculas. Se estudia el comportamiento de las células en el titanio con ensayos de adhesión, proliferación y diferenciación.

4.2.1. Ensayo de adhesión

Dos ensayos diferentes de adhesión fueron realizados durante este proyecto.

El primer tenía como objetivo la caracterización de cada etapa del proceso de biofuncionalización en cuanto a la adhesión de células, para evaluar el número y la propagación de estas células.

El secundo ensayo permitió la caracterización de la eficacia de la biofuncionalización de las muestras, evaluando la actividad de la plataforma en comparación con los péptidos RGD y PHSRN.

4.2.1.1. Etapas del proceso de funcionalización

En este ensayo, las etapas del proceso de funcionalización fueron analizadas. La adhesión de las células se estudió en cinco condiciones diferentes:

- HNO_3: control negativo
- APTES
- CL
- CM15
- FN (recubierto con 50 µg/L de fibronectina – control positivo)
-

Las células utilizadas fueron células hMSCs en el paso 3, sembradas a una densidad de 7000 células por disco con medio sin FBS. El tiempo de incubación era de 4 horas a 37 °C y con 5% (v/v) de CO_2.

Se realizo la tinción de los núcleos y de las fibras de actina. Se estudió las muestras con un microscopio de fluorescencia. Se obtuvieron las imágenes de las figuras 29 y 30:

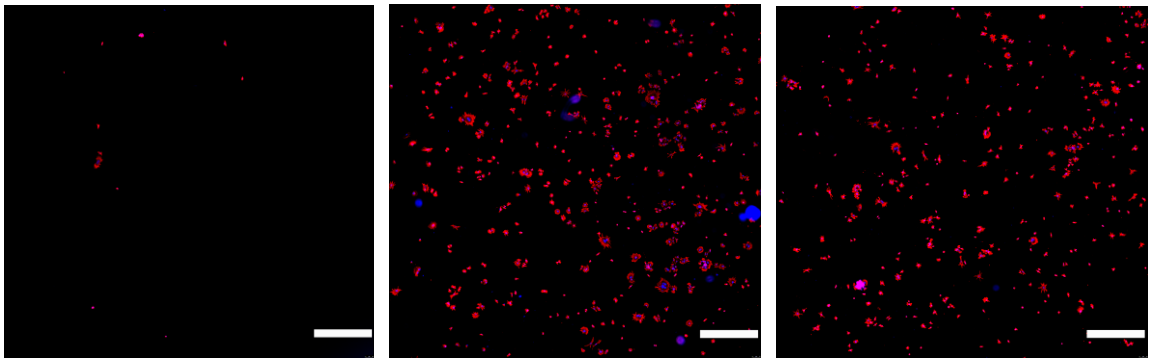


Figura 29: Imágenes de las muestras HNO_3 (izquierda), APTES (centro), CL (derecha)
Barras de escala: 500 µm

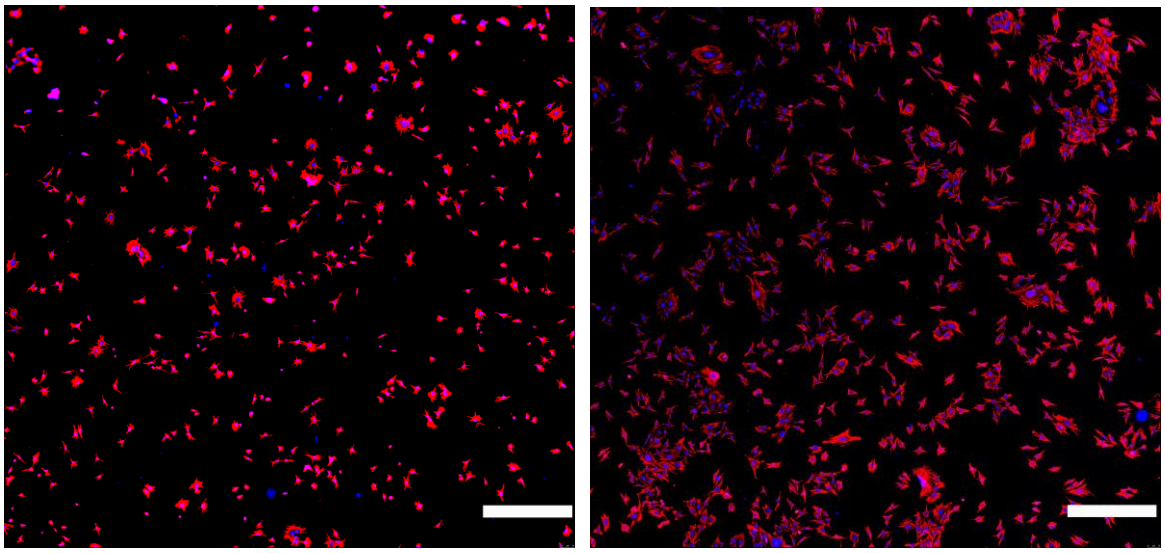


Figura 30: Imágenes de las muestras CM15 (izquierda), FN (derecha)
Barras de escala: 500 µm

Con estas imágenes, se puede calcular el número y el área de las células utilizando el software ImageJ. Se obtiene los resultados presentados en la figuras 31 y 32:

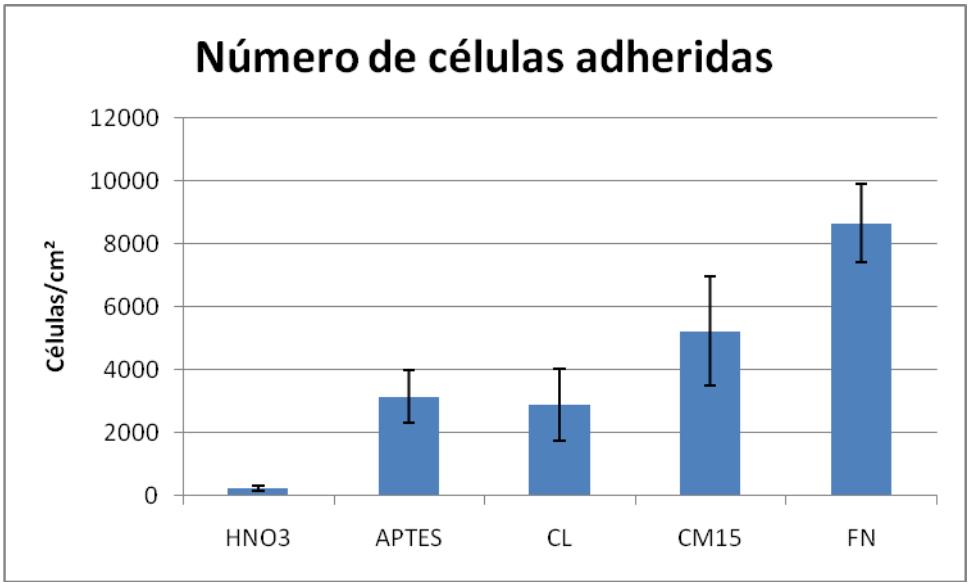


Figura 31: Número de células hMSCs adheridas después de 4 horas de incubación

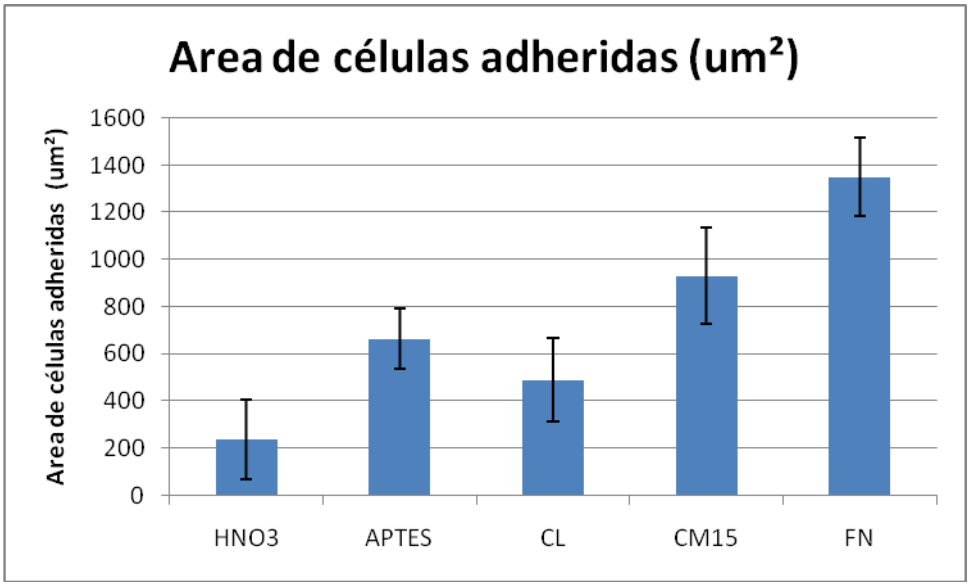


Figura 32: Área de las células adheridas después de 4 horas de incubación

En la muestra HNO_3 se ve que muy pocas células están adheridas a la superficie. Además, estas células tienen un área muy pequeña y son muy redondas.

Al poner el APTES, tanto el número de células adheridas como su área aumentan. Aunque la superficie de la muestra APTES no tiene motivos de adhesión celular como la secuencia RGD, parece que las células pueden adherirse de manera inespecífica.

Sin embargo, aunque están adheridas, las células tienen una forma bastante redonda, pocas estiradas, los filamentos de actina no están muy definidos.

Después de la etapa del *cross linker,* se observa que el número de células adheridas a las superficies es menor. Esto indica que las células interaccionan más favorablemente con el grupo amina del APTES que con el grupo maleimido de la molécula de *cross linker*. Igual que para las muestras con APTES, las células están poco estiradas sobre esta superficie.

El análisis de la muestra CM15 revela un aumento significativo del número de células adheridas. Lo que es normal y era esperado, porque la plataforma tiene dos secuencias que promueven la adhesión celular. Además del aumento del número de células, se observa también un aumento del área de estas células. En efecto, las células adheridas aparecen muy estiradas en la imagen del microscopio, con muchos filamentos de actina.

Es en las muestras de fibronectina, el control positivo, que se observa el mayor número de células adheridas, y con el área el más grande. Es normal porque estas muestras fueron recubiertas con la proteína fibronectina, el componente natural de la ECM ósea.

➔ La biofuncionalización del titanio con la plataforma (CM15) mejora la adhesión de hMSCs sobre el titanio, tanto a nivel de número de células adheridas como de estiramiento.

4.2.1.2. Eficacia de la biofuncionalización

Una vez demostrada la eficacia de la plataforma CM15 con el ensayo precedente, el objetivo de este ensayo es comparar su actividad con varios controles.

Como se ve en la figura 4, la plataforma está compuesta de dos secuencias de amino ácidos, RGD y PHSRN, cuya disposición y orientación está controlada de manera química. En este ensayo, se compara la actividad biológica de esta plataforma CM15 con los dos motivos RGD y PHSRN, por separado, y con una mezcla de estos dos motivos sin orientación y disposición específica.

Las muestras analizadas son:

- Control: control negativo
- PHSRN
- RGD
- MIX: mezcla equimolar de RGD y PHSRN (1:1)
- CM15
- FN: control positivo

Todos los péptidos se usaron a una concentración de 100 µM. La fibronectina a una concentración de 50 µg/L como control positivo. La fibronectina contiene en su estructura también los motivos de adhesión RGD y PHSRN.

Las células utilizadas fueron células hMSCs en el paso 4, sembradas a una densidad de 7000 células por disco con medio sin FBS. El tiempo de incubación fue de 4 horas a 37 °C y con 5% (v/v) de CO_2.

Después de la tinción de los núcleos y de la actina, y del análisis en el microscopio de fluorescencia, se obtienen las imágenes de las figuras 33,34 y 35:

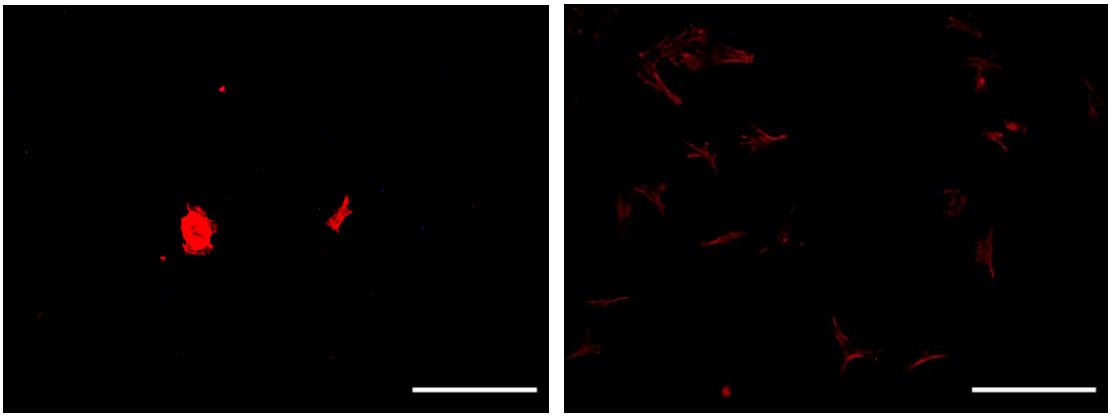


Figura 33: Imágenes de las muestras control (izquierda), RGD (derecha)
Barras de escala: 200 µm

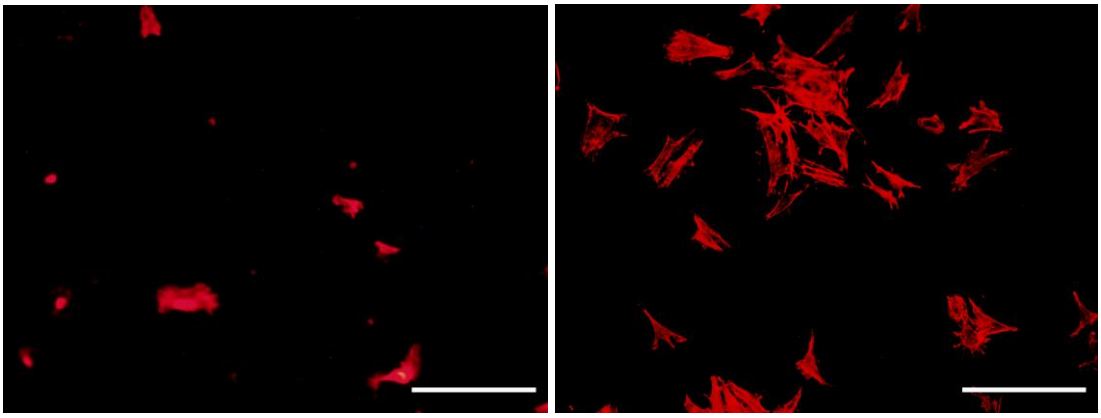


Figura 34: Imágenes de las muestras PHSRN (izquierda), MIX (derecha)
Barras de escala: 200 µm

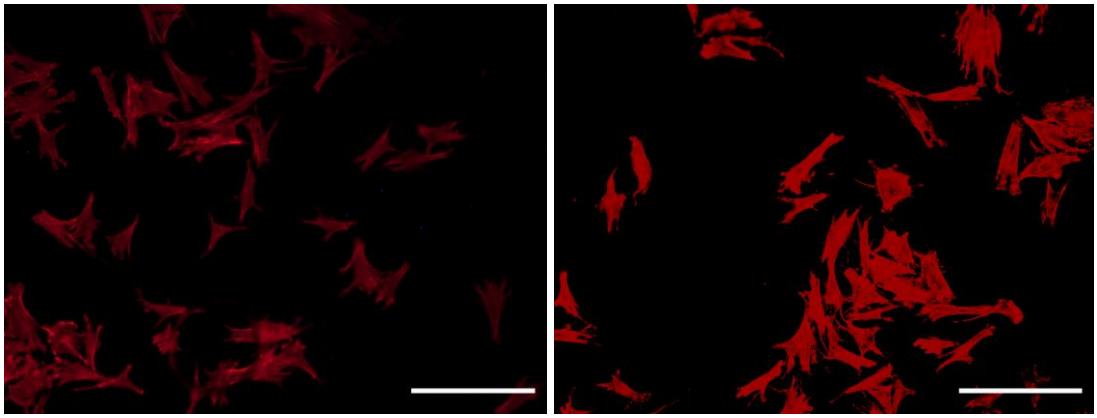


Figura 35: Imágenes de las muestras CM15 (izquierda), FN (derecha)
Barras de escala: 200 µm

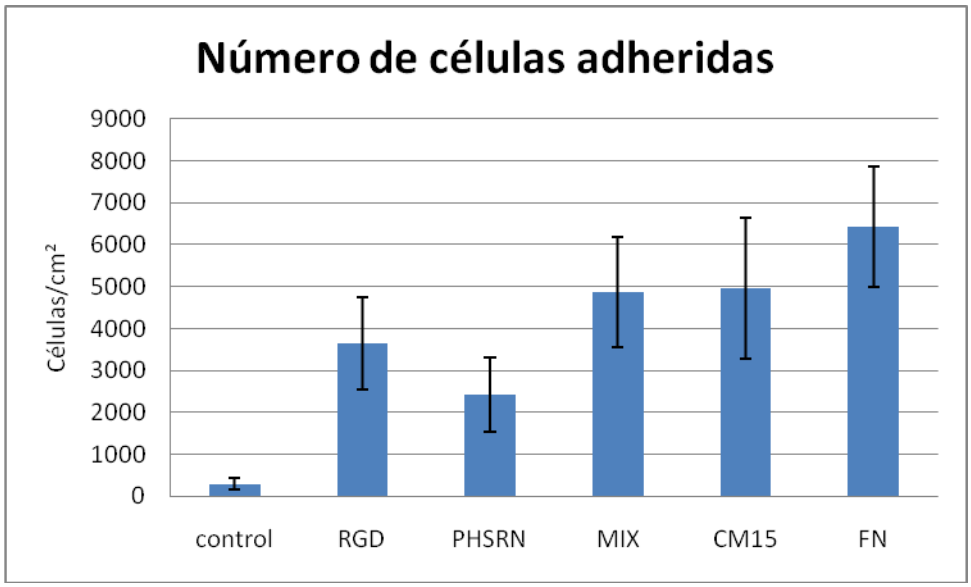


Figura 36: Número de células hMSCs adheridas después de 4 horas de incubación

Después de 4 horas de incubación, la presencia del péptido RGD aumenta el número de células adheridas sobre las superficies en comparación con el control. Este resultado demuestra la capacidad de adhesión de la secuencia RGD.

La funcionalización de las muestras de titanio con el péptido PHSRN provoca también un aumento del número de células adheridas en comparación con el control, pero este número es menos importante que en la muestra RGD. Es normal porque el motivo PHSRN es únicamente un motivo de sinergia con el RGD para unirse a integrinas.

Esta sinergia entre estas dos secuencias de amino ácidos se verifica de manera significativamente en los resultados de la figura 36. En efecto, la funcionalización con estos dos motivos, presentados como una mezcla (condición MIX) o en la forma de una plataforma (condición CM15) provoca un aumento del número de células adheridas.

La funcionalización con la plataforma CM15 aumenta ligeramente el número de células adheridas, en comparación con la muestra MIX, aunque este aumento no parece ser significativo.

El número de células adheridas más elevado se encuentra en las muestras FN, el control positivo. Es normal porque las superficies de estas muestras fueron recubiertas con la proteína de adhesión natural fibronectina, el componente natural de la ECM ósea.

Con las imágenes obtenidas con el microscopio, no fue posible de cuantificar el área de las células adheridas con el software ImageJ por causa de la calidad de estas imágenes. Sin embargo, en las imágenes de las figuras 33,34 y 35, puede apreciarse el comportamiento de las células.

En las muestras de control y de PHSRN, las células están muy redondas. Con las muestras funcionalizadas con el motivo de adhesión RGD, las células aparecen más estiradas. La utilización de los dos motivos RGD y PHSRN juntos, tanto en una mezcla (MIX) como en una plataforma (CM15) permite a las células estirarse más extensamente. En efecto, en las figuras 34 y 35 pueden observarse muchos filamentos de actina. Como se esperaba, es en las muestras de fibronectina, el control positivo, donde las células aparecen más estiradas.

- ➔ Estos resultados verifican la capacidad de adhesión del motivo RGD.

- ➔ Este ensayo demuestra la sinergia entre las dos secuencias de amino ácidos RGD y PHSRN, provocando un aumento del número y del área de las células adheridas en las muestras MIX y CM15.

- ➔ Se verifica la eficacia de la biofuncionalización con la plataforma CM15 ya que el uso de esta plataforma mejora la capacidad del titanio para promover la adhesión de células.

4.2.2. Ensayo de proliferación

Una vez comparada la actividad de la plataforma CM15 con los péptidos RGD y PHSRN mediante un ensayo de adhesión, se comparó esta actividad también con un ensayo de proliferación.

Este ensayo se realizó con el mismo tipo de muestras y controles definidos en el ensayo anterior (ver sección 4.2.1.2.).

Las células utilizadas fueron células hMSCs en el paso 4, sembradas a una densidad de 5000 células por disco, cultivadas en un medio basal.

La capacidad de las células hMSCs a proliferar sobre superficies biofuncionalizadas fue analizada en dos puntos de tiempo, los días 4 y 8. El número de células fue calculado con la técnica del Alamar Blue. Se obtienen los resultados presentados en la figura 37:

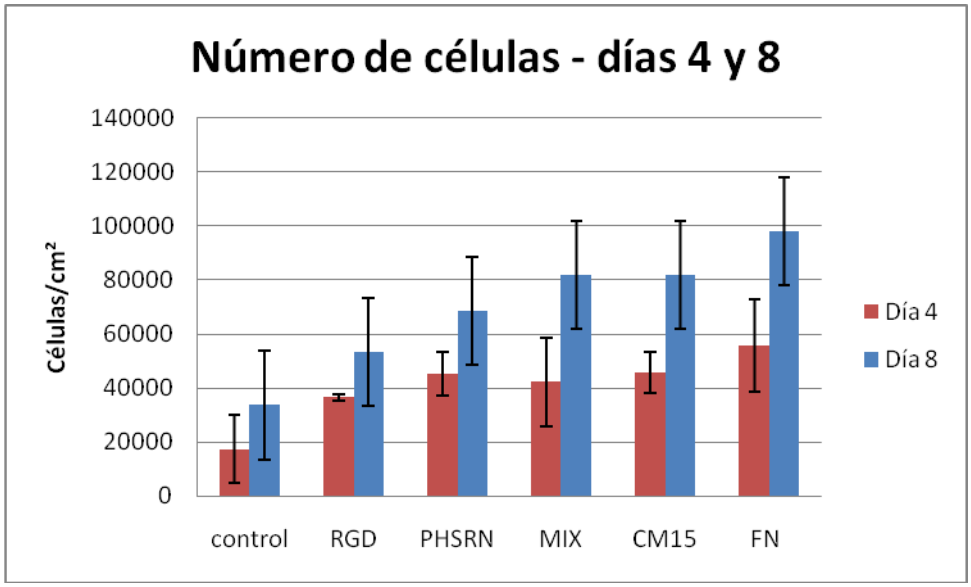


Figura 37: Proliferación de células hMSCs después de 4 y 8 días de incubación

Después de 4 días de proliferación, se ve un aumento del número de células en todas las superficies en comparación con el control. El número de células más elevado se encuentra en las muestras FN, el control positivo. Este resultado era esperable ya que la superficie fue recubierta con la proteína de adhesión natural fibronectina, la cual está descrita también de favorecer la proliferación celular. [12]

El número de células en la muestra PHSRN aparece un poco más elevado que en la muestra RGD, lo que es difícil de explicar porque el motivo RGD es un motivo de adhesión, mientras que el PHSRN es únicamente un motivo de sinergia con el RGD para unirse a integrinas. Es decir, por si solo, no debería tener propiedades adhesivas. Por este motivo, el número de células en la muestra PHSRN tendría que ser inferior al del RGD. [12]

Dejando de lado el resultado para la condición PHSRN, se verifica la sinergia entre los dos motivos RGD y PHSRN. En efecto, el número de células es más importante en las condiciones MIX y CM15 que en la condición RGD.

Además, la disposición y la orientación de las dos secuencias controladas en el CM15 parecen tener importancia a nivel biológico, porque el número de células es más importante en la muestra CM15 que en la muestra MIX.

Estos resultados se pueden correlacionar con los resultados del precedente ensayo de adhesión.

Después de 8 días de incubación, de nuevo observamos el mayor número de células en las muestras control positivo.

El resultado para la muestra PHSRN sigue siendo más elevado que el de la muestra RGD, como en el día 4. Pero se observa de manera mucho más significativa la sinergia entre estos dos motivos, con los resultados de las muestras MIX y CM15. En efecto, se observa un aumento importante del número de células en las muestras funcionalizadas con estas dos secuencias en el mismo tiempo, en comparación con el RGD.

Sin embargo, al contrario de los resultados del día 4, se observa el mismo número de células en las muestras MIX y CM15.

- ➔ Este ensayo verifica la sinergia entre los dos motivos RGD y PHSRN.

- ➔ Después de 4 días de incubación, el CM15 presenta mejores resultados que el MIX, con un número de células más importante. Sin embargo, a 8 días de incubación, esta tendencia no se verifica. Podemos afirmar que el uso de la molécula CM15 no solo mejora la capacidad del titanio para promover la adhesión de hMSCs, sino que también mejora su proliferación.

4.2.3. Ensayo de diferenciación

Las células mesenquimales pueden diferenciarse en distintos tipos de celulares. Para ver si nuestra estrategia de biofuncionalización promueve la diferenciación de estas células en osteoblastos se realiza un ensayo de mineralización.

La biomineralización es esencial en el proceso de osteointegración de los implantes porque crea una conexión entre el hueso y la superficie del implante. La capacidad de las células osteoblásticas para producir nódulos de mineralización fue evaluada con la caracterización de los depósitos de calcio.

La tinción con Alizarin Red es una técnica histoquímica muy utilizada para detectar depósitos de calcio. Los cristales de calcio creados durante el proceso de biomineralización se tiñen con este reactivo. [22]

Este ensayo fue realizado con células hMSCs, sembradas a una densidad de 2000 células por disco, durante 21 días, en dos medios de cultivo diferentes: un medio basal y un medio osteogénico. El medio osteogénico es el medio común (con FBS, HEPES buffer solución, penicilina/ estreptomicina y L-glutamina) suplementado con ácido ascórbico, B-Glicerofosfato y dexamethasona.

En el medio osteogénico, el ácido ascórbico, el B-Glicerofosfato y la dexamethasona estimulan la diferenciación celular, inducen la diferenciación osteoblástica de células.

Se estudió de nuevo la plataforma en comparación con los péptidos lineales, su mezcla y los controles negativo y positivo, tal y como se ha descrito en los ensayos previos de adhesión y proliferación.

Los cristales teñidos fueron caracterizados con el uso de un microscopio. A continuación se presentan las imágenes obtenidas con los dos medios de cultivo diferentes y con los varios proteínas y péptidos (figuras 38, 39, 40, 41, 42, 43):

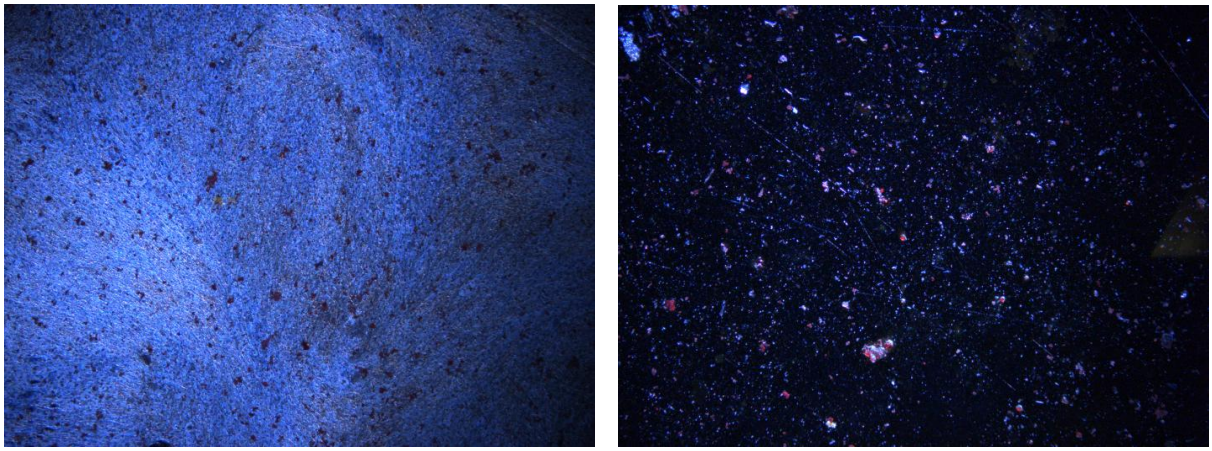


Figura 38: Imágenes de biomineralización en la muestra HNO_3 en medio basal (izquierda) y osteogénico (derecha)

En la muestra de HNO_3, cultivado en medio osteogénico (derecha), se ve una proliferación celular casi inexistente, con pocas células y de forma redonda. Al contrario, en el medio basal, se ve una proliferación de las células antes de la mineralización. Se ven también zonas rojas que demuestran la presencia de un poco de calcio.

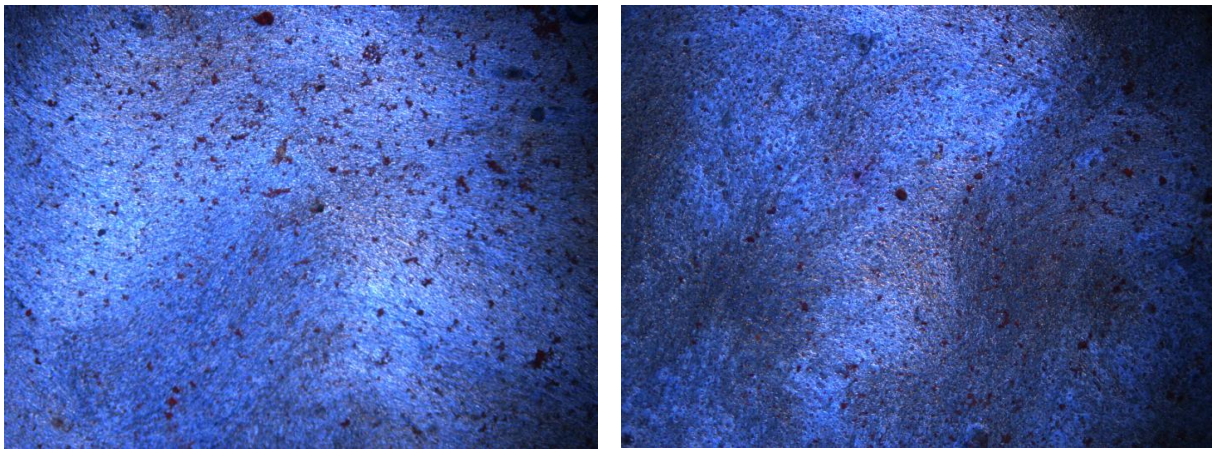


Figura 39: Imágenes de biomineralización en la muestra PHSRN en medio basal (izquierda) y osteogénico (derecha)

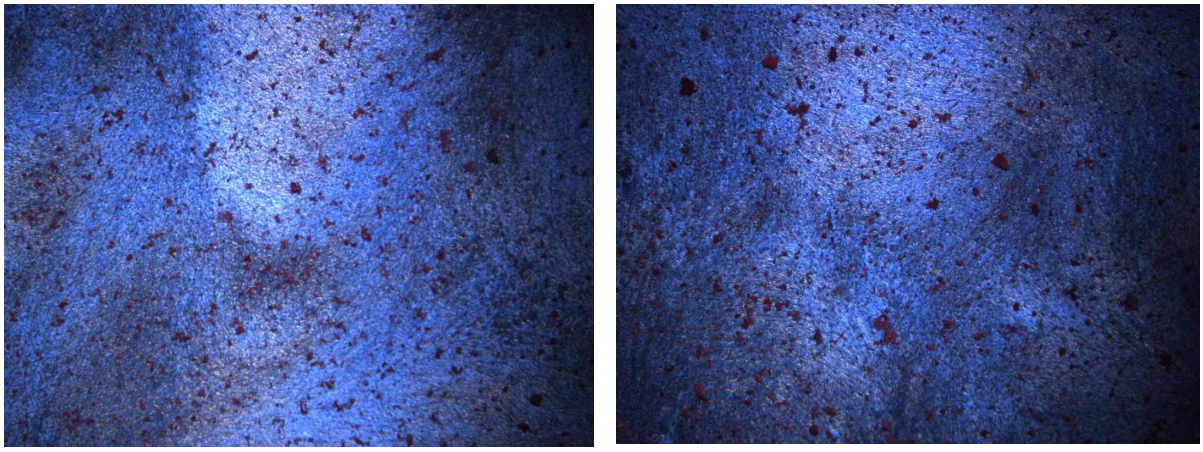


Figura 40: Imágenes de biomineralización en la muestra RGD en medio basal (izquierda) y osteogénico (derecha)

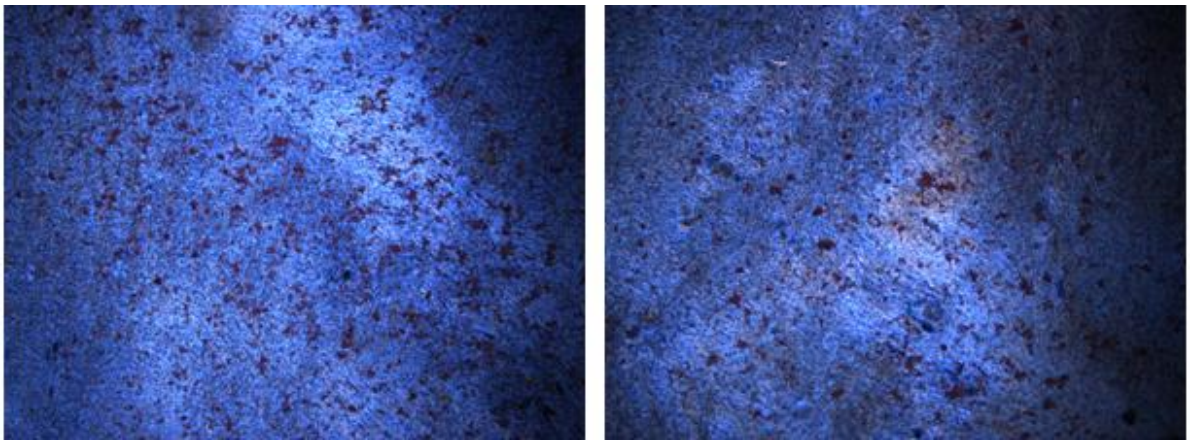


Figura 41: Imágenes de biomineralización en la muestra MIX en medio basal (izquierda) y osteogénico (derecha)

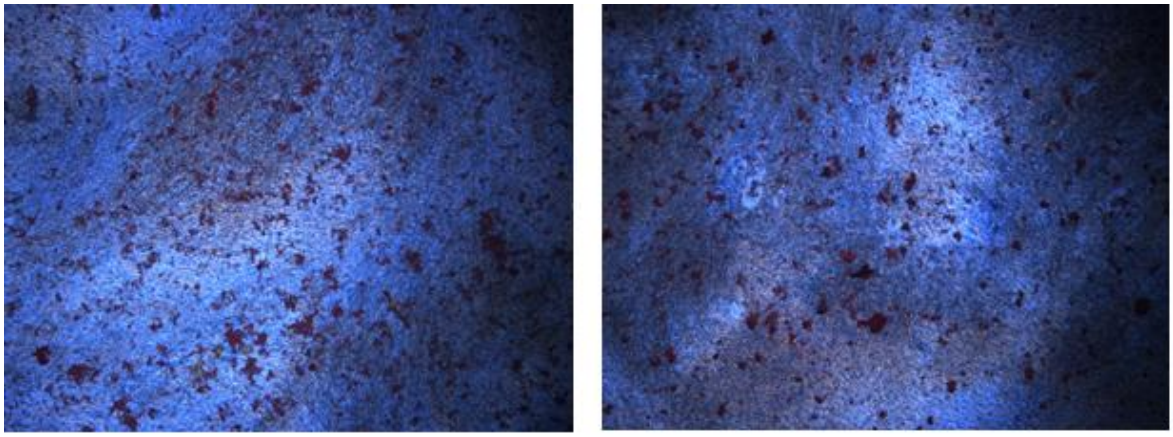


Figura 42: Imágenes de biomineralización en la muestra CM15 en medio basal (izquierda) y osteogénico (derecha)

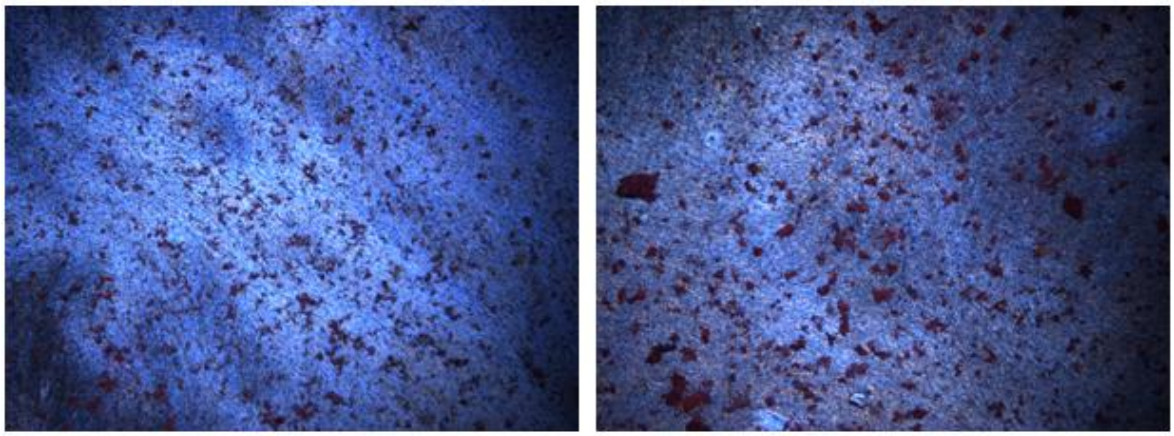


Figura 43: Imágenes de biomineralización en la muestra FN en medio basal (izquierda) y osteogénico (derecha)

En términos cualitativos, se ve en todas las superficies la presencia de cristales de calcio. La mineralización aparece distribuida de manera homogénea sobre las superficies.

Durante el intervalo de tiempo de cultivo (21 días), el proceso de mineralización no cubrió completamente la superficie de las muestras. En efecto, se ven zonas de las muestras sin depósitos rojos.

En todas las muestras biofuncionalizadas, se ve una diferencia de mineralización entre los medios de cultivo. De manera general, se observan muchas más zonas rojas en las células cultivadas en medio osteogénico (imágenes de derecha), y de tamaño más grande. Esto confirma que el ácido ascórbico, el B-glicerofosfato y la dexamethasona, presentes en el medio osteogénico, estimulan la diferenciación celular.

Resulta difícil de cuantificar las zonas de calcio en las muestras. La funcionalización con el motivo PHSRN, presenta muy pocas zonas teñidas, el proceso de mineralización se revela poco eficaz en este caso. La funcionalización con el motivo RGD y con los motivos RGD y PHSRN presentados como una mezcla (muestra MIX) presentan los mismos resultados.

La utilización de la plataforma CM15 como alternativa al uso de mezclas o de la proteína fibronectina entera presenta resultados muy positivos. En efecto, no se observa ninguna diferencia entre las imágenes de las muestras CM15 y del control positivo FN (excepto un mayor número de zonas rojas en la fibronectina en medio osteogénico, pero la diferencia no parece significativa).

Estos resultados demuestran el potencial biológico de adhesión del motivo RGD, verificado en los ensayos de adhesión y de proliferación. Además el motivo RGD promueve una mineralización mucho más importante en las superficies en comparación al titanio control o al titanio funcionalizado con el motivo PHSRN.

La sinergia entre estas dos secuencias, verificada en los ensayos de adhesión y de proliferación no se verifica con las muestras MIX, cuando los dos motivos son depositados de manera inespecífica en las superficies. En efecto, las imágenes obtenidas con las muestras RGD y MIX son muy parecidas, lo que significa que la mineralización ha tenido lugar con la misma eficacia.

Sin embargo, esta sinergia se verifica con las muestras de titanio funcionalizadas con la plataforma CM15, cuando los dos motivos son depositados en las superficies de manera específica. Se ve distintivamente una mineralización más importante en las muestras CM15 que en las muestras de titanio control, o en las muestras funcionalizadas con RGD, PHSRN o una mezcla de los dos motivos.

Estos resultados indican que la presencia de la secuencia de sinergia RGD-PHSRN, como una mezcla conduce a los mismos resultados que el motivo RGD. Sin embargo, la presencia de esta secuencia de sinergia en la plataforma CM15 presenta mejores resultados.

- ➔ La plataforma CM15 presenta resultados positivos, provocando una mineralización más importante que en las muestras funcionalizadas con RGD o PHSRN.
- ➔ El proceso de funcionalización con CM15 promueve la diferenciación de las células hMSCs en osteoblastos.

Podemos concluir que la molécula CM15 presenta un elevado potencial osteoconductivo y osteoinductivo, representando así una estrategia muy prometedora para mejorar la bioactividad de los implantes metálicos.

5. Conclusiones

El primer objetivo de este proyecto fue la caracterización fisicoquímica de las superficies de titanio a lo largo del proceso de funcionalización (pulido, activación, silanización, *cross linker*, inmovilización de la plataforma CM15 y recubrimiento con polietilenglicol).

La microscopia electrónica de barrido muestra que el proceso de pulido reduce la rugosidad de las muestras, haciéndolas más lisas. Sin embargo, el SEM no permite visualizar cambios en la topografía de la superficie del titanio en las siguientes etapas del proceso de funcionalización.

Las medidas de rugosidad realizadas con la microscopía interferométrica demuestran que la rugosidad de las superficies de titanio disminuye de manera significativa con el proceso de pulido. Esta rugosidad queda constante en las otras etapas del proceso de funcionalización.

El análisis de los valores del ángulo de contacto y de la energía superficial revela modificaciones de las propiedades fisicoquímicas de las superficies de titanio durante el proceso de biofuncionalización. Este proceso provoca un aumento del carácter hidrófilico de las superficies de titanio y un aumento de la energía superficial de las superficies (excepto para la última etapa de recubrimiento).

La microscopía de fuerza atómica detecta la presencia de silanos, en forma de partículas de geometría esférica en la superficie de las muestras, después de la etapa de silanización. No se observan otros cambios de topografía de las superficies para los otros pasos del proceso de biofuncionalización.

La técnica de espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X permite de caracterizar este proceso de funcionalización a nivel químico. Se observan cambios en la composición química a nivel superficial, más precisamente en el porcentaje de átomos de titanio, carbono, oxígeno, azufre, silicio y nitrógeno presentes a la superficie del titanio para cada etapa de este proceso. Estos estudios demuestran también que la capa de péptido depositada en las muestras es estable.

Los espectros obtenidos por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier muestran la creación de nuevos enlaces químicos a la superficie de las muestras después de la silanización. Las otras modificaciones químicas de las superficies no se observan en los espectros de las otras etapas del proceso de funcionalización.

Para abreviar, se observan modificaciones en la topografía, rugosidad, mojabilidad, energía superficial y composición química de las superficies de titanio a lo largo del proceso de biofuncionalización.

La secunda parte de este proyecto trata de la caracterización biológica de las superficies. Se estudia la respuesta biológica de células madre mesenquimales humanas (hMSCs) sobre las superficies de titanio funcionalizadas con biomoléculas.

Un ensayo de adhesión permite el estudio del comportamiento de las células durante el proceso de funcionalización. El número de células adheridas y el área de estas células aumentan con la presencia de la plataforma CM15.

Además, mediante un ensayo de adhesión y otro de proliferación se compara la actividad de la plataforma CM15, compuesta de los dos motivos RGD y PHSRN, con varios controles. Estos estudios demuestran la sinergia entre las dos secuencias RGD y PHSRN y la eficacia de la plataforma, en términos de número de células adheridas, del área de estas células y también de su proliferación después de 4 y 8 días de incubación.

Finalmente, el ensayo de mineralización demuestra la eficacia de la plataforma en el proceso de mineralización de las superficies. La funcionalización con CM15 promueve la diferenciación de las células hMSCs en osteoblastos.

Se puede concluir de esta parte que el uso de la plataforma CM15 promueva una mejora significativa de la adhesión, proliferación y diferenciación de hMSCs en titanio.

La estrategia de funcionalización del titanio con el proceso caracterizado en este proyecto aporta resultados esperanzadores. Esta estrategia parece muy prometedora para funcionalizar implantes de titanio para mejorar su osteointegración.

6. Impacto económico y ambiental

6.1. Presupuesto

A continuación se presentan las tablas con los costes del proyecto detallados. En éstos son considerados los reactivos específicos, los equipos utilizados y el personal necesario para llevarlo a cabo.

Conceptos	Cantidad	Precio	Coste (€)
Material			
Barra de titanio (1m de longitud - 10 mm de diámetro)	0,5	368,45€/barra	184,23
Coste total asociado a la materia prima			184,23

Tabla 7: Costes asociados a la materia prima

Conceptos	Cantidad	Precio	Coste (€)
Material			
Paños de carburo de silicio 305mm de diámetro			
P800	8	150€/100	12
P1200	8	100€/100	8
P2500	8	450€/100	36
Paños de terciopelo 305mm de diámetro	2	500€/25	40
Alúmina coloidal 1µm	1	60€/L	60
Alúmina coloidal 0,05µm	1	60€/L	60
Equipo			
Pulidora automática Buehler	24	30€/h	720
Encastadora LaboPress	8	10€/h	80
Coste total asociado a la preparación de las muestras			1016

Tabla 8: Costes asociados a la preparación de las muestras

Conceptos	Cantidad	Precio	Coste (€)
Material			
Acetona	1 L	16,65€/L	16,65
Etanol	1 L	25,50€/L	25,5
Isopropanol	1 L	23,29€/L	23,29
Ciclohexano	1 L	37,21€/L	27,21
Agua	1 L	0,08€/L	0,08
Coste total asociado a la limpieza de las muestras			92,73

Tabla 9: Costes asociados a la limpieza de las muestras

Conceptos	Cantidad	Precio	Coste (€)
Material			
Acido nítrico	1,2 L	16,33€/L	19,60
APTES	2,4 mL	580€/L	1,39
Tolueno	200 mL	47,80€/L	9,56
Cross linker	240 mg	349,60€/g	83,9
DMF	120 mL	21,70€/L	2,60
Plataforma CM15	2 mg	40€/mg	80
PEG	20 mL	85,95€/L	1,72
Coste total asociado al proceso de funcionalización			198,77

Tabla 10: Costes asociados al proceso de funcionalización

Conceptos	Cantidad	Precio	Coste (€)
Equipo			
Angulo de contacto	10 h	20€/h	200
SEM con técnico	4 h	70€/h	280
Microscopía interferométrica	7 h	35€/h	245
XPS	15 h	50€/h	750
FTIR	9 h	35€/h	315
AFM	22 h	40€/h	880
Coste total asociado a la caracterización fisicoquímica			2670

Tabla 11: Costes asociados a la caracterización fisicoquímica

Conceptos	Cantidad	Precio	Coste (€)
Material			
Medio Advanced DMEM	1 L	44,80€/L	44,8
FBS	100 mL	88,40€/L	8,84
HEPES	20 mL	1104€/L	22,08
L-glutamina	10 mL	125€/L	1,25
penicilina/estreptomicina	10 mL	125€/L	1,25
ácido ascórbico	1 mL	125€/L	0,13
B-Glicerofosfato	1 mL	125€/L	0,13
dexamethasona	1 mL	125€/L	0,13
Tripsina	30 mL	69,28€/L	2,08
PBS	5 L	1,56€/L	7,8
hMSCs células	1 cryovial	332€/cryovial	332
Proteínas y péptido	10 mg	40€/mg	400
Equipo			
Campana de cultivos	50 h	10€/h	500
Coste total asociado al cultivo de células			1320,49

Tabla 12: Costes asociados al cultivo de células

Conceptos	Cantidad	Precio	Coste (€)
Ensayo de adhesión			
Material			
BSA	5 g	2,17€/g	10,85
Paraformaldehido	10 mL	9744,00€/L	97,44
Glicina	1 g	1,02€/g	1,02
Triton	1 mL	381€/L	0,38
Mouse Anti-Vinculin	0,01 mL	1325€/mL	13,25
Goat Alexa 488	0,01 mL	1475€/mL	14,75
Goat Alexa 546	0,01 mL	1426€/mL	14,75
DAPI	0,001 mL	1950€/mL	1,95
Mowiol	10 g	0,50€/g	5
Equipo			
Microscopía de fluorescencia	9 h	60€/h	540
Ensayo de proliferación			
Material			
Alamar Blue solución	15 mL	469€/100mL	70,35
Equipo			
Lector de placa	1 h	7,64€/h	7,64
Ensayo de mineralización			
Material			
Alizarin Red solución	18 mL	184 €/100mL	33,12
Equipo			
Microscopía	2h	20€/h	40
Coste total asociado a la caracterización biológica			850,50

Tabla 13: Costes asociados a la caracterización biológica

Conceptos	Cantidad	Precio	Coste (€)
Ingeniero junior	700 h	15€/h	9000
Ingeniero sénior	250 h	50€/h	12500
Coste total asociado al personal			21500

Tabla 14: Costes asociados al personal

Material de laboratorio: 500 €

Corresponde a los guantes, las puntas, las placas, las agujas, las cajas…

El coste total del proyecto es de 28 332,72 €.

6.2. Impacto ambiental

El impacto ambiental del proyecto se ha tenido en cuenta en todo momento de este proyecto. Por esto, muchos de los reactivos utilizados, a pesar de ser usados en pequeñas cantidades, han sido tratados de una manera respetuosa con el medioambiente.

Tanto en el laboratorio de Biomateriales de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial como en el laboratorio del grupo IBEC del edificio Hélix del Parc Científic de Barcelona existe un protocolo estricto de gestión de residuos a seguir.

En el laboratorio de Biomateriales se tratan los residuos químicos con un gran control. Estos residuos son embasados según su composición, existiendo diversos recipientes para su almacenaje. Dependiendo del residuo a desechar los embases tienen una capacidad u otra y están bien identificados. Su localización en el laboratorio es estratégica, encontrándose en puntos cercanos a donde los residuos son utilizados.

Una vez el recipiente ha sido llenado completamente, es almacenado en un armario de seguridad. ECOCAT, una empresa que se dedica a gestionar residuos peligrosos a nivel nacional, viene a recoger los residuos generados en el laboratorio cada 6 meses.

En el laboratorio IBEC, diversos protocolos han sido realizados para gestionar los residuos químicos pero también biológicos y domésticos. Así pues, según la naturaleza de los residuos, su recogida es separada en basuras distintas.

La retirada de residuos se realiza por parte del personal del Parc Científic y se encargan de su gestión.

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a la Universidad Politécnica de Cataluña por haberme ofrecido la oportunidad de realizar este proyecto.

Me gustaría dar las gracias a mi tutor Carles Mas por su disponibilidad, su paciencia, sus consejos, sus conocimientos y por la cantidad de cosas que he aprendido gracias a él.

Quisiera agradecer a Roberta Fraioli su ayuda, su disponibilidad, que tuvo la inmensa paciencia para enseñarme tantas cosas a lo largo de este trabajo.

Además me gustaría dar las gracias al personal técnico del departamento de Biomateriales de la ETSEIB, del Centro de Investigación en Nanoingeniería de la UPC y del IBEC, que estaba a mi lado para ayudarme a usar los equipos.

Agradezco a todos los miembros del departamento de Biomateriales para su simpatía y su ayuda cuando tuve preguntas.

Bibliografía

[1] Curso de “Biomateriales: Metales y aleaciones implantables”, Edgar Montufar, Universidad Politécnica de Cataluña, Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica, 2013

[2] Martínez-Villalobos Castillo, S. Osteosíntesis maxilofacial con titanio. Revista Española Cirugía Oral y Maxilofacial. 2004, 6, 351-368

[3] Gil, F.J. ; Ginebra, M.P. ; Planell, J.A. Metales y aleaciones para la substitución de tejidos duros. Biomecánica. 1999, 13, 73-78

[4] Martínez, C.H. ; Moreno, F. Biocompatibilidad. Fundamentos en Biomateriales de uso Odontológico. Colombia Aprende. 2003, 1, 1-5

[5] Geetha, M. ; Singh, A.K. ; Asokamani, R. ; Gogia, A.K. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implantes – A review. Progress in Materials Science. 2009, 54, 397-425

[6] Goriainov, V. ; Cook, R. ; Latham, J.M. ; Dunlop, D.G. ; Oreffo, R.O.C. Bone and metal : An orthopaedic perspective on osseointegration of metals. Acta Biomaterialia, 2014,10, 4043-4057

[7] Tejero, R. ; Anitua, E. ; Orive, G. Toward the biomimetic implant surface: Biopolymers on titanium-based implants for bone regeneration. Progress un Polymer Science. 2014, 39, 1406-1447

[8] Shekaran, A. ; García, A.J. Extracellular matrix-mimetic adhesive biomaterials for bone repair. Review article, 2010, 96, 261-272

[9] Kokubo, T. ; Kim, H.M. ; Kawashita, M. ; Nakamura, T. Bioactive metals: preparation and properties. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2004, 15, 99-107

[10]http://www.gacetadental.com/2010/09/biofuncionalizacin-el-futuro-de-los-implantes-dentales-27993/ [Consulta: 11 de enero de 2015]

[11] Rice, J.J. ; Martino, M.M. ; De Laporte, L. ; Tortelli, F. ; Briquez, P.S. ; Hubbell, J.A. Engineering the Regenerative Microenvironment with Biomaterials. Adv. Healthcare Mater, 2013, 2, 57-71

[12] Mas-Moruno, C. ; Fraioli, R. ; Albericio, F. ; Manero, J.M. ; Gil, F.J. Novel peptide-based platform for the dual presentation of biologically active peptide motifs in biomaterials. Applied Materials & Interfaces, 2014, 6, 6525-6536

[13] Xiao, S.J. ; Textor, M. ; Spencer, N.D. ; Wieland, M. ; Keller, B. ; Sigrist, H. Immobilization of the cell-adhesive peptide Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. Journal of materials science: Materials in medicine. 1997, 8, 867-872

[14] Gadelmawla, E.S. ; Koura, M.M. ; Maksoud, T.M.A. ; Elewa, I.M. ; Soliman, H.H. Roughness parameters. Journal of Materials Processing Technology. 2002, 123, 133-145

[15] Pegueroles, M. ; Aparicio, C. ; Bosio, M. ; Engel, E. ; Gil, F.J. ; Planell, J.A. ; Altankov, G. Spatial organization of osteoblast fibronectin matrix on titanium surfaces: Effects of roughness, chemical heterogeneity and surface energy. Acta Biomaterialia. 2010, 6, 291-301

[16] Mas-Moruno, C. ; Dorfner, P.M. ; Manzenrieder, F. ; Neubauer, S. ; Reuning, U. ; Burgkart, R. ; Kessler, H. Behavior of primary human osteoblasts on trimmed and sandblasted Ti6Al4V surfaces functionalized with Integrin. Journal of Biomedical MaterialsResearch part A, 2012, 101, 87-97

[17] Kwok, D.Y. ; Neumann, A.W. Contact angle measurement and contact angle interpretation. Advances in Colloid And Interface Science. 1999, 81, 167-249

[18] http://www.kruss.de/services/education-theory/glossary/contact-angle/ [Consulta: 14 octubre de 2014]

[19] Bovan, B.D. ; Hummert, T.W. ; Dean, D.D. ; Schwartz, Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. Biomateriales. 1996, 17, 137-146

[20] Xu, L.C. ; Siedlecki, C.A. Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces

[21] Dettin, M ; Herath, T. ; Gambaretto, R. ; Lucci, G. ; Battocchio, C. ; Bagno, A. ; Ghezzo, F. ; Di Bello, C. ; Polzonetti, G. ; Di Silvio, L. Assessment of novel chemical strategies for covalent attachment of adhesive peptides to rough titanium surfaces: XPS analysis and biological evaluation. Journal of Biomedical Materials Research. 2009, 91, 463-479

[22] Acosta, J.C. ; Garzón-Alvarado, D. ; Casale, M. Interaction between osteoblasts and titanium surfaces: application in dental implants. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 2010, 29, 51-68